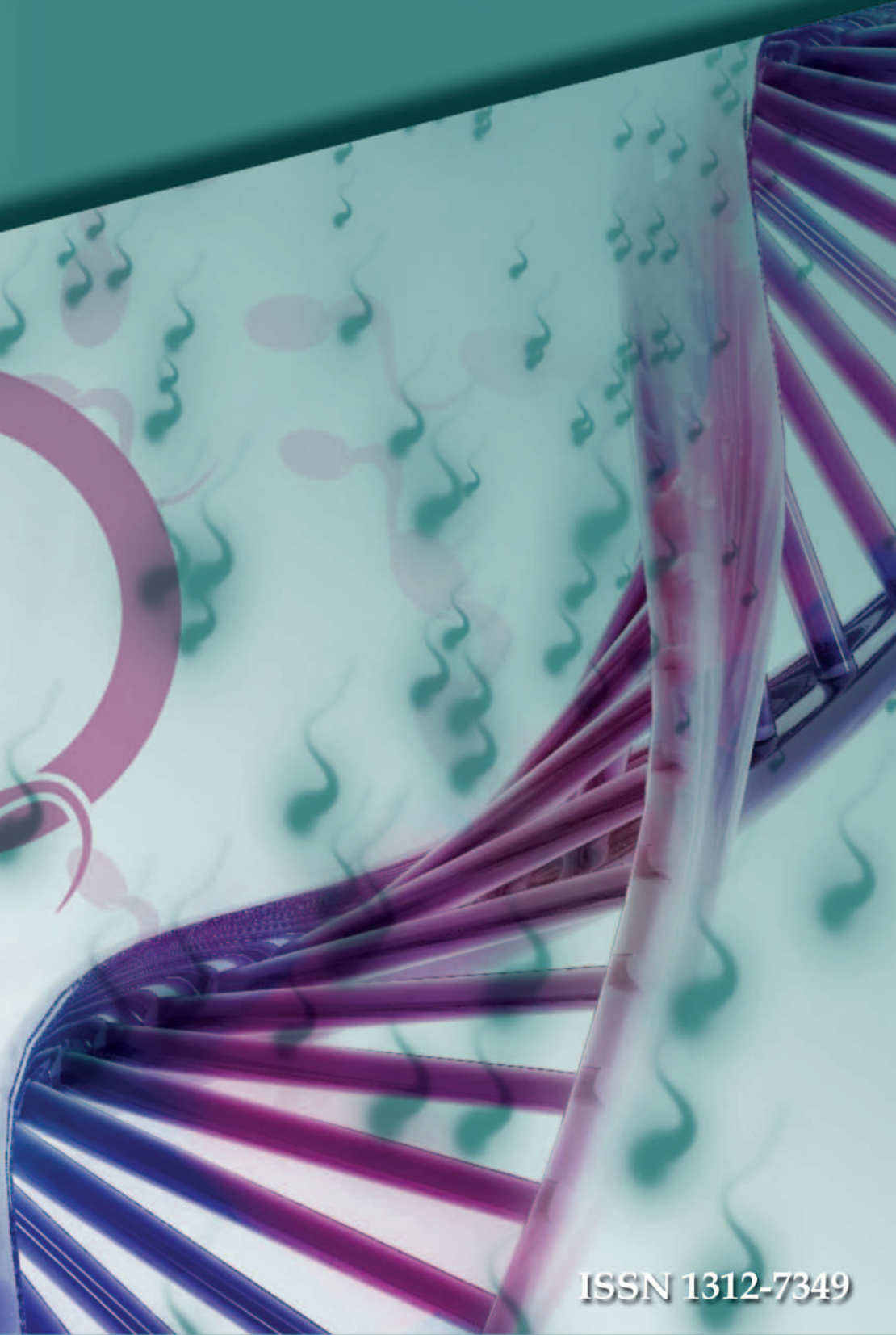


ЕМБРИОЛОГИЯ

Embryology



ISSN 1312-7349

ИЗДАВА БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ
ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ

ТОМ 3 КНИЖКА 1
2008

**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

Производител:
So.Se.PHARM - Италия
Представителство
МЛД Трейдинг ЕООД



СЪДЪРЖАНИЕ:

Компютърно - асистиран спермален анализ (CASA) - предимства и недостатъци 4

М. Стоянова, Д. Гуленова, Г. Николов

Криоконсервация на хематопоеични стволови клетки от пъпна връв - нашият опит 10

П. Тодоров, Н. Петрова, Д. Гуленова, А. Михова, С. Константинов, Й. Димитров

Новини от световната мрежа 18

П. Тодоров, Г. Николов

CONTENTS:

Computer - assisted semen analysis (CASA) - advantages and weaknesses 4

M. Stoyanova, D. Gulenova, G. Nikolov

Cryopreservation of cord blood hematopoietic stem cells - our experience 10

P. Todorov, N. Petrova, D. Gulenova, A. Mihova, S. Konstantinov, Y. Dimitrov

News from the Internet 18

P. Todorov, G. Nikolov

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

СЕРТИФИКАЦИЯ НА ЕМБРИОЛОЗИТЕ В ЕВРОПА

Редакционна статия

Методът за ин витро оплождане и ембриотрансфер (IVF/ET) бе разработен и успешно внедрен в клиничната практика благодарение на усилията и взаимодействието между опитни клиницисти и специалисти в областта на клетъчното култивиране. В последните години IVF се наложи като рутинна медицинска подспециалност в много страни, включително и в България.

От друга страна, поради липсата на специализирано обучение, ембриологичните аспекти на IVF бяха усвоявани и прилагани от хора с различни специалности, включително от такива, нямащи необходимите теоретични познания и практически опит за лабораторна работа. Основните техники биваха усвоявани по пътя на "последователството" (отношенията "майстор-чирак") или дори чрез самообучение, в много случаи при отсъствието на каквато и да било научна основа. Развитието на биотехнологиите и внедряването на нови техники за асистирана репродукция (ICSI, PGD и др.) повиши изискванията към квалификацията на лицата, извършващи лабораторната дейност. Успеваемостта на метода стана още по-силно зависима от научните познания, компетентността и практическите умения на ембриолозите. В този аспект стана важно тези, които са отдадени на постигането на високи професионални стандарти, да бъдат сертифицирани, за да може да се покаже тяхното ниво на познание и способности.

Нуждата от утвърждаване на професионалния статус на клиничните ембриолози и създаването на стандарти за работа в интернационален план вече е императивна. През 2006 г. Изпълнителния комитет на Европейската Асоциация по човешка репродукция и ембриология (ESHRE), под ръководството на предишния Председател Арне Сунде (Arne Sunde), създаде работна експертна група, която бе натоварена да изготви схема за сертифициране на клиничните ембриолози в страните от ЕС. Целта е да се сертифицират познанията и уменията на ембриолозите и да се формализира статута на клиничните ембриолози по аналогия на схемата, създадена от ESHRE съвместно с EBCOG (European Board

and College of Obstetrics and Gynaecology) за лекарите.

Основното в създадената система са две нива на компетентност – "старши ембриолог" и "клиничен ембриолог" и три насоки за сертифициране:

1. първоначално сертифициране на най-опитните специалисти, т.нар. "старши-старши ембриолози" – тези, които завеждат лаборатории, имат доказан стаж повече от 10 години в областта на IVF и съответстват на редица други критерии;
2. редовно сертифициране на "старши ембриолози";
3. редовно сертифициране на "клинични ембриолози"

Процесът на сертифициране на ембриолозите започна през 2007 г. Първоначалното сертифициране на водещите ембриолози - експерти в областта на IVF (senior senior embryologists) вече завърши. Бяха признати кандидатурите на общо 441 ембриолози от ин-витро центрове от цяла Европа, ключително и на двама от България – доц. Пламен Тодоров и д-р Георги Николов, а също така и на доц. Матей Андонов, който в момента работи в Обединеното Кралство и също така е член на Българската Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология (БАРЧЕ). Друг почетен член на БАРЧЕ с подобно признание е и д-р Кристина Магли от Италия.

В момента сертификацията на ембриолозите продължава. От тях се изисква да притежават основни знания и умения, да демонстрират своето експертно ниво и квалификация. Сертификацията се извършва на базата на представени официални документи и провеждане на изпит по специалността от създадена за целта комисия. През 2008 г. изпитът бе проведен в рамките на годишния Конгрес на ESHRE в Барселона, Испания. Следващият планиран изпит е през 2009 г. в Амстердам. Необходимите упътвания и документи могат да бъдат изтеглени от сайта на ESHRE. Пожелаваме успех на всички колеги, кандидатстващи за сертификация.

КОМПЮТЪРНО - АСИСТИРАН СПЕРМАЛЕН АНАЛИЗ (CASA) - ПРЕДИМСТВА И НЕДОСТАТЪЦИ

М. Стоянова, Д. Гуленова, Г. Николов
Медицински Център "РепроБиоМед" ООД - София

COMPUTER - ASSISTED SEMEN ANALYSIS (CASA) - ADVANTAGES AND WEAKNESSES

M. Stoyanova, D. Gulenova, G. Nikolov
Medical Center "ReproBioMed" Ltd - Sofia

Резюме: Един от основните тестове за определяне на мъжката плодовитост е спермалният анализ. Той включва изследване на обема на еякулата, рН, цвят, мирис, вискозитет, наличие на коагулуми и аглутинации, определяне концентрацията на сперматозоидите в семенната течност, тяхната подвижност и морфология според критериите на Световната Здравна Организация от 1999 г. Стандартното изследване е субективно и поради това резултатите от него се отличават с широка вариабилност. Именно това е една от причините да бъде разработен компютърно-асистирания спермален анализ (CASA), който има претенциите да бъде по-обективен, бърз, качествен и детайлен. Чрез настоящата обзорна статия ще бъдат разгледани основните принципи на CASA-технологията и ще бъдат дискутирани нейните предимства и недостатъци.

Abstract: Semen analysis is virtually the first test for the evaluation of male fertility. Traditionally, sperm analysis is based on the measurement of volume, pH, color, aspects, sperm agglutination, concentration, motility and morphology according to the World Health Organization criteria (WHO, 1999). Standard semen analysis is a rather subjective technique and associated with large inter-laboratory variation. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) has been introduced in the lab-routine to improve the accuracy of data collection, to avoid errors due to subjective evaluation of different technicians and to reduce time in the exam performance. This review will discuss the basic principles of the CASA technology and its advantages and weaknesses.

Въведение

Статистически анализи сочат, че една на всеки седем-осем двойки, които правят опити да имат дете, не постигат успех през първата една година. Установено е, че в около 50% от случаите това се дължи на мъжки субфертилитет или стерилитет. Основен метод за определяне на мъжката фертилност е изследване качеството на прясно еякулирана семенна течност⁽¹⁾, която се състои от сперматозоиди и семенна плазма, съдържаща секрети на тестисите (2-5%), семенните везикули (65-75%), простатата (25-30%) и булбoureтралните жлези (<1%)⁽²⁾.

Още в началото на 19^{ти} век е било установено, че сперматозоидите играят основна роля при оплождането. Въпреки това, до средата на 50^{те} години на миналия век, все още не се е предполагало, че съществува пряка връзка между качеството на семенната течност и мъжката плодовитост. Въз основа на научни изследвания тогава е било установено, че в еякулата на 75% от фертилините мъже се съдържат повече от 20

милиона сперматозоиди в един милилитър. От този момент все повече започва да се развива идеята, че съществува зависимост между качеството на семенната течност и мъжката фертилност.

Качеството на семенната течност се определя чрез т.н. спермален анализ. Той включва изследване физико-химичните свойства на еякулата (обем, цвят, мирис, вискозитет, рН), определяне концентрацията на сперматозоидите, съдържащи се в него, тяхната подвижност и морфология⁽³⁾. Нормите за всеки един изследван параметър са определени от Световната Здравна Организация (WHO, 1999)⁽⁴⁾.

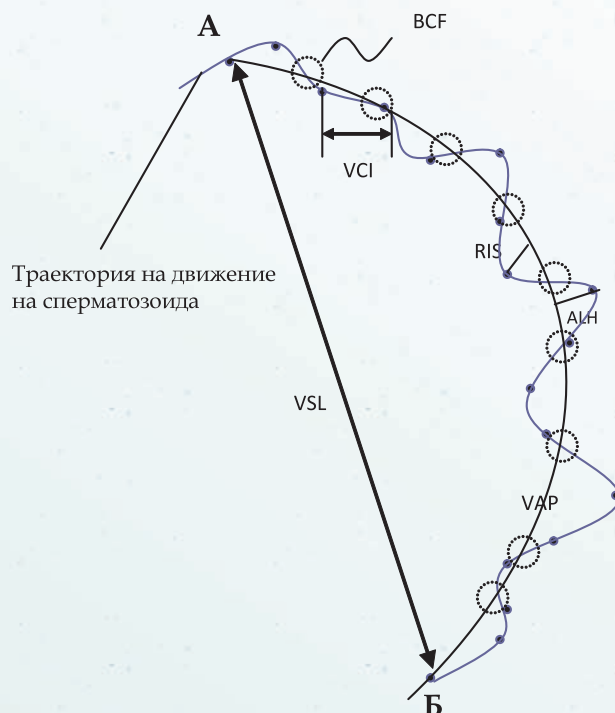
Основен недостатък на стандартния спермален анализ е неговата субективност, тъй като резултатите пряко се влияят от опита и старанието на специалиста, осъществяващ анализа^(3,5,6). Поради това за по-обективно, прецизно и детайлно изследване качеството на семенната течност е разработен т.н. компютърно-

асистиран спермален анализ (CASA).

CASA е технология, чрез която, с помощта на специално създаден за целта софтуер, може да се определи концентрацията на сперматозоидите в еякулата, детайлно и обективно да се характеризира траекторията на движение, скоростта и морфологията на всеки сперматозоид ^(1,2,4,5). Този вид анализ изисква наличието на фазово-контрастен микроскоп, камера за броене на клетки (Makler, Neubauer, Bürker и др.), компютър, видеокамера, свързана с микроскопа и принтер. Чрез видеокамерата и с помощта на софтуера всеки сперматозоид се регистрира, след което в рамките на една секунда автоматично се записват 25 последователни кадъра на едно и също видимо поле. Ако даден сперматозоид заема различно местоположение при отделните кадри, то той се определя като подвижен, а ако не променя своята позиция – като неподвижен. Скоростта на подвижните сперматозоиди софтуерът изчислява на базата на промяната на положението им. Същевременно, чрез CASA могат да се характеризират кинетични параметри като честота на движение на спермалната опашка, латерално изместване на главичката и др. (Табл. 1, Фиг. 1) ^(1,7), които не могат да бъдат определени чрез стандартния спермален анализ.

CASA все повече намира приложение в областта

на диагностиката на мъжкото безплодие. Необходимо е обаче да се знае, че този тип спермален анализ притежава както предимства, така и недостатъци.



Фиг.1: Схематично представяне на кинетичните параметри, характеризиращи движението на сперматозоидите (вж. Табл. 1 относно използваните символи)

Символ	Наименование	Дефиниция
VSL	Скорост на праволинейно движение	Средна скорост на сперматозоида за изминаване на разстоянието между т.А и т.Б по права линия
VCL	Скорост на криволинейно движение	Средна скорост на сперматозоида за изминаване на разстоянието между т.А и т.Б по реалната му траектория
VAP	Скорост за изминаване на средно разстояние	Средна скорост на сперматозоида за изминаване на разстоянието между т.А и т.Б по средно изчислената му траектория
LIN	Индекс за линейност	Линейност на реалната траектория на движение на сперматозоида
WOB	Индекс за осцилация	Степен на осцилация на реалната траектория на сперматозоида спрямо неговата средно изчислена (VSL/VCL)
STR	Индекс за праволинейност	Праволинейност на средно изминатото от сперматозоида разстояние между т.А и т.Б (VSL/VAP)
ALH	Средна ампл. на латерално движение на главичката	Средна амплитуда на изместване на главичката в ляво и дясно спрямо средно изчислената траектория на движение на сперматозоида
RIS	Отклонение	Разстоянието от реалната до средно изчислената траектория на движение на сперматозоида
BCF	Честота на пресичане	Честота, с която реалната и средно изчислената траектории на движение на сперматозоида се пресичат

Предимства на компютърно-асистиран спермален анализ

Както бе споменато, чрез CASA се постига обективно и детайлно анализиране движението и скоростта на всеки един сперматозоид, както и се изследват кинетични параметри, които не е възможно да бъдат определени чрез стандартния спермален анализ. Поради това компютърно-асистиран спермален анализ намира приложение в научни изследвания, свързани с изучаване процеса на хиперактивация на сперматозоидите ⁽⁸⁾, определяне влиянието на различни фактори върху подвижността им ^(2,9,10), изследване зависимостта между отделните кинетични характеристики на сперматозоидите и оплодителната им способност ^(3,10).

Някои изследователи смятат, че на базата на тези характеристики, определени с помощта на CASA, би могъл да се предвиди фертилизационния потенциал на сперматозоидите и успеваемостта на даден "ин витро" цикъл. Това твърдение се основава на данни, че дадени движения на сперматозоидите, като например преминаването им през цервикалния канал и прикрепването им към zona pellucida на овоцита, играят важна роля в процеса на оплождане. Въпреки това приносът на CASA за прогнозиране изхода от един "ин витро" цикъл все още е спорен и понастоящем е предмет на множество дебати ^(1,12,13,14,15).

Друго предимство на компютърно-асистиран спермален анализ е акуратното и прецизно определяне морфологията на сперматозоидите, след като последните бъдат подходящо оцветени. Софтуерът предоставя детайлна информация за формата и размерите на главичката, големината и разположението на акрозомата, ширината и ъгъла на свързване на шийката на всеки един анализиран сперматозоид ⁽¹⁶⁾.

Повечето CASA-системи позволяват коригиране на направените от софтуера измервания, ако това е необходимо, с цел елиминиране на грешки и съответно подобряване качеството на анализа. Също така, въз основа на записаните от системата кадри, е възможно повторение на спермалния анализ и оценка на точността му ⁽⁸⁾.

Недостатъци на компютърно-асистиран спермален анализ

Съществуват много и различни мнения относно прецизността на резултатите, получени при компютърно-асистиран спермален анализ, което обяснява факта, че въпреки всички предимства, до момента CASA не се е превърнал в стандартен за всяка андрологична лаборатория метод ⁽¹⁾. Безспорно този тип технология

притежава предимства, но и недостатъци, които се предполага, че в бъдеще ще бъдат преодоляни и ще спомогнат за утвърждаването на CASA като стандарт за спермален анализ ^(1,3,8,9).

Един от тези недостатъци е неточното определяне концентрацията на сперматозоидите в присъствие на детрит или при наличие на много голям брой сперматозоиди в еякулата. В последния случай, поради високата концентрация, софтуерът не успява да регистрира всички гаметите, както и да ги класифицира правилно според подвижността им. При тежка олигозооспермия, от друга страна, често броят на сперматозоидите в 1 мл еякулат, изчислен от CASA-програмата, е по-висок от реалния. Това се дължи както на типа използвана камера за броене на клетки, така и на факта, че софтуерът в много от случаите разпознава детритните частици като сперматозоиди ^(1,9). За преодоляване на този проблем производителите на системите за компютърно-асистиран спермален анализ наблягат на необходимостта от фина настройка, както на фазово-контрастния микроскоп, така и на самия софтуер, което, обаче, изисква от потребителите добри базисни познания относно устройството и работата с микроскоп, както и добра компютърна грамотност ⁽⁹⁾.

Факт е, че системите за компютърно-асистиран спермален анализ изискват скъпо оборудване, което не всяка лаборатория може да си позволи. Необходимо е провеждане на обучение за специалистите, работещи с апаратурата, както и набавянето от производителите на специфичните за всяка една система химични реактиви и консумативи, нужни за извършването на спермалния анализ ⁽¹⁷⁾.

Друг недостатък е, че при морфологичния анализ повечето CASA-системи не определят морфологията на опашката на сперматозоидите, което предполага допълнително анализиране извън системата и съответно повече усилия и време за извършване на спермалния анализ ^(17,18).

Въз основа на недостатъците, които CASA-системите притежават, през 1998 г. Европейското Дружество по Човешка Репродукция и Ембриология (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE) публикува "Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa" - ръководство, в което се посочват основни напътствия и препоръки както за потребителите, така и за производителите на системи за компютърно-асистиран спермален анализ ⁽¹⁷⁾. За

подобряване качеството на работа с CASA, основен акцент се поставя върху необходимостта от предоставяне от производителите на квалифицирано обучение на специалистите, които ще използват техния продукт, с цел разбиране механизма на работа на конкретната CASA-система, а също и придобиване на подходящите технически умения за работа с апаратурата. Препоръчва се CASA-производителите да насочат своите усилия към разработване на "по-интелигентни" софтуери за спермален анализ, които да спомогнат за преодоляване слабите страни на CASA-системите.

Друг важен акцент се поставя върху необходимостта от осъществяване на контрол на качеството (QC) на направения от системата спермален анализ. Всяка лаборатория, която работи с CASA, трябва да притежава QC процедури, чрез които да се постигне това ^(17,19). Най-често контролът се осъществява от специалист, който, независимо от системата, извършва вторичен спермален анализ, след което се сравняват и оценяват получените при двата анализа резултати. Препоръчва се, също така, направените от системата записи да бъдат повторно прегледани, за да се установи дали софтуерът правилно е регистрирал и анализирал сперматозоидите и ако е необходимо и системата позволява, да бъдат направени съответните корекции ^(1,8,17).

От 1996 г. ESHRE организира работни срещи, на които специалисти споделят своя опит и отправят препоръки, свързани с компютърно-асистиран спермален анализ. Обобщение на тези срещи се публикува във водещи списания от областта на репродуктивната медицина и ембриология, като с това се цели да се помогне на работещите с CASA да подобрят качеството на анализа, но и да се дадат необходимите насоки на производителите за усъвършенстване на разработваните от тях системи.

Нашият опит

От шест месеца екипът ни работи със система за компютърно-асистиран спермален анализ, наречена ISAS[®] (Integrated Semen Analysis System), която е разработена от испанската компания Projectes i Serveis R+D S.L. Тази система включва четири аналитични модула:

- подвижност на сперматозоидите,
- концентрация,
- морфология и
- ДНК-фрагментация (SDI).

Определянето подвижността на сперматозоидите е базирано на описаните вече в настоящия обзор

основни принципи на действие на CASA-системите. 10 μ l нативен еякулат се накапват в камера за броене на клетки - препоръчано от производителя на ISAS е използването на Makler, Neubauer и Bürker камери (според нашите наблюдения най-добри резултати при ISAS-системата се постигат при използване на камера Makler). В рамките на една секунда, с помощта на видеокамера, прикрепена към фазово-контрастен микроскоп, се заснемат 25 кадъра. Сперматозоидите се анализират и класифицират по подвижност, скорост и кинетични характеристики в зависимост от нормите, определени от Световната Здравна Организация ⁽⁴⁾. Предимство на ISAS е възможността да се правят корекции при анализа в случаи на неправилно класифициран или нерегистриран сперматозоид, а също и премахване от анализа на разпознати като сперматозоиди детритни частици. Компанията Projectes i Serveis R+D S.L. е намерила решение за преодоляване на проблема с неточното отчитане концентрацията на сперматозоидите. Това тя постига чрез добавяне на допълнителен модул при ISAS системата, който служи за определяне броя на сперматозоидите в един милилитър нативен еякулат. Необходимо е предварително обездвижване на гаметите с помощта на химични реактиви, след което 10 μ l от суспензията еякулат/реактиви се накапват върху Makler-камера за броене на клетки и се анализират чрез ISAS. В някои случаи е възможно освен сперматозоиди да бъдат регистрирани и детритни клетки, но това може да се коригира ръчно от оператора, работещ със системата.

За определяне морфологията на сперматозоидите с помощта на системата за компютърно-асистиран спермален анализ ISAS, е необходимо те да бъдат подходящо оцветени, така че системата да може да разграничи главичката, акрозомата и шийката на всеки един анализиран сперматозоид ⁽²⁰⁾.

Набавянето на препоръчания от производителя оцветител се оказва изключително трудно, което наложи заместването му с друг реагент. Бе необходим около един месец, за да се установи най-подходящия за целта оцветител, както и за оптимизиране методиката на оцветяване на сперматозоидите така, че тяхната морфология да бъде коректно анализирана от ISAS. Най-добри резултати бяха постигнати при използване на Hemacolor[®] staining set (Merck Cat. № 1.11661).

След като софтуерът разпознае главичката, акрозомата и шийката, той ги оцветява в различни цветове, така че да може да се

визуализира начина, по който системата е възприела морфологията на отделните части на сперматозоидите. Дава се пълна информация относно формата и размерите на всяка една от тях, както и се прави класификация на сперматозоидите според типа патология, която е установена, съгласно стриктните критерии на Крюгер ⁽²¹⁾.

И при този модул е възможно при нужда да бъдат направени необходимите корекции на неточно определени морфологични характеристики. Както и при други CASA-системи, така и при ISAS един от недостатъците е невъзможността за определяне морфологията на опашката. В същото време производителът Projects i Serveis R+D S.L. уверява, че в момента се разработва нова версия на софтуера, която ще позволи осъществяването на пълен морфологичен спермален анализ.

Успоредно с определяне подвижността, концентрацията и морфологията на сперматозоидите, чрез ISAS е възможно изследване степента на интегритет на спермалната ДНК (SDI). Сперматозоидите се обработват предварително с Halosperm[®] kit (Halotech-DNA SL.), в резултат на което ДНК се денатурира, лизират се хистоновите белтъци, поддържащи ДНК нагъната и компактизирана; ДНК на сперматозоидите се разплита и се формират специфични ДНК-ови бримки около главичката на сперматозоида, подобно на ореол, които след оцветяване се визуализират лесно ⁽²²⁾. За определяне наличието на ДНК-фрагментация е необходимо да се анализира ширината на този ореол. Това се извършва с помощта на ISAS-софтуера. Анализът може да се осъществи чрез използване на фазово-контрастен или флуоресцентен микроскоп. Колкото по-широк е ореола, толкова по-нисък е процента на фрагментиралата спермална ДНК.

В началните етапи на работа с ISAS особени трудности изпитахме при оптимизиране настройките на фазово-контрастния микроскоп и софтуера. След проведено от фирмата производител обучение бяха установени оптималните параметри на работа с ISAS-системата и бяха постигнати много добри резултати свързани с качествено осъществяване на анализа. Понастоящем всеки един спермален анализ, осъществен от нашия екип с помощта на ISAS-системата, преминава през верифициращи QC-процедури с цел контрол на качеството му. Въз основа на това смеем да твърдим, че ISAS-системата за компютърно асистиран спермален анализ

предоставя детайлно и сравнително точно определяне скоростта, концентрацията, морфологията и интегритета на ДНК на сперматозоидите. В някои случаи е необходимо да се направят корекции на анализа, осъществен от системата, но често те са незначителни и не оказват съществено влияние върху крайните резултати, получени чрез ISAS.

Заклучение

CASA има множество предимства пред стандартния спермален анализ, но също и много слаби места. Критиките, отправяни към тези системи, най-вече относно акуратността на получените резултати са оправдани, но не трябва да се забравя, че и стандартният спермален анализ невинаги се характеризира с особена точност и качеството му се влияе от множество фактори. Производителите непрекъснато се стремят да подобряват разработваните от тях системи и твърдят, че не е далеч времето, когато CASA ще се утвърди като базисна технология за извършване на спермален анализ.

Литература

1. Gardner D.K., Weissman A., Howles C.M., Shoham, Z. In: *Textbook of Assisted reproductive Techniques, 2nd Edition, Taylor & Francis Group; 2004, p.65-78*
2. Zeilmaker G.H. et al. Laboratory aspects of in-vitro fertilization. *N.V.Organon, 1996*
3. Larsen L., Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from general population. *Hum Reprod, 2000; 15(7): 1562-1567*
4. World Health Organization (1999): *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edition, Cambridge University Press, Cambridge*
5. Comodo F., Inaudi P., Petrilli S., D'Antona N. Manual versus computer-automated sperm analysis (CASA). Comparison between Makler chamber, ATS 20 and SQA system. *Med assist procreat, 2000*
6. Davis R.O., Niswander P.W. and Katz D.F. New measures of sperm motion. *J Androl, 1992; 13: 139-152*
7. Jorgensen N., Auger J., Giwercman A. Semen analysis performed by different laboratory teams: an inter-variation study. *Int J Androl, 1997; 20: 201-208*
8. Geyter Ch.De., Geyter M.De., Koppers B., Nieschlag E. Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum Reprod, 1998; 13(9): 2512-2520*
9. Kraemer M., Fillion C., Martin-Pont B., Auger, J. Factors influencing human sperm kinematics measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum Reprod, 1998; 13(3): 611-619*
10. Mbizvo M.T., Johnson R.C., Baker, G.H.W. The effect of the motility stimulants, caffeine, pentoxifylline and 2-deoxyadenosine on hyperactivation of cryopreserved human sperm. *Fertil Steril, 1993; 59: 1112-1117*
11. Sukcharoen N., Keith J., Irvine S.D., Aitken, R.J. Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated human spermatozoa at 25Hz using in vitro fertilization as a functional end-point. *Hum Reprod, 1995; 10: 2928-2937*

12. Barratt C.L.R., Tomlinson M.J., Cooke, I.D. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertil Steril*, 1993; 60: 520-525
13. Andersen A.G., Ziebe S., Jorgensen N., Petersen J.H., Skakkebaek N.E., Nyboe Andersen A. Time to pregnancy in relation to semen quality assessed by CASA before and after sperm preparation. *Hum Reprod*, 2002; 17(1): 173-177
14. Paston M.J., Sarkar S., Oates R.P., Computer - aided semen analysis variables as predictors of male fertility potential. *Archs Androl*, 1994; 33: 93-99
15. Irvine D.S., Macleod I.C., Templeton A.A. A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Hum Reprod*, 1994; 9: 2324-2334
16. Davis R.O., Bain D.E., Siemers R.J. Accuracy and precision of the CellForm-human automated sperm morphometry instrument. *Fertil Steril*, 1992b; 58: 763-769
17. ESHRE Andrology Special Interest Group. Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Hum Reprod*, 1998; 13(1): 142-145
18. ESHRE Andrology Special Interest Group. Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. *Hum Reprod*, 1996; 11: 1463-1479
19. Clements S., Cooke I.D., Barratt, C.L.R. Implementing comprehensive quality control in the andrology laboratory. *Hum Reprod*, 1988; 10: 2096-2106
20. Soler C., Gadea B., Soler A.J., Fernández-Santos M.R. Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS®. *Theriogenology*, 2005; 64(5): 1236-1243
21. Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S.H., Lombard C.J. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1986; 46: 1118-23
22. Fernandez J.L., Muriel L., Goyanes V. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*, 2005; 84(4): 833-842

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА ХЕМАТОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ ПЪПНА ВРЪВ - НАШИЯТ ОПИТ

П. Тодоров^{1,4}, Н. Петрова¹, Д. Гуленова¹, А. Михова², С. Константинов³, Й. Димитров⁴

¹ Институт по биология и имунология на размножаването - БАН, София

² Централна лаборатория по имунология, НЦЗПБ, София

³ Факултет по фармация, МУ, София

⁴ Ин витро АГ Медицински център "Димитров", София

CRYOPRESERVATION OF CORD BLOOD HEMATOPOIETIC STEM CELLS - OUR EXPERIENCE

P. Todorov^{1,4}, N. Petrova¹, D. Gulenova¹, A. Mihova², S. Konstantinov³, Y. Dimitrov⁴

¹ Institute of Biology and Immunology of Reproduction - BAS, Sofia, Bulgaria

² Central Laboratory of Immunology, NCIPD, Sofia, Bulgaria

³ Faculty of Pharmacy, MU, Sofia, Bulgaria

⁴ Center for Human Reproduction "Dimitrov", Sofia, Bulgaria

Резюме: Криобанката за стволови клетки, репродуктивни клетки и тъкани към Ин витро АГ Медицински Център "Димитров" функционира от ноември 2006 г. Дейността ѝ е съобразена с действащите нормативни актове и се регулира и контролира от Изпълнителната агенция по трансплантация (ИАТ). Банката е оборудвана със съвременна апаратура, съответстваща на общоприетите световни стандарти. Получаването, обработката, програмното замразяване и съхранението на стволовите клетки се осъществява на базата на МБАЛ "Света София" съгласно стандартните оперативни процедури (СОП). Имунофенотипизирането се извършва в Централната лаборатория по имунология към НЦЗПБ.

До момента са обработени и съхранени 237 проби от умбиликална кръв на новородени. Средния обем взета кръв е 93.4 мл (42 - 166 мл), а средния процент CD34+ клетки е 0.42 (от 0.11 до 1.56%). Осемдесет и девет процента от хематопоетичните стволови клетки запазват своята виталност след криоконсервация, както и колонии-образуващата си активност.

Abstract: The stem cells cryobank in Center for Human Reproduction "Dimitrov" is established in November 2006. It operates in accordance with the legal regulations enforced and is under the control of the EAT. The bank is supplied with modern equipment, corresponding with the world's current standards. The obtaining, processing, programme freezing and storage of the stem cells is carried out in "Sveta Sofia" hospital in compliance with the standard operating procedures. The immunophenotyping is performed in Central Laboratory of Immunology, NCIPD.

Until now, there are 237 samples of cord blood processed and stored in the cryobank. The average volume of the obtained umbilical cord blood is 93.4 ml (42 - 166 ml) and the average percentage of CD34+ cells is 0.42 (from 0.11 to 1.56%). Eighty-nine percent of the hematopoietic stem cells retain their viability after cryopreservation, as well as their colony-forming activity.

The data analysis shows that the obtained cord blood volume, percentage of stem cells and their viability after thawing are close to the results reported by world's leading cryobanks.

Въведение

Трансплантацията на хематопоетични стволови клетки (ХСК) се използва с успех при лечението на редица заболявания. Тези клетки се характеризират със способността си за самообновление и диференциация във всички типове зрели кръвни клетки. Отличават се с ниска

експресия на общия левкоцитен маркер CD45 и висока експресия на CD34. Основен източник на ХСК за трансплантация са костният мозък, слезката и периферната кръв. В последните години все повече внимание се обръща на алтернативни източници на ХСК, а именно феталният черен дроб и умбиликална кръв⁽¹⁻³⁾.

Умбиликалната кръв, притежава ред преимущества като източник на ХСК:

- Количеството ХСК в нея многократно превишава това в периферната кръв, като те се характеризират с по-големи пролиферативни възможности и броят на колонии-образуващите предшественици на кръвните клетки е значително по-голям. Умбиликалните ХСК имат по-висок потенциал за експанзия след трансплантация. Характерно за тях е, че те съдържат фракция на ендотелните прогенитори и участват в неоваскуларизацията, а също така се характеризират с понижена склонност за апоптоза ^(4,5);
- Получаването на умбиликална кръв е бърза и безболезнена процедура;
- Има възможност за дълготрайно съхранение както на автоложни, така и на родствени и неродствени алогенни проби, тествани, HLA-типизирани и готови за непосредствено използване;
- По-слаба е вероятността за проява на остра и хронична форма на реакция трансплантант-реципиент. Възможно е осъществяването на трансплантации при непълна HLA-съвместимост ⁽⁶⁾;
- Малка е вероятността от вирусна контаминация на трансплантанта. По време на бременността майката и плода са подложени на щателни медицински изследвания, даващи възможност да се открият различни инфекции и потенциално опасни гени и фактори за предразположенност;
- Възможно е получаването на дози от представители на редки етнически групи, деца от смесени бракове и др.

Стволовите клетки от пъпна връв имат едно (освен всички други) неоспоримо преимущество – абсолютната генетична идентичност с тъканите на детето, от чиято пъпна връв са получени. В този аспект съхранението на клетки от пъпна връв може да се разглежда като форма на биологична застраховка, защото:

- веднъж получени, могат да се съхраняват десетилетия;
- в случаи на необходимост трябва само да се размразят, без да се губи ценно време за търсене (често безуспешно) на съвместим донор;
- цената за съхранение на стволовите клетки от пъпна връв е десетки пъти по-ниска от тази, необходима за закупуване на донорски.

През 1988 г. във Франция е осъществена първата в света трансплантация на стволови клетки от кръв

от пъпна връв. Пациентът е 5-годишно дете с диагноза “Анемия на Фанкони”. Използвани са стволови клетки от умбиликална кръв, получена при раждането на сестра му. Впоследствие подобен род трансплантации намират приложение и при лечението на редица други заболявания. В момента банкирането на кръв от пъпна връв се развива успешно в много страни, включително и в България. Според данни от различни източници към началото на 2008 г. в световен мащаб са замразени повече от един милион единици стволови клетки и са проведени между 7,000 и 10,000 трансплантации. У нас услугата се предлага от 2005 г., като в момента няколко центъра са официално регистрирани за извършването на тази дейност.

Криобанката за стволови клетки, репродуктивни клетки и тъкани към Ин витро АГ Медицински Център “Димитров” функционира от ноември 2006 г. Дейността ѝ е съобразена с действащите нормативни актове и се регулира и контролира от Изпълнителната агенция по трансплантация. Банката е оборудвана със съвременна апаратура, съответстваща на общоприетите световни стандарти. Получаването, обработката, програмното замразяване и съхранението на стволовите клетки се осъществява на базата на МБАЛ “Света София” съгласно стандартните оперативни протоколи. Имунофено-типизирането на CD34+ клетките се извършва в Централната лаборатория по имунология към НЦЗПБ.

Пациентите задължително се подлагат на предварителни изследвания и попълват документи съгласно законовите разпоредби ⁽⁷⁾. Задължителните предварителни изследвания на родилката включват *HIV-1 и 2*, *HBsAg*, *HCV*, *Syphilis*. Изследванията следва да бъдат повторени 6 месеца след замразяването на кръвта. Към криоконсервация се пристъпва единствено след попълване на медицинска история на възложителя (анкетна карта), подписване на информирано съгласие от страна на родителите и договор с криобанката.

Получаване на умбиликалната кръв

Събирането на кръв от пъпна връв се осъществява след раждането на бебето и прерязване на пъпната му връв, когато плацентата се намира все още в кухината на матката (*in utero*) или след отделяне на плацентата, а също и по време на операция (Цезарово сечение). При всички случаи се подхожда от позицията на медицинската етика, като на първо място се поставя здравето и безопасността на новороденото. Акушерите не се отклоняват от обичайната практика за водене на

раждането и вземат решение относно възможността за получаване на умбиликална кръв в зависимост от конкретната ситуация и състоянието на майката и новороденото. За събирането на кръвта се използват специални сакове, съдържащи антикоагулант. След получаването на кръвта сакът се етикетира (име на родилката, уникален идентификационен номер, датата и времето на раждане и др. данни) и се предава на криобиолога, който ще осъществи обработката и криоконсервацията на клетките. Ако получената кръв е по-малко от 40 мл, не се пристъпва към замразяване (счита се, че в тези случаи количеството ХСК няма да е достатъчно за успешна трансплантация).

Изследване на получената кръв

На различните етапи от процеса на обработка се извършват изследвания за:

- количество на получената кръв;
- микробиологични изследвания (наличие на аеробни бактерии преди и след замразяване и др.);
- обща кръвна картина (автоматичен анализатор *Systex*);
- количество ядросъдържащи клетки в концентрата;
- морфология на клетките (*TestSimplets-модифицирано оцветяване по Papaniolau*);
- абсолютен брой и процент хематопоетични стволови клетки (*BD FACS Canto, ISHAGE-protocol*)⁽⁸⁾. Нашата лаборатория е единствената в страната и една от малкото в света, в които наред с експресията на CD34+ се изследва и коекспресията на мембранните молекули HLA-DR CD38 и CD61.

За успеваемостта на процеса на криоконсервация се съди по виталитета на клетките в размразената контролна проба (*флуоцитометрично изследване с анексин-5 и пропидиев йодид*) и колонии-образуващата им активност (*дълготрайно култивиране в MethoCult® Methylcellulose-based media за изследване на CFU-E, BFU-E, CFU-GM и CFU-GEMM*)^(9,10). Тези показатели в голяма степен са прогностичен фактор за успеваемостта на евентуална бъдеща трансплантация.

Обработка на кръвта

Желателно е към обработка да се пристъпи веднага след получаване. Ако периодът до началото на обработката е повече от 4 часа (в случаи, когато кръвта е получена в друга болница) кръвният сак се транспортира и съхранява при хладилна температура (за период, не по-дълъг от 24 часа). Клетките се обработват стерилно, в ламинарен бокс. Използват се еднократни консумативи (*cell culture grade*), среди за клетъчно култивиране и вещества, разрешени за клинично използване,

производство на водещи в областта фирми.

Целта на обработката е намаляване на обема на получената кръв чрез отстраняване на кръвната плазма, отделяне на еритроцитите и концентриране на ядросъдържащите клетки. В повечето центрове се практикува замразяване само на нуклеосъдържащите клетки, като по този начин значително се намалява обема на съхраняваните проби. Отделянето на еритроцитите понижава риска от развитието на реакция на несъвместимост, обусловена от еритроцитните антигени. Известно е също така, че в процеса на криоконсервация еритроцитите се разрушават, а продуктите от лизиса могат да са токсични за реципиента. При обработката на кръвта и подготовката и за криоконсервация е важно да се обърне особено внимание на следните фактори:

- Процесът на отделяне на еритроцитите и редукия на обема да не води до значителни загуби на ХСК;
- Сепарирани проби след криоконсервация ще бъдат трансплантирани на пациенти, поради което е необходимо до минимум да се намали токсичността на агентите, използвани при сепарация и замразяване.

Няма общоприет протокол за отделяне на еритроцитите. Това може да стане с помощта на лизиращи разтвори, аглутиниращи вещества, чрез просто центрофугиране, центрофугиране през градиенти, с помощта на филтри или автоматични сепаратори⁽¹¹⁾. В последно време доста широко приложение намират и магнитните сортери.

В нашата практика за утаяване на еритроцитите използваме 6% HES - hydroxyethyl starch (Hemohes, Braun). Отделената фракция ядросъдържащи клетки се промива двукратно чрез центрофугиране в среда X-Vivo-15 (Cambrex). Към утаените клетки (концентрат от ядросъдържащи клетки и известно количество останали еритроцити) се добавя малко количество среда с разчет крайното количество да е не-повече от 25-30 мл.

Замразяване на клетките

Замразяването на клетките е важен етап от цялостната технология за криоконсервация. С цел намаляване на криоуврежданията се използват среди, съдържащи криопротективни вещества. При подбора на криопротекторите следва да се обърне внимание на следните фактори:

- Осмотични увреждания на клетките, възникващи в процеса на насищане или отделяне на криопротектора;

- Химична токсичност на използваните криопротективни агенти по отношение на клетките, а впоследствие и по отношение на реципиента;
- Взаимно влияние на крайната концентрация на криопротектора и скорост на замразяване върху клетките.

Повечето лаборатории използват като криопротектор диметилсулфоксид (ДМСО) в 10% концентрация^(12,13). Клетъчните суспензии се замразяват в сакове или криовиалки. При съблюдаване на необходимите условия, процесът на криоконсервация не влияе съществено върху виталитета на прогениторните клетки. В рамките на сравнителни изследвания е установено, че CD34+ експресиращите клетки са по-толерантни към замразяване в сравнение с другите нуклеосъдържащи клетки⁽¹⁴⁾.

В нашата лаборатория криоконсервацията се извършва в 5 мл криовиалки (GreinerBioOne) с помощта на програмен замразител (ConsArctic). При температура -6° С се извършва пресидинг, сидинг и постсидинг с цел избягване преохлаждането на разтвора. Използваме следния режим на замразяване:

1. Фракцията ядросъдържащи клетки се охлажда до температура 2-4° С.
2. Клетъчната суспензия се разрежда в съотношение 1:1 със среда за криоконсервация, съдържаща 20% диметилсулфоксид (ДМСО) и 10% HSA. Крайната концентрация на ДМСО в разтвора за замразяване е 10%. За предпазване от осмотични и химични увреждания охладената криопротективна среда се добавя към клетките стъпково, при непрекъснато разбъркване на суспензията.

3. Разредените с криопротективен разтвор клетки се поставят в предварително етикетирани 5 мл криовиалки. Известно количество клетки се поставят в 2 мл криовиалка – за контролно размразяване.
4. Криовиалките се поставят в предварително охладената до 4° С камера на програмния замразител.
5. След 5-минутен престой при 4° С (необходим за еквилибрация на клетките с криопротектора) се пристъпва към замразяване.
6. Замразяването е програмно, при следният режим на охлаждане (виж Таблицата).

Съхранение на клетките

С цел избягване на евентуална контаминация при контакта с течния азот, пробите се съхраняват в нискотемпературен фризер (Sanyo) при температура -151° С.

Основни резултати от работата на криобанката до момента

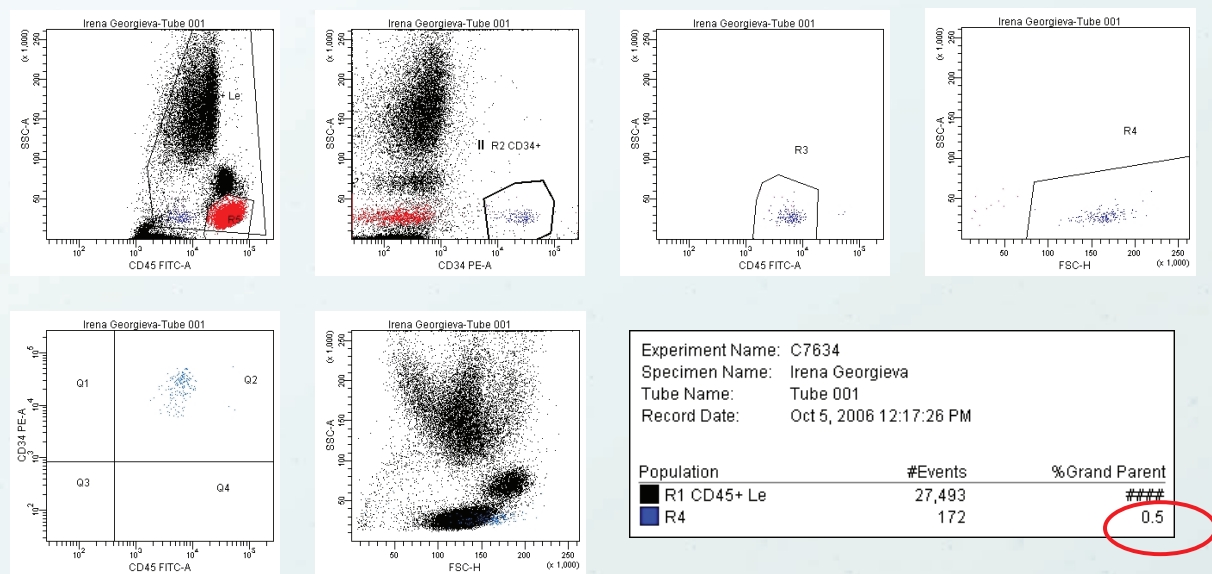
До момента в криобанката е замразена и се съхранява обработена умбиликална кръв от 237 новородени. Средният обем на получената умбиликална кръв е 93,4 мл (42-166 мл). Количеството получена кръв зависи както от физиологични (гестационна седмица, размер на плода, дължина на пъпната връв и др.), така и от технологични фактори – напр. кога се получава кръвта - преди или след отделяне на плацентата. При нормално протичане на раждането е желателно кръвта да се получи преди отделяне на плацентата.

Установено бе, че в процеса на обработка при използваната от нас методика загубата на

Първи етап:	от 4° С до -6° С	охлаждане със скорост 1° С/мин
Втори етап:	при -6° С	3 мин пресидинг сидинг 3 мин постсидинг
Трети етап:	от -6° С до -20° С	охлаждане със скорост 1° С/мин
Четвърти етап:	от -20° С до -43° С	охлаждане със скорост 2° С/мин
Пети етап:	от -43° С до -80° С	охлаждане със скорост 4° С/мин
Шести етап:	от -80° С до -120° С	охлаждане със скорост 10° С/мин
Седми етап:	прехвърляне на криовиалките в течен азот или нискотемпературен фризер (-151° С) за дълготрайно съхранение	

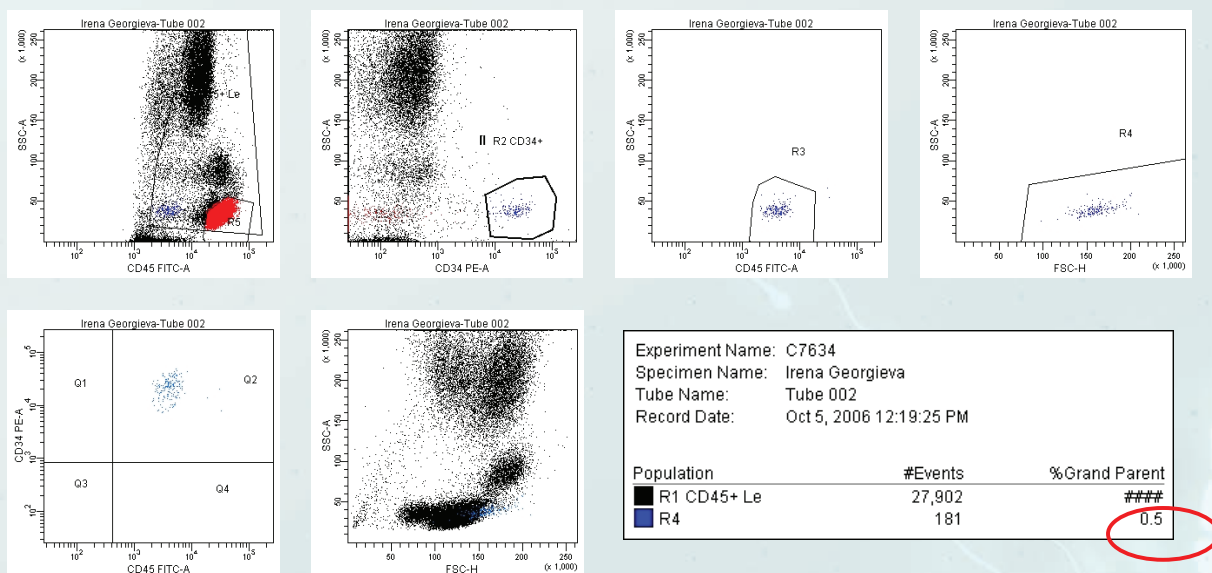
нуклеосъдържащи клетки е 12%. Тези данни са близки до резултатите, получени от други автори, които отчитат загуби от 9 до 16% в зависимост от метода на обработка (15,16). От друга страна, не се наблюдава разлика в процентното съдържание на ХСК (CD34+) на различните технологични етапи. На Фиг. 1 и Фиг. 2 е представено съдържанието на ХСК преди и след обработка на умбиликалната кръв. Средният процент на CD34+ клетки в получените от нас проби е 0,42% (от 0,11 до 1,56%). Повечето

автори установяват съдържание на ХСК в умбиликалната кръв между 0.12 и 0,65% (14). В шест от нашите случаи процентът на CD34+ клетки е по-висок от 1.1% (при референтни граници 0,1-1,1%). Култивирането на клетки от размразените контролни проби показва, че ХСК са запазили и клоногенната си активност (Фиг. 4) След 12-14 дневно инкубиране в 24-ямкови плаки в среда MethoCult GF+ H4435 (StemCellTechnologies) размразените клетки формират колонии, според



Фиг. 1. Флуоцитометричен анализ на необработена кръв - $Le = 10.8 \times 10^9/L$

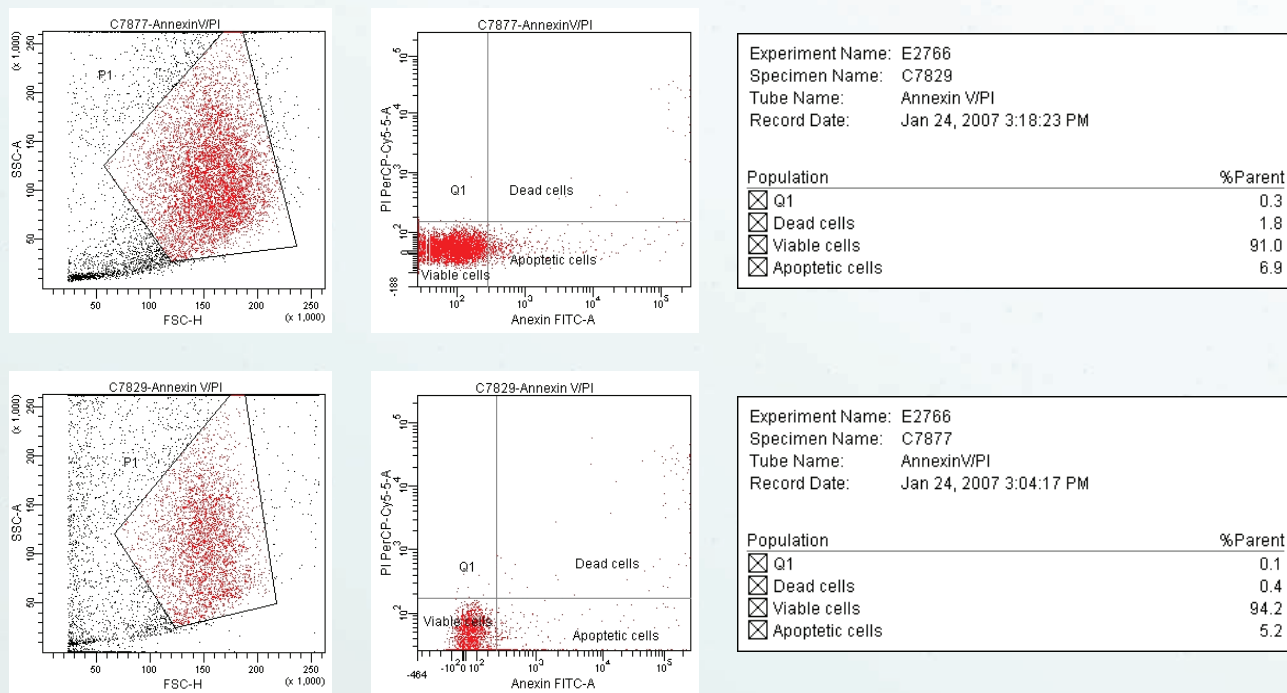
Клетките бяха маркирани по метода лизиране без промиване (LNW) с моноклонални антитела - CD45/FITC и CD34/PE. Анализът на пробите беше извършен на флуоцитометър BD FACSCanto. Събрани бяха по 200 CD34+ клетки/проба. Резултатите бяха обработени на програмата BD Diva ver 5.0.1



Фиг. 2. Флуоцитометричен анализ на обработена кръв - $Le = 46.2 \times 10^9/L$

Клетките бяха маркирани по метода лизиране без промиване (LNW) с моноклонални антитела - CD45/FITC и CD34/PE. Анализът на пробите беше извършен на флуоцитометър BD FACSCanto. Събрани бяха по 200 CD34+ клетки/проба. Резултатите бяха обработени на програмата BD Diva ver 5.0.1

След размразяване 89% от стволовите клетки запазват своя виталитет.



Фиг.3. Виталитет на клетките след размразяване

Флуоцитометричен анализ на степента на апоптоза (с Анексин-5 и пропидиев йодид)

вида на които регистрирахме следните класове хематопоеични прогенитори:

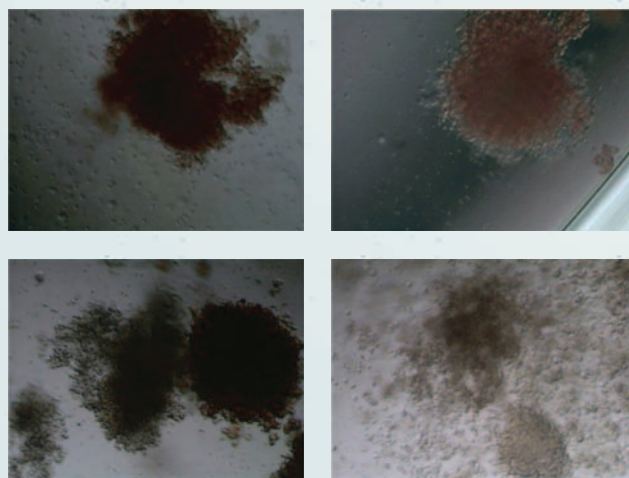
- **CFU-E (Colony-forming unit-erythroid):**
Формират се колонии от 8-200 еритробласта. CFU-E са зрели еритроидни предшественици, които се диференцират в присъствието на еритропоетин.
- **BFU-E (Burst-forming unit-erythroid):**
Продуцират колонии, съдържащи повече от 200 еритробласта (във вид на единични или множествени клъстери). BFU-E са по-слабо диференцирани прогенитори в сравнение с CFU-E.
- **GFU-GM (Colony-forming unit-granulocyte, macrophage):**
Продуцират колонии, съдържащи най-малко 20 гранулоцита (CFU-G), макрофаги (GFU-M) или клетки и от двете линии. GFU-GM колонии, произхождащи от единични прогенитори, могат да съдържат хиляди клетки, организирани в единични или множествени клъстери.
- **GFU-GEMM (Colony-forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte):**
Мулти-потенциални прогенитори, продуциращи колонии, включващи в състава си еритробласти и клетки от поне две други линии. Поради примитивната си природа CFU-GEMM изграждат големи колонии, съдържащи повече от 500 клетки.

Средната честота на колонии в размразените контролни проби бе:

- GFU-E - 11 (2-48)
- BFU-E - 97 (3-270)
- GFU-GM - 61 (7-104)
- GFU-GEMM - 26 (1-53)

В нито една от размразените проби не бяха констатирани случаи на контаминация.

Анализът на данните показва, че полученият обем, абсолютен брой, процент стволови клетки и виталитета им след размразяване са близки до резултатите на водещите световни криобанки.



Фиг.4. Клоногенна активност на ХСК след криоконсервация

Вероятно това е и една от причините за наблюдаващата се тенденция все повече пациенти да ползват услугите на банката за стволови клетки, репродуктивни клетки и тъкани към "Инвитро АГ Медицински център

Димитров". Доказателство за добрата работа на криобанката е и спечелването на единствения по рода си за момента за нашата страна добре финансиран международен проект за изследване в областта на стволовите клетки.

Литература

1. Jennifer G. Umbilical cord cell banking – implications for the future *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005, 207, Suppl. 1: 538-543
2. Allickson J.G. Stem Cells Derived from Cord Blood *Principles of Regenerative Medicine*, 2008: 238-257
3. Brown J.A., Boussiotis V.A. Umbilical cord blood transplantation: Basic biology and clinical challenges to immune reconstitution *Clinical Immunology* 2008, 127: 286-297
4. Neuhoff S, Moers J, Rieks M *et al.* Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro. *Experimental Hematology* 2007, 35: 1119-1131
5. Igreja C, Rita Fragoso R, Francisco Caiado F *et al.* Detailed molecular characterization of cord blood-derived endothelial progenitors *Experimental Hematology* 2008, 36: 193
6. Bradley M.B., Cairo M.S. Cord Blood Immunology and Stem Cell Transplantation *Human Immunology* 2005, 66: 431-446
7. Наредба № 6 от 5 март 2007 г. За утвърждаване на медицински стандарт за трансплантация на органи, тъкани и клетки. Издадена от Министерството на здравеопазването. *Обн. ДВ. бр. 23 от 16 Март 2007 г.*
8. Chin-Yee I, Keeney M., Anderson L. *et al.* Current status of CD34+ cell analysis by flow cytometry: the ISHAGE Guidelines. *Clinical Immunology* 1997, 2/3: 21-44
9. Miller CL, Lai B. Human and mouse hematopoietic colony-forming cell assays. Basic cell culture protocols. *Methods in Molecular Biology* 2005, 290: 71-89
10. Human Colony-Forming Cell Assays Using MethoCult®. *Technical manual*, 20060
11. Тодоров П., Димитров Й., Пандева И. Криоконсервация на кръв от пъпна връв. Технологични аспекти. *Акушерство и гинекология* 2006, 2: 61-64
12. Hunt C.J., Armitage S.E., Pegg D.E. Cryopreservation of umbilical cord blood: tolerance of CD34+ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology* 2003, 46: 76-87
13. Yang H., Zhao H., Acker J.P. *et al.* Effect of DMSO on post-thaw viability assessment of CD45+ and CD34+ cells of umbilical cord blood and mobilized peripheral blood. *Cryobiology* 2005, 51: 165-175
14. Moezzi L., Pourtathollah A., Alimoghaddam K. *et al.* The effect of cryopreservation on clonogenic capacity and in-vitro expansion potential of umbilical cord blood progenitor cells. *Transplantation Proceedings* 2005, 37: 4500-45030
15. Regidor C., Posada M., Monteagudo D. *et al.* Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation: evaluation of cell separation and storage methods. *Exp. Hematol.* 1999, 27: 380-385
16. Thoma S.J., Bosse R., Schultz J. *et al.* Stem cell processing with an automated system. *Abstracts of EBMT Conference, Montreux 2002*

Част от изследванията са проведени в рамките на проект МУ-4/2007 "Comperative study of different methods for isolation, culture, differentiation and cryopreservation of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood", финансиран от Европейския съюз.



Life's beginning – in safe hands

EmbryoAssist™

Improved performance and flexibility



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

НОВИНИ ОТ СВЕТОВНАТА МРЕЖА

П. Тодоров¹, Г. Николов²

¹ *In vitro* АГ Медицински център "Димитров", София

² МЦ "РепроБиоМед" – София

NEWS FROM THE INTERNET

P. Todorov¹, G. Nikolov²

¹ *Center for Human Reproduction "Dimitrov", Sofia, Bulgaria*

² *Medical center "ReproBioMed" Ltd, Sofia, Bulgaria*

38-годишна жена стана първата майка в света след успешна трансплантация на яйчник, съобщава британският вестник "Гардиън". Жената е от германски произход и миналата година е била оперирана в клиника в Сейнт Луис. Тя е получила яйчник от своята сестра-близначка, която вече има две деца. Причина за трансплантацията е поставена диагноза преждевременна яйчникова недостатъчност (POF), когато 38-годишната жена е била още на 15 години. Днес, една година след присаждането на яйчника, тя е родила момиченце с тегло 3,6 кг и дължина 54 см. Раждането е станало с цезарово сечение. Според д-р Шърман Силбър, който е извършил присаждането, процедурата може да помогне на много жени със стерилитет след лечение на рак.

~ ~ ~

Австралийското правителство издаде първия в света лиценз за клониране на човек, събщи Ройтерс. Лицензът, издаден на фирмата Sydney IVF, дава право да се клонират човешки ембриони за получаване на стволови клетки. За тези цели компанията ще получи достъп до 7200 яйцеклетки. По-рано учените използваша други клетки, предимно кожни. Sydney IVF смята да използва метода за соматичен пренос на ядрото на клетката, използван през 1996 година при клонирането на овцата Доли. Този метод най-общо се състои в изваждането на ядрото на яйцеклетката на донора и въвеждане на ядро с определена ДНК.

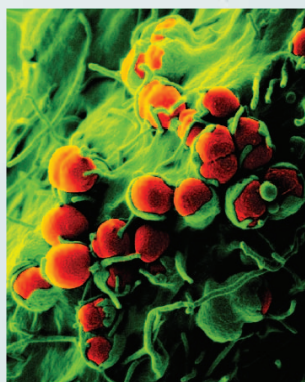
Националният съвет на Австралия по здравеопазване и медицински изследвания планира да контролира дейността на фирмата. Председателят на съвета, д-р Джон Финли, подчерта, че учените са получили право само за работа с ембриони, забранено им е да преминават към следващия стадий - въвеждане на ембрион в матка.

Електронното издание РБК припомня, че забраната за клониране в Австралия бе свалена през 2006 година, след гласуване в парламента. Според

законодателството на страната обаче, използването на останалите при екстракорпоралното оплождане, а така също създаването и използването на други ембриони е ограничено. Клонирането на човек за репродуктивни цели е забранено.

~ ~ ~

Бактерия, предавана по полов път, е най-силният организъм. Много бактерии произвеждат филаменти наречени пили. Те са 100 пъти по дълги отколкото са широки, и до десет пъти по-дълги от самата бактерия. Те могат и да се съкращават. Учените отдавна знаят, че *Neisseria gonorrhoeae* използва "четвърти тип" пили, за да пълзи по повърхностите и за да се закача за клетките, които инфектира. Това, което не бе известно до момента е, че тези бактерии обединяват пилите си, за да извършат дълги и силни тласъци. Майкъл Шийтц и неговите колеги в Университета Колумбия в Ню Йорк поставили бактерията в среда, изградена от малки "стълбчета" и измерили до каква степен бактериите са способни да ги извият, като начин да измерят тяхната сила.



Този мощен звяр е бактерията *N. gonorrhoeae* – най-силното живо същество. Тези малки създания могат да се движат, използвайки сила равна на 100,000 пъти тяхното тегло – все едно човек да може да влечи 10 милиона килограма!

(Снимка: *The EMBO Journal*, 2002 г.)

Изучаването на начина на захващане и съкращаване на пилите, дало възможност на изследователите да определят реалната сила, с която бактериите трептят и се придвижват - около един pN (нано-Нютон), или една милиардна част от Нютона. Не е много, но означава, че бактериите

могат да направят това със сила равна 100,000 пъти на тяхното тегло, и то в продължение на часове. Според авторите, това прави съкратителния протеин в пилите “най-мощният биологичен двигател познат до днес”, а освен това променя напълно и разбирането ни за това как *N. gonorrhoeae* се движи и инфектира клетките.

~ ~ ~

Няма консенсус по въпроса за началото на човешкия живот. Във връзка с предстоящо предложение за поправка в конституцията на Колорадо, САЩ, е извършено проучване на общественото мнение по въпроса “От кой момент започва човешкият живот?”. Според международно изследване, проведено от Reproductive Biology Associates (IVF клиника в Атланта, Джорджия), се оказва се, че мненията се различават значително. Най-често се сочат:

- появата на сърдечна дейност, регистрирана с ехограф – 23.5 %;
- оплождането – около 23%;
- имплантацията в маточната лигавица – 15% (интервюирани са 650 души в целия свят)

Предложението за поправка в конституцията е за това, да се признае оплождането за начало на човешкия живот и за възникването на човешки права, което би довело автоматично до поставянето на абортите извън закона. Според Жаклин Фридман (RBA, Atlanta), това проучване е важно, тъй като в него е зададен въпрос за началото на човешкия живот, а не за това, кога възниква личността и след като по такъв въпрос няма консенсус, не е редно да се счита, че група клетки, продукт на оплождане, са индивид с човешки права (New Scientist, 2008).

Пълните резултати от това изследване са докладвани на годишната среща на ASRM в Сан Франциско. Прави впечатление, че са налице големи регионални и религиозни различия, като католиците определено са най-консервативни в схващанията си и сочат предимно сливането на мъжката и женската гамети за начало на човешкия живот. Много либерални са в Обединеното кралство с над 45% за “появата на сърдечна дейност”.

ЧЕСТИТ ЮБИЛЕЙ!

Наскоро кръгла годишнина навърши нашият колега и приятел Димитър Баров.

Роден е през 1948 г. в г. София. Завършва биологическия факултет към СУ. Известно време работи в БАН. По-късно работи в андрологичното отделение на МА съвместно с проф. Протич, където се запознава с тънките детайли и сложността на мъжкия стерилитет, както и с механизмите на неговото лечение. Изключително успешна е и дългогодишната му екипна дейност съвместно с доц.А. Щерев, д-р Й. Димитров и д-р В. Лачев в отделението за асистирана репродукция в “Майчин дом”. В момента е главен ембриолог в МЦ “Репродуктивно здраве”.

Димитър Баров е един от внедрителите на метода за ин-витро оплождане в България. Цели 26 години активно работи в областта на ембриологията. Започнал с хамстеров тест в Университетската болница “Майчин дом” през 80-те години, до момента е извършил над 5000 процедури за ин-витро оплождане. През 1997 г. извършва първото успешно ИКСИ в нашата страна. Благодарение на неговите усилия са внедрени и редица други съвременни АРТ-техники в клиничната практика.

Участвал е в обучението на повечето ембриолози, работещи в България. И до момента продължава



да ни помага с ценните си съвети, базирани на богатия му опит и знания.

Димитър Баров е съчредител и член на УС на БАРЧЕ. Активно участва в дейността на асоциацията (включително и в неформалните мероприятия). Членува и в редица други професионални наши и международни асоциации.

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

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 (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)

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

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



Merck Serono Reproductive Health

Merck Serono - световен лидер
в лечението на безплодие

