

СЪДЪРЖАНИЕ:

История на асистираните репродуктивни технологии	3
<i>Д. Баров</i>	
Диагностични методи за изследване на семенна течност в помощ на асистираната репродукция	7
<i>В. Николова, Р. Станиславов</i>	
Витрификацията – ефективен метод за криоконсервация на ооцити	13
<i>П. Тодоров</i>	
Българска асоциация по регенеративна медицина (БАРМ)	18
<i>Р. Конакчиева</i>	
Новини от световната мрежа	19
<i>П. Тодоров, Г. Николов</i>	

CONTENTS:

History of assisted reproductive technologie	3
<i>D. Barov</i>	
Diagnostic methods for investigation of seminal fluid in aid of assisted reproduction technology	7
<i>V. Nikolova, R. Stanislavov</i>	
Vitrification – effective method for oocytes cryopreservation	13
<i>P. Todorov</i>	
Bulgarian Association for Regenerative Medicine (BARM)	18
<i>R. Konakchieva</i>	
News from the Internet	19
<i>P. Todorov , G. Nikolov</i>	

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

проф. Вилфред Файхтингер - Австрия

Уважаеми колеги и читатели,

Изтеклата 2009 г. не бе лесна за никого под сянката на развихрилата се Световна икономическа криза (поредната). В известен смисъл това не подмина и нас. Но все пак през тази година се случи и нещо много положително – след безпрецедентен натиск от страна на неправителствени организации на лекари и пациенти, за пръв път, у нас Държавата се ангажира с финансирането на безплодните двойки при провеждане на процедури за ин витро оплождане – до 3 безплатни опита в рамките на 5000 лв. Това неминуемо доведе до увеличаване броя на преминалите двойки и на осъществените цикли на асистирана репродукция в нашите специализирани центрове. Ясно е, че значението на обмена на информация в рамките на колегията и обучението на млади и перспективни специалисти добива особено голямо значение.

В този ред на мисли считаме, че списание “Ембриология” ще бъде все по-полезно и апелираме към Вашата активност за предлагане на повече обзорни и оригинални статии в областта на ембриологията, асистираната репродукция, репродуктивната биохимия и молекулярна биология, клетъчните култури, стволовите клетки и други.

Пожелаваме на всички колеги по-здрава, успешна и ползотворна 2010 г.



Д-р Георги Николов,
(главен редактор)

ИСТОРИЯ НА АСИСТИРАНИТЕ РЕПРОДУКТИВНИ ТЕХНОЛОГИИ

Д. Баров

Главен ембриолог, САГБАЛ "д-р Щерев", София

HISTORY OF THE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES

D. Barov

Senior embryologist, Ob/Gyn Hospital 'Dr Shterev', Sofia, Bulgaria

Самовъзпроизводството (репродукцията) е основно свойство на живата природа. Чрез него се запазва оцеляването на вида. Човекът, като най-висше творение, съществуващо на земята, не прави изключение от това правило. Невъзможността да се създаде потомство нанася дълбоки психологични и емоционални травми на брачната двойка.

Асистираните репродуктивни технологии (АРТ) са едно от най-великите постижения на човешката мисъл в областта на биологията и медицината. Те имат не толкова многогодишна, колкото богатата история. Първото 'ин витро' бебе се ражда през 1978 г. и е резултат на упорито научно търсене.

Още през 1786 г. Хънтър извършва първата изкуствена инсеминация на жена, чийто съпруг е бил неспособен за осъществяване на полов акт поради анатомичен дефект, а през 1866 г. Симс осъществил инсеминация с донорски сперматозоиди.

Проучванията върху животинското и човешкото оплождане започват едва през втората половина на 20 век. През 1954 г. Тибо успешно извършва първата фертилизация при зайци. На следващата година Чанг получава ембриони на зайци чрез 'ин витро' оплождане, а през 1959 г. трансферирал оплодена заешка яйцеклетка и получил бременност, завършила с естествено раждане.

От този момент датира и интересът на гинеколозите към въпросите на безплодието. През 1959 г. се провежда първият конгрес по безплодие в Ню Йорк, а през 1961 г. Клайн и Палмър описват първата аспирация на човешки ооцит чрез лапароскопия. Едуардс съзира, че изкуственото оплождане, използвано при животните, би могло да се приложи и при хората. По това време той упорито работи върху 'ин витро' оплождане на миши яйцеклетки. Заедно с негови колеги от Глазгоу получава и първите в света ембрионални стволови клетки от заешки ембрион. Разбирайки терапевтичния потенциал на тези клетки, той задълбочава проучванията си върху матурацията и

фертизацията на човешки ооцити 'ин витро', като източник на стволови клетки и за други научни цели. В тази връзка отива на 6 седмичен интензивен курс в Johns Hopkins Hospital – Baltimore, където открива, че на човешките ооцити са необходими 37 часа, за да завършат напълно матурацията си.

Скоро след това, Едуардс среща Коен на конференция по имунология на репродукцията в България през 1967 г., а след това и през 1972 г. на конгрес в Токио, където разговарят върху възможностите за 'ин витро' оплождане при човека. По време на тази среща те пророчески разговарят и за бъдещето на човешката репродукция – 'ин витро', криоконсервацията на гамети и ембриони, предимплантационната генетична диагностика и др.

Първоначално Едуардс прави неуспешни опити да се колаборира с гинеколози от Кеймбридж и Лондон, които да го снабдяват с човешки ооцити. Обезкуражен, той заминава отново в САЩ при Джорджена и Хауард Джоунс, където могат лесно да му осигуряват овариална тъкан от клиновидни резекции. Връщайки се в Англия, продължават опитите му за колаборация с гинеколози, докато на конференция в Лондон съдбата го среща с Патрик Стептоу, който работи в малък северен град – Олдхам и вече има голям опит в прилагане на лапароскопията.

Стептоу веднага се съгласява да работи с Едуардс и така през 1968 г. те създават първият в света екип по репродуктивна медицина. Стартират извършване на 'ин витро' процедури през 1971 г., но за съжаление всичките са безуспешни до 1975 г., когато за разочарование постигат ектопична бременност. Чак през 1978 г., след 32 неуспешни ембриотрансфера осъществяват първото успешно забременяване и раждането на първото "ин витро" бебе - Луиза Браун.

Интересно е, че тази бременност се постига от

яйцеклетка, получена при спонтанен цикъл. Така Едуардс и Стептоу остават в историята като пионерите в създаването на АРТ методите. След тях много екипи в света започват да работят в тази област, основавайки клинични центрове за IVF.

В Австралия Wood създава комбиниран научен екип, в който гинеколози са Leeton и Talbot, а биолози Lopata и Trounson. Тази група започва работа с хормонално стимулирани цикли с цел добиване на повече от една яйцеклетка, а Trounson подобрява качеството на културалните среди. Австралийците постигат първата си бременност през 1980 г.

В САЩ Geordgeanna и Howard Jones започват своята АРТ програма през 1981 г. в Norfolk, но след като извършват 41 лапароскопии с добив на яйцеклетки, успяват да постигнат разделяне на ембриони само при 13 пациентки, които не забременяват. Те предлагат да се използва hMG за стимулация на циклите за получаване на повече яйцеклетки и пораждат дискусия за и против стимулирания цикъл. Постигат първият си успех от стимулиран цикъл през 1981 г.

Във Франция гинекологът Frydman и биолога Testar се фокусират върху изучаване на ЛН пика, което е предсказание за акуратното насрочване на фоликуларната пункция. В Sevres, в неуниверситетска болница, работят биолозите Mandelbaum и Plachot, заедно с Cohen и транспортират ооцитите в термос до лаборатория в друга болница на 30 мин. път с такси. Там Cohen и Pez получават неоченима помощ от Menezo, работещ във ветеринарен институт, който разработва средата В-2 – “френската среда”. Първите две френски бебета, плод на двете групи, се раждат през 1982 г. Същата година групи в Швеция, Финландия, Холандия и Германия съобщават за раждане на IVF деца.

Във Виена, Австрия - Feichtinger (един от чуждестранните членове на БАРЧЕ) и Kemeter създават първата двуплодна бременност през 1982 г. До тази година в света има родени 11 “бебета от епруветка”. Следва бурно умножаване на IVF центровете.

През следващите години успехите и откритията не спират своя ход:

- 1982 г. - първата аспирация на яйцеклетки чрез трансвагинална пункция (Lenz);
- 1983 г. - първото замразяване на човешки ембрион;
- 1984 г. - първата бременност след GIFT;
- 1986 г. - първата бременност след ZIFT и след ооцитно замразяване;

- 1989 г. - първата витрификация на човешки ооцити;
- 1990 г. - първото раждане след преимплантационно генетично диагностициране и първото описание на асистиран хетчинг.
- 1992 г.- извършване на първото ICSI от Palermo и Van Stretenhaim – най-успешната техника, въведена досега за елиминиране на неуспехите при мъжки фактор.

През 1986 г. в света има вече 2000 родени ‘ин витро’ бебета, като половината от тях са заченати в центъра на Edwards. През 1989 г. бебетата са вече 18,000.

Днес, годишно в света се раждат около 2,000,000 деца, които са плод на АРТ и с тези методи успешно се лекуват почти всички форми на стерилитет. До момента ‘ин витро’ заченатите бебета са над 6,000,000.

Какво е развитието на АРТ методите в България?

У нас първи опити за ‘ин витро’ фертилизация прави д-р Ватев от катедрата по биология на бившата Медицинска Академия. В края на 70^{-те} и началото на 80^{-те} г. на миналия век заедно с доц. Живков и доц. Еврев извършват проучвания върху миши яйцеклетки. През 1984 г. д-р Иво и д-р Стефан Тодорови успяват да осъществят оплождане при човешки ооцити, получени лапароскопски и от отворени гинекологични операции. За съжаление, въпреки извършените ембрио-трансфери, не постигат бременност.

През 1985 г. в Института по ендокринология на МА, екип под ръководството на доц. Щерев и лекарите д-р Й. Димитров, д-р В.Лачев и д-р В. Янков започват експерименти за ‘ин витро’ оплождане на човешки яйцеклетки. Те се колаборират с доц. Ватев, който извършва биологичната част на процедурата. Колекцията на ооцитите се осъществява трансвагинално и след това се пренасят в термос до лабораторията на доц. Ватев за оплождане и развитие. Така се стига до 1987 г., когато екипът на доц. Щерев успява вече трансвагинално (под трансвагинален ехографски контрол) да аспирира яйцеклетки при две стимулирани пациентки. Доц. Ватев постига добро оплождане на яйцеклетките и развитие на ембрионите и след ембриотрансфер и двете жени забременяват. Първото ‘ин витро’ бебе се ражда през м. януари 1988 г., а две седмици по-късно се ражда и второто.

За съжаление ползотворното сътрудничество между екипа на доц. Щерев и доц. Ватев след това се преустановява. Няколко месеца по-късно със

заповед на тогавашния председател на МА акад. А. Малеев се създава официално първият 'ин витро' екип в България под ръководството на доц. Щерев и се пребазира от Института по ендокринология в ДУБ "Майчин дом". В него са включени лекарите д-р Йосиф Димитров, д-р Валентин Лачев и д-р Владимир Янков.

По това време пишещият тези редове работеше в Майчин дом и от няколко години се занимаваше с определяне оплодителната способност на човешки сперматозоиди чрез пенетрацията им в хамстерови яйцеклетки (хамстеров тест). С вътрешна заповед на директора на Майчин дом и аз бях прикрепен към 'ин витро' екипа.

Въпреки че не бяхме оборудвани с необходимата апаратура, с голям ентузиазъм започнахме работа през м. ноември 1988 г. Трябва да се поясни, че не разполагахме с голямо количество литература по въпроса (имахме компютър с ДОС програма, но за Интернет не бяхме и чували). Тогавашно в България нямаше и фирми, които да ни внасят хранителни среди. Както се знае, неволята учи и с много трудности започнахме да си ги правим сами от среди на прах, разтворени в дейонизирана вода, която с много молби и с приятелски връзки вземахме от Института по заразни и паразитни болести. За всяка пациентка се приготвяха по 6 индивидуални среди, като за източник на белтък се използваше кръвен серум от самата нея. Това беше една много трудо- и времеемка дейност и много често приготвянето на средите продължаваше до малките часове на деня.

Понякога съдбата помага на новациите, а и ентузиазмът ни беше много голям, така че само 2 месеца по-късно (през януари 1989 г.) и след малко на брой опити получихме първата си бременност. Забременяването на тази жена, името и физиономията на която никога няма да забравя, е свързано с един курioзен инцидент по време на ембриотрансфера. Като всеки млад екип, в желанието си постигнем бързо бременност, тогава връщаме в матката по много ембриони. За тази пациентка имахме 5 ембриона, които трябваше да върнем в присъствието на няколко специализиращи лекари. За изненада обаче, ембрионите не бяха попаднали в матката и в последващата ревизия на катетъра се озоваха отново в петритото примесени с кръв. След кратка инкубация направихме последващ ембриотрансфер, който беше успешен.

По това време, в края на социалистическия период, много се шумеше около 'ин витро', така че на следващия ден същата пациентка бе интервюирана от журналисти и тя им заяви, че е сигурна, че ще забременее. Така се получи първото

бебе от официално създаденият ни екип, което се роди през м. септември в Майчин дом. Родоразрешението беше чрез Цезарово сечение, което извършиха доц. Щерев и доц. Налбански. Около месец след това раждане се роди и второто ни бебе. В първата година от съществуването на екипа успяхме да създадем 9 бременности. До този момент лекарствата за стимулацията и извършване на цялата процедура се поемаше от държавата. За съжаление обаче, имаше дълъг списък на чакащи жени за включване в програмата за ин витро. След 10 ноември 1989 г. гонадотропните хормонални препарати практически изчезнаха от България. Работата намаля чувствително и на процедурата се подлагаха жени, които се снабдяваха по неведоми пътища с лекарства от чужбина.

По същото време, през 1988 г. се сформира и вторият ин витро екип и първото специализирано отделение по ин витро оплождане в България с ръководител д-р Табакова в бившата АГ болница "Тина Киркова". В екипа участват и д-р В. Йорданов, д-р Т. Янакиева, д-р В. Нецов. Първоначално като ембриолог работи доц. Ватев, а малко след това е заместен от д-р Г. Вакрилов. През м. септември 1989 г. се ражда първото им бебе, заченато след IVF, а до края на годината още три деца. Този екип постига и първата триплодна бременност у нас след 'ин витро' оплождане.

Нашият екип в първоначалния му вариант просъществува до 1997 г. и в следствие развитието на 'Български синдром' (неспособност да се работи дълго време в екип) се разпадна. Доц. Щерев създаде частен медицински център "Репродуктивно здраве", в който аз останах като ембриолог. Д-р И. Димитров сформира свой частен център, в който като ембриолог беше привлечен доц. П. Тодоров, а малко по-късно и доц. Я. Тодоров.

Малко преди това, след като преминаха специализация при нас, д-р М. Монастирска и д-р М. Сариев основаха ин витро център "Олимед" във Варна.

В следващите години започна създаването на нови екипи и 'роене' на старите. До 1998 г. центровете за асистирани репродуктивни технологии се брояха на пръстите на едната ръка, но след това започва бурното им размножение.

Доц. Ватев създаде център "Технобиоасист", а д-р Табакова - "Репробиомед", в който от създаването му през 1997 година като ембриолог работи д-р Г. Николов.

Основават се и центрове в Пловдив, Варна и Плевен. Може и да звучи нескромно, но голяма

част от новосформираните екипи вкл. и такива от Македония, получиха обучение в нашия център и направиха първите си стъпки под нашето методично ръководство.

В момента в България има около 17 официално регистрирани "ин витро екипа". Времето на конфронтацията между нас отдавна отшумя и в момента, като цяло, цари колегиален климат.

През 1998 г. бе създадена Българска Асоциация по стерилитет и репродуктивно здраве, в която членуват почти всички специалисти по стерилитет и човешка репродукция. От тогава ежегодно се провеждат конгреси на Асоциацията с международно участие, на които се споделят и

обсъждат най-новите постижения в тази област. През 2005 г. се учреди и Българската Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология, чието печатно издание държите е ръцете си.

Литература

1. In vitro fertilization. A practical Approach. Ed. D. Gardner. Colorado Center for Reproductive Medicine. Englewood, Colorado, USA

Адрес за кореспонденция:

Димитър Баров

главен ембриолог в МЦ "Репродуктивно здраве"

E-mail: icsibarov@abv.bg

ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЕМЕННА ТЕЧНОСТ В ПОМОЩ НА АСИСТИРАНАТА РЕПРОДУКЦИЯ

Николова В., Станиславов Р.

Университетска Болница "Майчин дом", Семиноложична лаборатория, София

DIAGNOSTIC METHODS FOR INVESTIGATION OF SEMINAL FLUID IN AID OF ASSISTED REPRODUCTION TECHNOLOGY

Nikolova V, Stanislavov R.

University Hospital "Maichin dom", Seminological laboratory, Sofia

Резюме: Независимо от нарастващите ни познания относно процеса на оплождане, все още са необходими изследвания за въздействието на свободните радикали, причините за фрагментацията на ДНК в сперматозоидите и отражението им върху оплождането и бременността. Данните от проучванията в тази насока имат значение с цел оптимизация на условията и резултата от прилагането на асистирани репродуктивни техники. Методът за магнитно активирано клетъчно сортиране на клетки с увредена ДНК (MACS) предоставя възможност за оптимална чистота и извличане на годни да оплождат сперматозоиди и да дадат начало на нормална бременност.

Abstract: Independently of ever-increasing knowledge concerning the fertilization process, there is still a need for better understanding of significant impact of the reactive oxygen species on sperm DNA fragmentation and their influence of fertilization and pregnancy. The data of the investigation in the field have purpose for optimize conditions and the results for achieving better results in assisted reproduction technology. The method of magnetic activated cells sorting separation with DNA damage (MACS) provides optimal purity and recovery of spermatozoa capable to fulfil fertilization and initiation normal pregnancy.

Въведение: Има недостатъчни познания по отношение причините за фрагментирането на сперматозоидната ДНК и нейното влияние върху оплождането и бременността след IVF и ICSI. Напоследък изследователите фокусираха своето внимание върху въздействието и участието на фрагментацията на ДНК и мъжкия инфертилитет. Доказано е многократно, че увреждането на ДНК при еякулирани сперматозоиди, установено чрез TUNEL метода или Comet assays в значителна степен корелира негативно с оплождането и бременността при IVF, ICSI и IUI^(1,11). Съобщава се за висок процент ранна апоптоза на сперматозоидите и наблюдението за свързване на анексин-V към сперматозоидната мембрана, признак че фрагментацията на сперматозоидната ДНК се явява в резултат на апоптоза^(11,13). В човешките сперматозоиди е доказано също така активирана каспаза-3, ензим даващ началото на апоптозата^(14,15). Фрагментацията на ДНК може да бъде предизвикана също така от свободни радикали^(1,2), които се образуват предимно от увеличен брой левкоцити в еякулата^(1,2,4) и от сперматозоиди с цитоплазматичен остатък^(1,12). Между повишените нива на свободни радикали в семенната течност и

мъжкия инфертилитет е установена силно позитивна връзка^(2,4).

Въпреки нарастващите познания относно механизмите и факторите, участващи в процеса на оплождане, една от 6 двойки, опитващи в продължение на 1 година да имат деца има проблем със зачеването⁽⁶⁾. Около 50% от причините се пада на мъжкия фактор, докато половината от инфертилитните мъже се класифицират от познатите причини за намалена оплодителна способност, към групата мъже с идиопатичен инфертилитет.

При голям брой пациенти се установява leukocytospermia, без това да манифестира инфекция на урогениталния тракт⁽⁴⁾. Влиянието на тези клетки и образуванията от тях свободни радикали са обект на обширни клинични изследвания, поради тяхното голямо значение за мъжкия оплодителен потенциал⁽⁶⁾.

В редица водещи Клинични центрове по Репродуктивна медицина са разработени и внедрени в практиката методи с голяма

прогностична стойност по отношение успеваемостта на асистираните репродуктивни техники и лечението на безплодието като цяло ⁽¹⁶⁾. В Клиниката по Репродуктивна Медицина, Кливланд, Охайо, САЩ, под ръководството на професор Agarwal бяхме обучени теоретично и практически на методи, като:

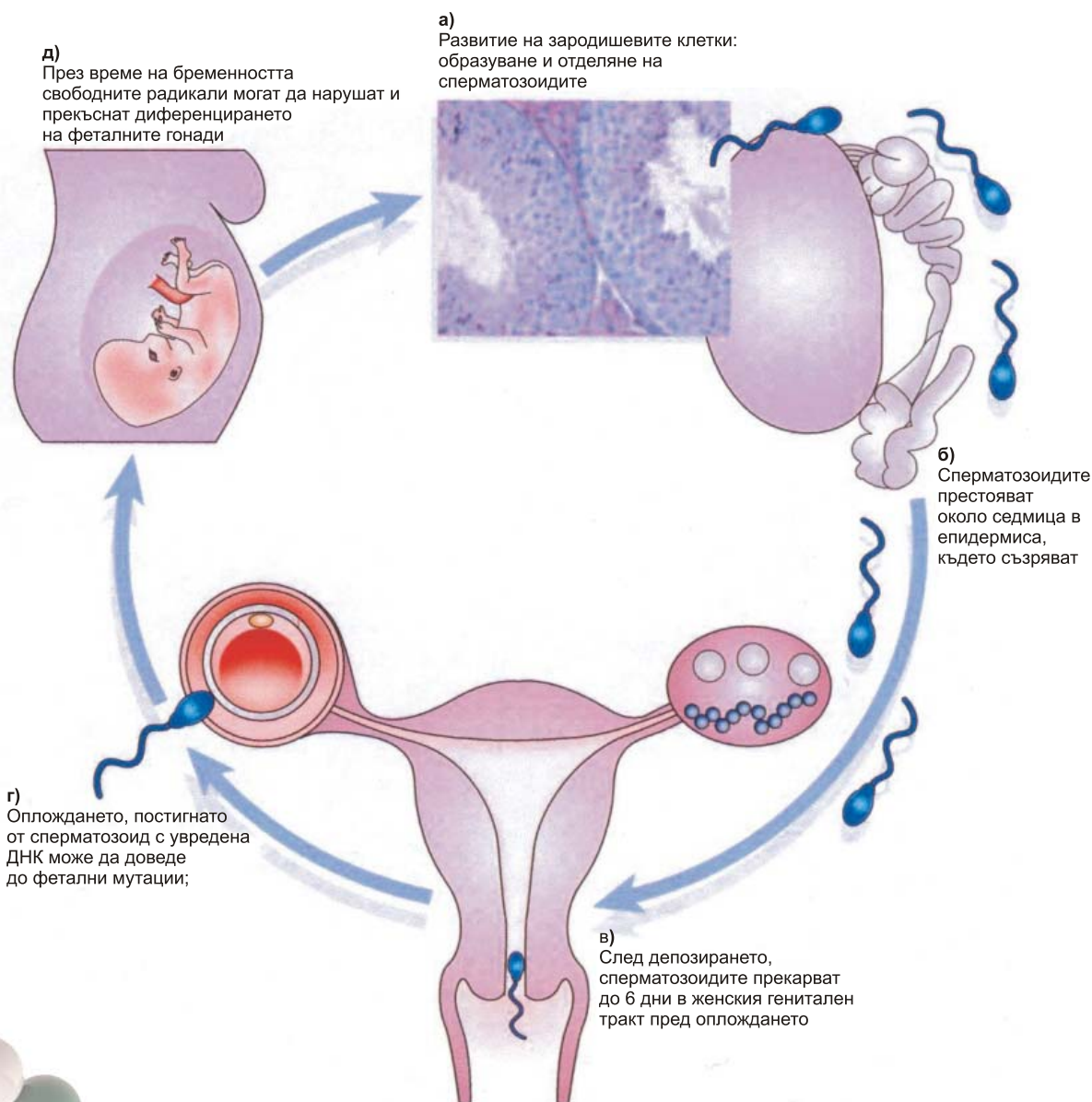
- Определяне на свободни радикали в семенна течност;
- Тест за количествено определяне на левкоцити в семенна течност;
- Определяне на общ антиоксидантен капацитет;
- Определяне на сперматозоидната ДНК фрагментация;
- Магнитно активирано клетъчно сортиране на клетки с увредена ДНК.

Ще се спрем накратко върху същността и принципа на всеки от изброените методи:

Определяне на свободни радикали в семенна течност

Повишени нива на свободни радикали, като супероксидния анион (O_2^-), водородния прекис (H_2O_2), хипохлорид (OHC_1) и хидроксилен радикал (OH) водят до оксидативен стрес, който води до поражения на различни нива на човешката репродукция ⁽⁹⁾ (фиг. 1). Те се образуват главно от белите кръвни клетки (БКК) и по-специално от гранулоцитите и от абнормалните сперматозоиди, най-вече от сперматозоиди с цитоплазматичен остатък ⁽¹⁰⁾.

Принцип: Свободните радикали могат да бъдат определени чрез хемилуминисцентен метод, използвайки като реактив луминол ⁽⁶⁾. Луминолът е изключително чувствителен и реагира със широка гама свободни радикали при неутрално рН. Той има възможността да определи както екстрацелуларните, така също и интраце-



Фигура 1: Места, на които свободните радикали могат да нарушат сперматозоидната функция и тяхното участие в репродуктивния процес. (Aitken et. al., Nature, 2004)

луларните свободни радикали. Свободните радикали имат много къс полуживот и се образуват непрекъснато ⁽⁸⁾. Те се свързват с луминола и произвеждат светлинен сигнал, който след това се превръща в електрически сигнал (фотон) в апарат, наречен луминометър. Броят на образуваните свободни радикали се измерва като изброени фотони за 1 минута (срм) ^(1,2).

Тест за количествено определяне на левкоцити в семенна течност (Endtz) тест

Повечето човешки еякулати съдържат левкоцити, като преобладаващ клетъчен тип сред тях са неутрофили ⁽⁴⁾. Прекомерното наличие на тези клетки в семенната течност (leukocytospermia) може да означава съществуването на инфекция на репродуктивния тракт.

Нещо повече, увеличеният им брой може да бъде свързан с отклонения в спермалния профил, включващ намаление на обема на еякулата, концентрацията и сперматозоидната подвижност, а така също загуба на сперматозоидна функция като резултат на оксидативен стрес и/или секретирание на цитотоксични цитокини.

Трудно е да бъде определена граничната стойност за концентрация на левкоцитите, след която оплодителната способност може да бъде увредена. Въздействието на тези клетки зависи от мястото на което левкоцитите навлизат в семенната течност, типа на левкоцитите, които участват и тяхното състояние на активация.

Като общо правило, нормалният еякулат не трябва да съдържа повече от 5×10^6 кръгли клетки/мл, а броя на левкоцитите не трябва да надвишава 1×10^6 /мл. Когато семенната течност съдържа повече от 1×10^6 /мл БКК трябва да бъдат проведени микробиологични тестове, за да се изследва наличието на инфекция.

Определяне на общ антиоксидантен капацитет (ТАС)

Общият антиоксидантен капацитет (ТАС) на семенната плазма беше изследван като беше използван кит за антиоксидантно определяне (Cat # 709001; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Чрез този кит може да се определи ТАС на семенната течност. Принципът на определянето е способността на водно-; и мастно разтворими антиоксиданти в семенната плазма да подтиснат окислението 2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline sulphonate] (ABTS) до ABTS+. При използваните условия за реакцията, антиоксидантите в

семенната плазма причиняват подтискане на абсорбцията при 750 nm в степен, пропорционална на тяхната концентрация. Капацитетът на антиоксидантите, налични в пробата, да предотвратяват окислението на ABTS, се сравнява със стандартен Trolox, водно разтворим аналог на токоферола. Резултатите се съобщават като микромоли (μM) на еквивалента Trolox. Това определяне измерва общата антиоксидантна активност на всичките нейни съставки, включително витамини, протеини, липиди, глутатион, пикочна киселина и др.

Всички проби семенна плазма бяха разредени 1:10 с буфера преди да стартира изследването, за да се избегне вариабилност поради интерференцията на плазмените протеини или разреждането на пробата. Всички реагенти и проби бяха темперирани на стайна t° преди да започне изследването. Пробите и стандартите на Trolox се изследваха двойно. Стандартите на Trolox и реагентите се приготвяха съгласно инструкциите на фирмата производител по време на изследването. След центрифугиране на плаката 10 μL от стандарта и от пробите се поставяха в съответните кладенчета на плаката. Към всички кладенчета се добавяше 10 μL метмиоглобин и 150 μL хромоген. На реакцията се дава начало чрез добавянето на 40 μL H_2O_2 по възможност по-бързо. Плаката се покрива и се инкубира за 5 минути върху шейкър при стайна t° . Лъчите на абсорбцията се нагласяват на 750 nm, използвайки ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT).

Изчисляване на резултатите.

Изчисляването на скоростта на реакцията се дава от изчисляването на средната абсорбция на всеки стандарт и проба. Средната аритметична на абсорбцията на стандартите като функция на крайната концентрация на Trolox μM се използва за построяване на стандартните криви при всяко изследване, чрез които се определят неизвестните проби.

Пример за стандартната крива за определяне на ТАС.

Стандартните концентрации на Trolox са разположени върху абсцисата, а абсорбцията - върху ординатата. Общата антиоксидантна концентрация (ОАК) се изчислява, използвайки уравнението, получено от линейната регресия на стандартната крива чрез заместване на средната стойност за абсорбцията за всяка проба в уравнението:

$$\text{ОАК } (\mu\text{M}) = \text{неизвестна ср. ст-ст на абсорбцията} - Y\text{-пресечната точка} \times \text{разр-не} \times 1000 \text{ наклона}$$

Определяне на сперматозоидната ДНК фрагментация

Определянето на увреждането на сперматозоидната ДНК е тест, чието време дойде. Спермалният анализ е съществена част при изследването на мъжкия фактор при безплодието в брака, но той не може да докаже финни спермални дефекти и да отговори на причините за нарастващия дял на мъжа при инфертилитета. Въпреки че оценките варират, приблизително 15% от пациентите с мъжки фактор при безплодие имат нормални спермограми. Необходимо е да бъдат идентифицирани диагностични определяния на семенна течност, които да са лесни за провеждане, относително нескъпи и да имат прогностична стойност. Тестовите, които определят спермалното качество трябва да идентифицират не само способността на сперматозоидите да достигнат до мястото на оплождането, но също така тяхната способност да оплодят яйцеклетката и да активират ембри-онален растеж. Оценката на увреждането на сперматозоидната ДНК очевидно отговаря на гореспоменатата нужда за по-пълната диагноза на мъжкия инфертилитет^(6,7).

Мъжкото репродуктивно здраве напоследък се разглежда детайлно. Съответно многобройни съобщения в литературата заключават, че спермалното качество намалява, докато честотата на тестикуларните ракови заболявания нарастват. Причината, стояща зад тези промени се приписва на увреждане на сперматозоидния хроматин. През време на репродукцията *in vivo*, процеса на естествения подбор осигурява само сперматозоид с нормален геномен материал да оплоди яйцеклетката. При АРТ техниките обаче този процес на естествена селекция се прескача, което води до вероятност абнормални сперматозоиди да се използват за оплождане на яйцеклетката. Бихме могли да избегнем тази ситуация чрез количествено определяне на размера и типа на геномното увреждане на сперматозоидите, използвайки утвърдени лабораторни методи⁽⁹⁾.

Що е нормална сперматозоидна ДНК?

Сперматозоидната ДНК е организирана по специфичен начин, което запазва ядрения хроматин компактен и стабилен. Тази ДНК организация позволява не само много плътно пакетиранията генетична информация да бъде транспортирана до яйцеклетката, но осигурява също така тази ДНК да бъде отделена във физикална и химическа форма, така че да позволи лесен достъп на генетичната информация за процеса на оплождане и развитие на диплоидния зародиш. Фертилният сперматозоид има стабилна ДНК, способна да се декондензира в подходящото време на фертилизационния процес и да се предаде генетичния материал без дефекти.

Кои са типовете и механизмите за увреждане на ДНК?

Дефектите на геномния материал в сперматозоидите могат да се отнасят до формата на кондензация, или дефекти на ядрената зрялост, прекъсване на ДНК веригата, дефекти в целостта на ДНК, или сперматозоидни хромозомни анеуплоиди. Причините за тези дефекти могат да се дължат на заболявания, прекомерна употреба на лекарства, състояние на треска, повишена тестикуларна t° , замърсяване на въздуха, тютюнопушене, напреднала възраст и др. Молекулните механизми за увреждане на ДНК при гореспоменатите състояния се изследват задълбочено. Най-важните механизми, взети в съображение за увреждането на сперматозоидната ДНК е абнормалното хроматиново пакетирание, свободните радикали и апоптозата. Възможно е да участват много фактори, базирайки се на клиничната диагноза, отговорна за увреждането на ДНК.

Изследване на увреждането на ДНК

За определянето на степента на увреждане на ДНК в човешките сперматозоиди има много методи. Някои нови тестове са в процес на научно разработване. Възможността на тези нови методи за изследване да определят точно степента на увреждане на ДНК зависи от много методични и биологични аспекти. Някои от настоящо достъпните методи оценяват целостта на сперматозоидната ДНК, включващ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick and labeling (TUNEL), определяне на сперматозоидната хроматинова структура, (comet assay) *in situ* nick трансляция и доказване на прекъсване на ДНК с флуоресцентна боя (DBD-FISH). Други тестове идентифицират дефектите на пакетирание на сперматозоидния хроматин: оцветяване с анилиново синьо, оцветяване с толуидиново синьо и оцветяване с хромомицин А3 боя.

Ние трябва да изследваме връзката между наложените тестове и да идентифицираме кои от тях корелират помежду си и кои не. Например, FISH метода за анеуплоиди, предоставя информация за статуса на сперматозоидната ДНК, който е различен от информацията, която предоставят другите тестове за изследване на сперматозоидната ДНК. Научното изследване трябва да продължи да изяснява естеството на абнормалностите, определени чрез всеки метод и още по-важно, да идентифицира кои от тези абнормалитети играе важна роля в сперматозоидната геномна функция, с оглед оптимизиране на прилагането на асистирани репродуктивни техники⁽¹⁴⁾.

Доказателство за ролята на сперматозоидната ДНК в репродукцията

Решението да бъде въведен нов тест в клиничната практика се основава на обема и качеството на публикуваното доказателство. Различни изследвания са анализирали връзката между степента на увреждането на ДНК и честотата на оплождането, честотата на ембрионалното делене, имплантационната честота, честотата на забременяванията, честотата на живородените бебета. Когато се публикува голямо съобщение върху специфичен тест за увреждане на сперматозоидната ДНК очевидно, че интереса от страна на научната общественост се повишава, както и усилията теста да бъде въведен в клиничната практика. В настоящите съобщения липсва информация за възможността на тези тестове да прогнозира изхода на нормална и абнормална бременност (например, спонтанни аборти и малформации).

В тези научни съобщения, обаче, когато 30% и повече от сперматозоидите са с увредена ДНК, партньорката трудно забременява. Bungum установяват, че шансът да бъде постигната бременност / раждане за пациенти, при които се провежда вътрематочна инсеминация е значително по-висок в групата с ДНК фрагментационен индекс $\leq 27\%$, отколкото при пациенти с ДНК фрагментационен индекс $> 27\%$. От друга страна, при групата с ДНК фрагментационен индекс над 27%, резултатите от прилагане на ICSI са значително по-добри от тези на IVF.

Henkel съобщават, че дори сперматозоидната ДНК фрагментация да не корелира с оплождането и честотата на ембрионалната фрагментация, честотата на забременяванията при пациенти, които предприемат IVF е била значително ниска, когато TUNEL позитивните сперматозоиди са били над 36.5%. Спонтанни аборти могат да се срещат при нарастване степента на ДНК увреждането, (TUNEL метод) и това може да бъде причина за неизяснените спонтанни аборти. Ако сперматозоидната ДНК не може да декондензира след навлизането в ооплазмата, не може да настъпи оплождане или неуспешно пост-фертилизационно развитие може да настъпи, поради дефектна сперматозоидна ДНК.

Магнитно активирано клетъчно сортиране на клетки с увредена ДНК

Сперматогенезата спада към динамичните процеси, обхващащи митотичното делене на сперматогониите, мейотичното делене на сперматоцитите, морфологичната диференциация и съзряване на сперматидите и накрая, образуването на сперматозоидите. Апоптозата е програ-

мираната клетъчна смърт, която започва през време на сперматогенезата, след което някои от зрелите сперматозоиди, набелязани за елиминиране по пътя на апоптозата, могат да избегнат механизмите на отстраняване и попадайки в еякулата да допринесат за лошото спермално качество^(13,14).

Ранното манифестиране на апоптозата включва увреждане на сперматозоидната мембрана с екстернализация на фосфатидилсерина от вътрешната върху външната повърхност и разкъсване на митохондриалната мембрана. Базирайки се върху високо селективния афинитет на 35-36 kDa фосфолипид-свързващия протеин анексин-V към фосфатидилсерина, апоптотичните сперматозоиди и сперматозоиди с нарушена плазмемембрана могат да бъдат разделени чрез супрамагнитни анексин-V микроперли (ANMB) на ANMB позитивни и ANMB негативни фракции чрез магнитно клетъчно сортиране (MACS).

Анексин-V се използва за сепариране на сперматозоиди с активирани каспази – ключови инициатори и екзекуторни ензими на апоптозата – преобладаващи в ANMB позитивната фракция, докато ANMB негативните сперматозоиди се характеризират с най-ниската активност на апоптозната сигнална каскада. Системата MACS няма увреждащи ефекти върху сперматозоидния мотилитет, жизненост и морфология⁽¹⁴⁾.

Метод за разделяне на сперматозоиди с нарушени мембрани чрез MACS

Сперматозоидните суспензии се разделят на две фракции чрез преминаване през магнитно поле (Mini MACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), като принципа се базира на свързването на ANMB към фосфатидилсерина (само сперматозоиди с нарушена мембрана и увредена ДНК). Фосфатидилсерина може да бъде представен върху повърхността на сперматозоидите поради екстернализация през време на апоптоза, а също така при увреждане на ДНК от свободните радикали.

Накратко, промити сперматозоиди се инкубират с 100 μL ANMB на стайна t° за 15 минути и се поставят върху разделяща колонка, съдържаща железни топчета. Сперматозоидите, белязани с ANMB (ANMB позитивни), се задържат в колонката за разделяне, която се поставя в магнит, докато сперматозоидите с неувредени мембрани преминават през колонката (ANMB негативни). Силата на магнитното поле е 0.5 Tesla между полюсите на магнита и до 1.5 Tesla в железните сфери на колонката. След изваждането на

колонката от магнитното поле задържаната фракция се елуира, като се използва анексин свързващ буфер.

Заклучение: В обобщение на гореказаното, сперматозоидната ДНК е много сложна структура и способността да кондензира / декондензира е един от съществените критерии, за да бъде запазена оплодителната способност на сперматозоидите. Целостта на ДНК в сперматозоидите е от важно значение за точното пренасяне на генетичната информация и от друга страна за доброто здраве на бъдещото поколение. Това е една независима мярка за спермалното качество и предоставя допълнителна диагностична и прогностична възможност, наред с конвенционалните спермални параметри, за мъжкия оплодителен потенциал. Многобройни изследвания са установили негативна корелация както *in vivo*, така и *in vitro* между честотата на забременяването и процента на сперматозоидите с увредена ДНК в спермалните проби.

Литература

1. Aitken RJ, Krausz C 2001 Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122, 497-506.
2. Aitken RJ, West KM 1990 Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology* 13,433-451.
3. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE 2004 Seeds of concern. *Nature*; 432:48-52.
4. Aitken RJ, West KM, Buckingham D 1994 Leukocytic infection into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology* 15, 343-352.
5. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA 2003 Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 79, 829-43.
6. Bungum M 2005 Reply to: sperm chromatin structural assay versus hypoosmotic swelling test in predicting the need for *in vitro* fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 20, 841-2.
7. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S 2002 Sperm DNA quality predicts in utero insemination outcome: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 17, 3122-3128.
8. Henkel R, Ichikawa T, Sanchez R 1997 Differentiation of ejaculates in which reactive oxygen species are generated by spermatozoa or leukocytes. *Andrologia* 29, 295-301.
9. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL et al. 2000 DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *Journal of Andrology* 21, 33-44.
10. Iwasaki A, Gagnon C 1992 Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 57, 409-416.
11. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF 1998a Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 69, 528-532.
12. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF 1998b Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 13, 896-900.
13. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E et al. 2000 Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility* 74, 245-250.
14. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G et al. 1999 Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 4, 31-37.
15. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF 1997 Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction* 56, 602-607.
16. World Health Organization 1999 WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press, Cambridge.

Адрес за кореспонденция:

Весела Николова, дб
Семинологична лаборатория
СБАЛАГ "Майчин дом" ЕАД
ул. "Здраве" 2, София
E-mail: rstanik@abv.bg

ВИТРИФИКАЦИЯТА – ЕФЕКТИВЕН МЕТОД ЗА КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА ООЦИТИ

П. Тодоров

Институт по биология и имунология на размножаването – БАН

VITRIFICATION – EFFECTIVE METHOD FOR OOCYTES CRYOPRESERVATION

P. Todorov

Institute for biology and immunology of reproduction – BAS

При нормален овулаторен цикъл на жената се развива само един фоликул, съдържащ една яйцеклетка (ооцит), която евентуално би могла да бъде оплодена. В програмите за оплождане 'ин-витро' се използват препарати, предизвикващи едновременното съзряване на повече фоликули. Независимо от схемата, по която се стимулират яйчниците (протокол за овариална стимулация), целта е при пункция на предовулаторните фоликули да се аспирират повече от една яйцеклетки (обикновено 8-12). Ооцитите се оплождат чрез рутинно IVF или ICSI и на 2-5 ден след пункцията в матката на жената се трансферират 1-3 от получените зиготи. Останалите могат да бъдат замразени. Техниките за криоконсервация на предимплантационни ембриони (програмно замразяване и витрификация) са добре отработени и се използват рутинно в клиничната практика⁽¹⁾. По-голямо предизвикателство за ембриолозите представлява възможността за успешна криоконсервация на ооцитите преди оплождане.

Най-общо случаите, в които се налага замразяване на ооцити, са следните:

- Злокачествени заболявания (предстояща химио- или лъчетерапия, овариектомия). Следва да се отбележи, че при някои от тях хормоналната стимулация е противопоказана и в такъв случай се прибегва към криоконсервация на овариална тъкан;
- Фертилно "застраховане" (професионална кариера, отсъствие на партньор);
- Законови, религиозни и етични ограничения (напр. в страни като Италия, Германия, Австрия и др. замразяването на ембриони е забранено);
- Донация на ооцити;

- Медицински показания (остър хиперстимулационен синдром, невъзможност да се получи семенна течност в деня на процедурата и др.)

Вследствие биологичните си особености, ооцитите са сравнително "труден" обект за криоконсервация. За разлика от сперматозоидите и клетъчните култури, при които загубата на известно количество клетки в процеса на консервация не се отразява съществено на крайният изход, броят на получените ооцити е ограничен, всеки от тях се замразява индивидуално и следва да се подхожда с особено внимание. Може да се каже, че в случая важи принципа "всичко или нищо". В този аспект предимплантационните ембриони са значително "по-благодатен" обект за консервация, тъй като при криодеструкция на отделни бластомери останалите са в състояние да продължат развитието си.

Известно е, че ооцитите са най-големите клетки в човешкия организъм (около 180 пъти по големи от сперматозоидите). Правилната им форма обуславя ниското съотношение повърхност/обем. Това, както и високата им кумулативна маса, силно затруднява тяхната дехидратация и насищане с криопротектори. Наличието на "zona pellucida" също затруднява процеса. През първата седмица на ембрионалното развитие кумулативната маса на клетките намалява експоненциално, като при експандирането бластоцист тя е от 1:10 до 1:100 по-малка в сравнение с тази на ооцита. По подобен начин намалява и съдържанието на вода в клетките. Това е една от причините за по-добрата криотолерантност на ембрионите в сравнение с яйцеклетките.

Мембраните на ооцитите са силно чувствителни към температурните промени. Охлаждането предизвиква бърз фазов преход на липидите от течно в гелообразно състояние. Това е необратим процес, който е детриментален за бъдещото развитие. Интересен и за момента необясним е фактът, че на следващия етап – след оплождането, мембраните на зиготите стават по-криоустойчиви ⁽²⁾.

При криоконсервация се наблюдават промени в цитоскелета и делителното вретено на ооцитите. Те са следствие от различни фактори на процеса на нискотемпературна консервация – механични (образуване на вътреклетъчни кристали), термални (деполимеризация на микротубулите), химични и др. Увреждането на центриолите, както и загубата на микротубули води до анеуплоидия. Хромозомните аберации намаляват процента на оплождане и повишават честотата на ранните аборти ⁽³⁾. Макар и рядко, описани са случаи на конгенитални малформации при деца, заченати чрез оплождане на замразени ооцити.

Замразяването предизвиква промени в кортикалните гранули, което може да компрометира кортикалната реакция (респ. нормалното оплождане) при гаметите след криоконсервация ⁽⁴⁾. От друга страна, охлаждането на ооцитите до 4 °С, както и инкубирането им с някои криопротектори (ДМСО; 1,2-пропандиол) предизвикват втвърдяване на “zona pellucida” ⁽⁵⁾. Тези промени могат да бъдат избегнати чрез добавяне на фетален серум към средата за замразяване. Алтернативен подход е оплождане на размразените ооцити чрез ICSI.

Въздействието на различни химични и физични фактори предизвиква партеногенетична активация на яйцеклетките. Не са редки случаите, когато след криоконсервация се наблюдава партеногенеза ⁽⁶⁾. Всичко това предполага задълбочени криобиологични изследвания върху този вид биообекти.

Първите експерименти в областта на криоконсервацията на женски гамети са проведени през 1958 г. ⁽⁷⁾. През седемдесетте години на миналия век се появяват съобщения за успешно замразяване на миши яйцеклетки, довели до раждането на живо потомство ^(8,9). Първото бебе след успешно замразяване и оплождане на човешки ооцити се ражда през 1986 г. ⁽¹⁰⁾. В следващите 10 години в света се раждат още около 200 деца ^(11,12). През 1997 г. е осъществено успешно ICSI на размразена яйцеклетка ⁽¹³⁾. Във всички тези случаи като метод за криоконсервация се използва така нареченото “конвенционално” (програмно) замразяване. Характерни за него са бавните скорости на охлаждане и използването на ниски

дозы криопротектор (1,5М ДМСО или 1,2-пропандиол). Ниската успеваемост на метода налага търсенето на нови, алтернативни технологии за криоконсервация на човешки ооцити, включително витрификация.

Витрификацията е метод за криоконсервация, при който не се наблюдава образуване на кристали и системата замръзва в аморфно, стъклоподобно състояние. Това се постига чрез използването на свръхбързо замразяване (директно потапяне на пробите в течен азот, при което скоростта на охлаждане варира от 2,000 до над 20,000 °С/мин, в зависимост от вида на контейнера), висока концентрация на криопротекторите и малък обем на замразяваните проби ⁽¹⁴⁾. Първите опити за витрификация на живи клетки са проведени през 30-те години на миналия век ⁽¹⁵⁾. През 1985 г. е съобщено за успешна витрификация на 8-клетъчни миши ембриони ⁽¹⁶⁾. Понастоящем процедурата се използва рутинно в центровете за асистирана репродукция и в животновъдството за замразяване на предимплантационни ембриони. Има данни за успешна витрификация на ембрионални стволови клетки ⁽¹⁷⁾, на овариална тъкан ⁽¹⁸⁾, на мезенхимни стволови клетки ⁽¹⁹⁾ и др. Витрификацията има и някои преимущества в чисто технологичен аспект – не се изисква скъпоструваща апаратура (различни типове и видове програмни замразители) и специално обучен персонал, значително се съкращава времето за криоконсервация, намалява се разходът на течен азот.

Проучванията по свръхбързо замразяване на човешки яйцеклетки започват в Австралия в средата на 80-те години ⁽²⁰⁾. След 15-годишни изследвания в тази област трудът на учените се увенчава с раждането на първото бебе през 1999 г. ⁽²¹⁾. Успехът е постигнат след криоконсервация на 17 ооцита под защитата на етиленгликол (40%) и 0,6М захароза. През 2003 г. са публикувани резултатите от голяма серия изследвания относно възможностите за витрификация на женски гамети ⁽²²⁾. Авторите замразяват 474 кумулус-ооцитни комплекси (зрели и незрели), като за криопротектори използват 5,5М етиленгликол и 1,0М захароза. За ускоряване скоростта на охлаждане, клетките са замразени върху електронномикроскопски мрежички. Резултатите са 68,7% преживяемост, 71,7% оплождане, 6,4% имплантация и 6 родени бебета от 21 ембриотрансфера (21,4%). До март 2006 г. в световен мащаб са отчетени още 40 раждания и 51 развиващи се бременности ⁽²³⁾. Към момента, след витрификация на ооцити, са родени над 3000 бебета. В България първата и засега единствена бременност с използването на замразени яйцеклетки е получена в АГ Медицински Център “Димитров” през 2009 г. ⁽²⁴⁾. Следва да се отбележи, че сравнителните

проучвания убедително показват преимуществата на витрификацията пред програмното замразяване ^(25,26). По данни на различни автори, преживяемостта на ооцитите след програмно замразяване е между 40-60%, а процентът на оплождане - около 55%. След витрификация 85-96% от клетките запазват виталитета си, а процентът на оплождане достига 80%. При това не се наблюдават различия в развитието на така получените и контролните ембриони ⁽²⁷⁾. Мащабно проучване показва, че усложненията при раждане, теглото на новородените и честотата на конгениталните аномалии (2,5%) след витрификация на ооцити са съпоставими с тези при нормалното забременяване или рутинно IVF ⁽²⁸⁾.

Независимо от постигнатите успехи и все по-широкото прилагане на метода в клиничната практика, в областта на витрификацията на женски гамети има и ред дискуссионни въпроси. На първо място, това е стадият на развитие на ооцитите. Интересен и ненапълно изяснен феномен е промяната в криоустойчивостта им в процеса на матурация. Въпреки минималните разлики в размера и формата, незрелите клетки обикновено са по-чувствителни към процеса на криоконсервация от тези, намиращи се на стадий метафаза II. Почти всички получени до момента бременности са след витрификация на зрели ооцити. Доказано е, че процентът на оплождане им чрез ICSI (79,2%) не се различава достоверно от този при незазамразените (83,3%) ⁽²⁹⁾. На стадий профаза I ооцитите са по-малки, с плътно прилепнала "zona pellucida", латентен метаболизъм и пакетирани в ядрото хромозоми. Те се характеризират с по-ниска преживяемост (37%) и способност за матурация (20%) след криоконсервация ⁽³⁰⁾. Поради това се препоръчва, след получаване, незрелите яйцеклетки да се култивират известен период от време, необходим за тяхната матурация и след това да бъдат витрифицирани.

Спорен е въпросът дали трябва да се отделят кумулусните маси преди замразяване. Повечето автори поддържат идеята, че ооцитите трябва да бъдат денудирани преди витрификация ^(31,32). Други предлагат частично отделяне на кумулуса ⁽³⁰⁾. При криоконсервация на незрели ооцити не е желателно отделянето на кумулусните клетки, тъй като те подпомагат матурацията след размразяване.

Изборът на оптимален времеви интервал между размразяването и оплождането е важен, както за самата фертилизация, така и за последващото развитие на ембриона. Част от криоуврежданията се репарират в рамките на 1 до 3 часа след размразяване. Особено важна е реполи-

меризацията на делителното вретено. Времето за възстановяване на вътреклетъчните структури е в пряка връзка с избрания протокол за криоконсервация ⁽²⁶⁾. Повечето автори препоръчват оплождането да се извършва 2-3 часа след размразяване на ооцитите.

Съществуват и ред организационни въпроси - например дали да се замразяват всички получени ооцити, или само тези с добро качество и определена степен на зрялост. Някои екипи дори препоръчват преди криоконсервация да се прави PGD на полярното телце и да се замразяват само яйцеклетки без нарушения в хромозомния набор. От друга страна, не е ясно доколко нарушенията на zona pellucida и цитоплазмената мембрана, настъпващи при аспириране на полярното телце или други микроманипулации (напр. трансфер на цитоплазма), се отразяват на успеваемостта на последващото замразяване.

В повечето случаи, за защита на ооцитите при витрификация се използват среди, съдържащи комбинация от различни проникващи (ДМСО, етиленгликол, глицерол) и непроникващи (захароза, Фикол-70 и др.) криопротектори. Първоначално клетките се еквилибрират в среда, съдържаща сравнително ниски (1,5M) концентрации на веществата, след което се прехвърлят във витрификационния разтвор. Независимо от високата си токсичност, ДМСО е основен компонент на средите за витрификация. Наши изследвания показват, че отсъствието на ДМСО в разтвора редуцира съществено способността за матурация на човешки GV-ооцити след размразяване ⁽³³⁾. От друга страна, 5-минутната инкубация с веществото при 37 °C ги активира и води до партеногенетично делене.

Базирайки се на получените резултати, ние използваме краткотрайна експозиция (не повече от 1 мин) на гаметите при стайна температура във витрификационния разтвор, съдържащ ДМСО. Наред с по-ниската температура на еквилибрация (стайна или при 4 °C), някои автори препоръчват с цел намаляване токсичния ефект на ДМСО към криозащитните среди да се добавя ацетамид. Друг важен проникващ криопротектор в състава на средите е етиленгликолят. Веществото се отличава с ниска токсичност и добри криозащитни свойства, особено в комбинация с ДМСО. Присъствието на захароза в системата има значителен осмотичен ефект. Прибавянето ѝ към средата за замразяване води до дехидратация на клетките и стабилизиране на клетъчните мембрани. След размразяване, яйцеклетките се инкубират последователно в разтвори с понижаваща се концентрация на захароза с цел "отмиване" на

Метод	Автор, година
Straw	Rall and Fahy, 1985
Direct dropping into liquid nitrogen	Launda and Tepla, 1990
Electron microscopic grids	Steponkus et al, 1990
Minimum drop size (MDS)	Arav, 1992
Open pulled straw (OPS)	Vajta et al, 1992
Minimum volume cooling (MVC)	Hamawaki et al, 1999
Cryoloop	Lane et al, 1999
Glass micropipettes (GMP)	Kong et al, 2000
Solid surface vitrification (SSV)	Dinnyes et al, 2000
Hemi-straw system (HSS)	Vanderzwalmen et al, 2000
Cryotop	Kuwayama and Kate, 2000
Nylon mesh	Matsumoto et al, 2001
Closed pulled straw (CPS)	Chen et al, 2001
Flexipet denuding pipette (FDP)	Liebermann et al, 2002
Cryotip	Kuwayama et al, 2005
Cryoleaf	Chian et al, 2005
Direct cover vitrification (DCV) – for ovarian tissue	Chen et al, 2006

Табл. 1 - Методи за витрификация на ооцити и ембриони

проникващите криопротектори и последваща рехидратация на клетките. Фиколът е нейонен синтетичен полимер на захарозата. Добавянето му към разтвора за витрификация води до повишаване на вискозитета на средата. От разновидностите му най-широко приложение намира Фикол-70 (с молекулна маса 70 KDa). Следва да се отбележи, че в момента повечето фирми предлагат готови среди за витрификация и съответните протоколи за тяхното използване, което в значителна степен улеснява работата на ембриолозите. В чисто научен аспект, интерес представлява използването на естествени биологични антифризи (напр. вещества, изолирани от кръвта на някои арктически риби, възможността за инжектиране на непроникващи криопротектори в цитоплазмата на ооцита с помощта на микроманипулационни техники и др.)

Друг важен въпрос при витрификацията на ооцити е изборът на подходящ носител (контейнер). Основните изисквания към контейнера за витрификация са следните:

- малък обем на разтвора за витрификация (осигурява добра топлопроводимост, високи скорости на охлаждане, безкристално замръзване);
- да е достъпен и удобен за работа;
- да е сигурен (както по отношение на загуба на ооцитите, така и по отношение на евентуална контаминация).

При първите успешни опити за витрификация на ооцити и предимплантационни ембриони са използвани 0,25 мл пайети (conventional straw) ⁽¹⁶⁾. Замразяването се осъществява чрез директно потапяне на пайетите в течен азот или междинен хладоносител (напр. предварително охладен до -180 °C алуминиев окис). Методът е сравнително сигурен (пайетите се запечатват преди

замразяване, удобни са за маркиране) и все още се използва рутинно в животновъдството. Като недостатък следва да се отбележи сравнително големият обем, което не позволява достигането на достатъчно високи скорости на охлаждане. Съвременни модификации на метода са така наречените “OPS – open pulled straw, CPS - closed pulled straw, Hemi-straw system”, които се използват с успех в медицинската практика.

Има доста съобщения за успешна витрификация на ооцити и ембриони върху електронно-микроскопски мрежички (electron microscope copper grids). Ооцитите се поставят на повърхността на мрежичката, а долната ѝ част се поставя върху филтърна хартия с цел намаляване обема (попиване) на витрификационния разтвор, след което мрежичката се потапя в течен азот.

Широко използван в практиката е така нареченият “cryotop” метод. Устройството за замразяване се състои от фин полипропиленов връх (0,4 мм ширина x 20 мм дължина x 0,1 мм дебелина), върху който се поставят ооцитите, прикрепен към холдер. След потапяне в течния азот носителът се поставя в защитен пластмасов контейнер. Недостатък на метода е директният контакт на клетките с азота. Съществуват и редица други контейнери, които се използват както за витрификация на ооцити, така и на предимплантационни ембриони (табл.1).

Гореизложените резултати, както и собственият ни опит ни дават основание да твърдим, че витрификацията е ефективен метод за криоконсервация на женски гамети, който несъмнено ще намира все по-широко приложение в клиниките за асистирана репродукция, включително и в България.

Литература

1. Tucker M.J., Liebermann J. Vitrification in assisted reproduction. Informa Healthcare UK Ltd; 2007: p304
2. Ghetler Y., Yavin S., Shalgi R. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Human Reproduction* 2005, 20: 3385-9
3. Smith GD, Silva E., Silva CA. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *Reprod. Biomed. Online* 2004, 9: 171-8. Review
4. Agca Y., Liu J., Rutledge J. Effect of osmotic stress on the development at competence of GV and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol. Reprod. Development* 2000, 55: 212-9
5. Stachecki J., Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online* 2004, 9: 152-63
6. Isachenko V, Montag M, Isachenko E Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant *Fertility and Sterility* 2006, 3: 741-7
7. Sherman JK, Lin TP. Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958, 98: 902-5
8. Parkening TA, Tsunoda Y, Chang MC. Effect of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J Exp Zool* 1976, 197: 369-74.
9. Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . *J Reprod Fertil* 1977;49:89-94.
10. Chen G. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; 1: 884-6
11. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987, 2: 695-700
12. Tucker M, Wright G, Morton F, Shanguo L, Massey Y, Kort H. Preliminary experience with human oocytes cryopreservation using 1,2-propanediol and sucrose. *Hum Reprod* 1996, 11: 1513-5
13. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997, 68: 724-6
14. Shaw J.M., Jones G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedure for oocyte and embryos. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 583-605.
15. Luyet B. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodyn* 1937, 1:1-14
16. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313:573-5
17. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod* 2001; 16:2187-94
18. Isachenko V, Isachenko E, Todorov P., Cryobanking of human ovarian tissue for anti-cancer treatment: Comparison of vitrification and conventional freezing. *CryoLetters* 2009, 6: 449-54
19. Todorov P., Hristova E, Konakchieva R. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver. *Cell Biology International* 2010, in press
20. Trounson A., Peura A., Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Sterility* 1987, 5: 843-50.
21. Kuleshova L., Gianaroli L., Magli C. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction* 1999, 14: 3077-9
22. Yoon TK, Kim TJ, Park SE Live births after vitrification of oocytes in a stimulated IVF/ET program. *Fertil. Sterility* 2003, 79: 1323-6
23. Oktay K., Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2006, 86: 70-80
24. Тодоров П., Димитров Й. Първи случай на бременност в България след оплождане и трансфер на размразени яйцеклетки. 10-ти Национален Конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие, 23-26 Април 2009, Несебър
25. Cao YH, Xing Q., Li L. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil. Sterility* 2009, 4:1307-11
26. Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil. Sterility* 2009, 6: 2399-407
27. Magli MC, Lappi M, Ferraretti Impact of oocyte cryopreservation on embryo development. *Fertil Steril* 2009. Epub ahead of print
28. Chian RC, Huang JY, Tan SL Obstetric and perinatal outcome in 200 infants conceived from vitrified oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;16:608-10.
29. Rienzi L., Romano S., Albricci L. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Human Reproduction* 2010, 1:66-73
30. Kuwayama M., Vajta G., Kato O. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 2005, 11: 300-8
31. Chian RC, Son WY., Huang JY High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertil. Sterility* 2005, 84 (Suppl.1): S36
32. Lucena E., Bernal DP, Lucena C. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil. Sterility* 2006, 85: 108-11
33. Isachenko V, Nawroth F., Todorov P. Vitrification of pronuclear embryos: Research ground of aseptic technology and application for oocytes and blastocysts. *Embryology* 2007, 1: 3-13

Адрес за кореспонденция:

П.Тодоров, ИБИР-БАН

София 1113, бул. "Цариградско шосе" №73

E-mail: plamen@ivf.fzn.com

БЪЛГАРСКАТА АСОЦИАЦИЯ ПО РЕГЕНЕРАТИВНА МЕДИЦИНА



В ОБЩЕСТВЕНА ПОЛЗА ЗА РАЗВИТИЕТО НА СЪВРЕМЕННИ КЛЕТЪЧНИ БИОТЕХНОЛОГИИ

През 2009 година беше реализиран проект за създаване на неправителствена организация с общественополезна цел, която да обединява съвместните професионални усилия и интереси на български учени и специалисти в областта на ин-витро биотехнологиите, регенеративната медицина и клетъчната терапия – Българска Асоциация по Регенеративна Медицина, със седалище гр. София. Управителният съвет на организацията се състои от лекари и биолози, доктори и доктори на науките, представители на различни научни и клинично-приложни звена. Основаването на асоциацията беше продиктувано от острата нужда да бъдат популяризирани в България чрез разбираем и научно обоснован подход авангардните биотехнологии на базата на стволови клетки, постепенно формиращи в световен мащаб ново, бурно развиващо се медикобиологично направление. По този начин основната мисия на сдружението беше естествено формулирана като дейност в полза на информационното биотехнологично общество и приобщаването му към най-значимите високоспециализирани научни постижения.

В световен мащаб развитието на регенеративната медицина получи мощен тласък в последните години с поредица от научни открития в областта на биологията на стволовите клетки и тъканното биоинженерство, които придават на това ново направление все по-голямо значение в перспективите за лечението на тежки заболявания, за които няма подходяща специфична терапия. Пренасочването на човешки и капиталов ресурс в тази иновативна област се отразява в интензивното създаване на научно-изследователски и развойни структури, имащи за цел развитие и приложение на новите биотехнологии в хуманната и ветеринарната медицина. Бързо развиващата се мрежа от национални и международни неправителствени организации и научно-изследователски центрове в Европа и света, чрез

организираните от тях многобройни международни прояви за обучение и дискутиране на актуални проблеми оказват все по-осезаемо въздействие върху формирането на национални политики и привличането на инвеститорски интерес в тази област.

В България през последните години бяха регистрирани няколко банки за получаване и съхранение на стволови и репродуктивни клетки, сформират се звена, които заявяват сериозно участие в новата област чрез разработването на различни ниши от научно-приложни изследвания. Членове на асоциацията активно работят върху научни проблеми свързани с изясняване биологията и криобиологията на стволовите клетки, което намира израз в реномирани научни публикации у нас и в чужбина. За първи път под ръководството на ст.н.с. Пламен Тодоров в края на 2009 г. в България беше защитен научен труд за придобиване на докторска степен върху криоконсервацията на стволови клетки, изолирани от човешки фетуси. Чрез активна научно-приложна дейност в областта на ин-витро технологиите, амбицията на създателите на БАМ е асоциацията да се превърне в обединяващо звено за трансфер на научни технологии към практиката при съдействието на българския бизнес. Този процес може да бъде успешен само чрез обединяване и насочване усилията на всички участници в него към обществените нужди, за да успеем заедно да изградим национални стандарти в областта на клетъчната терапия и трансплантационната медицина в съгласие с европейските стандарти и директиви. Дали Българската Асоциация по Регенеративна Медицина ще успее да изпълни своята благородна мисия и да стане част от този процес може да покаже само бъдещето.

С пожелания за успех и уважение към всички Вас

Доцент Росица Конакчиева, избрана от Учредителното събрание за Председател на БАМ, е биолог по образование, доктор на биологичните науки, дългогодишен старши научен сътрудник в ИБИР-БАН и хоноруван преподавател в СУ „Св. Кл. Охридски“. Носител на множество престижни международни и национални отличия, водач изследовател, специалист по невроендокринология и клетъчна биология, експерт по алтернативни ин-витро методи към ЕК.

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*

Световната Здравна Организация (WHO) най-накрая призна безплодието за болест

СЗО, съвместно с Международния комитет за мониторинг на асистираните репродуктивни технологии (ICMART), формално призна инфертилитета за заболяване в новия международен речник на АРТ термините, публикуван едновременно във Fertility and Sterility и Human Reproduction. Според дефиницията в речника: "Безплодието е заболяване на репродуктивната система, дефинирана като невъзможност да се постигне клинична бременност в продължение на 12 и повече месеца на редовни полови контакти без прилагана контрацепция"

Според Dr William Gibbons, Президент на Американското общество по репродуктивна медицина (ASRM): "Това е крайъгълен камък в развитието на отношението към това състояние; ние приветстваме СЗО за това усилие и за ясното отношение към болестния статут на безплодието. Твърде дълго хората с това заболяване бяха negliжирани. Застрахователните компании (осигурителните системи) не покриват разходите за лечението, правителствата не влагат ресурси за изучаването му и в крайна сметка страдат пациентите. Надяваме се, че международното разпознаване на инфертилитета като заболяване ще позволи той да бъде третиран наравно с другите известни болести."

Новите ЕУ правила ще оскъпят значително IVF процедурите

Всички пациенти, които се подлагат на асистираните репродуктивни технологии, следва да бъдат скринирани между отделните опити за трансмисивни заболявания, според изискванията на директивите за донорство на тъкани и клетки. Това, обаче, води до значително нарастване на разходите за пациентите при извършване на последователни АРТ опити. До сега двойките бяха изследвани еднократно за трансмисивни

заболявания (HIV, хепатит В, хепатит С и сифилис) преди започване на терапията.

На заседание на Европейската комисия (ЕС) от 19-20 Октомври 2009 г. бе изказано становището, че всички пациенти следва да се изследват преди всеки опит за АРТ и това не е тема, която подлежи на национално интерпретиране чрез разпоредбите на отделните държави-членки (т.е. следва да очакваме, че и в България ще има нови, по-строги изисквания към предварителните изследвания на пациентите).

Понастоящем, в Европа, се осъществяват около 500,000 IVF (in vitro fertilisation), както и около 400,000 IUI (intrauterine insemination) процедури годишно. Според изчисления на Европейското общество по човешка репродукция и ембриология (ESHRE), се очаква това ново правило да струва на пациентите (респ. на осигурителните системи, където се покриват и изследванията) допълнително около 140 милиона Евро годишно. Към тези разходи следва да се добавят и тези за администрация, работни заплати, документация и други.

Според Prof Peter Braude, ръководител на секцията по женско здраве в King's College, London: "Тази нова интерпретация на ЕС директивата е от особено значение за специалистите по репродуктивна медицина, тъй като това значително ще повлияе себестойността на процедурите за лечение на безплодието и ще натовари както индивидуалните пациенти, така и здравно-осигурителната система (NHS). Докато донякъде сме склонни да приемем странната 'ЕС идея', че пробите семенна течност от съпруга са вид "партньорска донация" и могат да бъдат тествани поне еднократно за трансмисивни инфекции, то последното тълкование на тъканните директиви означава, че при всички двойки и мъжете и жените следва да бъдат тествани наново при всяка поредна процедура

за AP и то не само преди IVF, но и преди IUI процедурите, които могат да бъдат 2, 3 или повече в рамките на една година”

Dr Luca Gianaroli, Председател на ESHRE, приканва членовете на организацията да предприемат мерки и действия срещу “твърде тревожните сигнали”, идващи от ЕС при интерпретирането на изискванията на тъканните

директиви. Според него за повече от 30 години опит в областта на АРТ и над 15 милиона вече родени деца, не е имало нито един известен случай за трансмисия на вирусно заболяване (като HIV, хепатит или други, визирани в Директивите на ЕС).

Предстоящи научни форуми и събития

The 26th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology Rome, Italy
27 - 30 June 2010

Basic course on “Update on pluripotent stem cells (hESC and iPS)
Hands on course on “Derivation and culture of pluripotent stem cells
ESHRE Campus 2010
Barcelona Spain
8-12 February 2010

Basic Genetics for ART Practitioners
ESHRE Campus 2010
Porto, Portugal
16 April 2010

Preimplantation genetic diagnosis:
a celebration of 20 years
ESHRE Campus symposium
Rome, Italy
1 July 2010

The 1st International Congress on
Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells,
Tissue and Organs (CRYO)
Palacio de Congresos, Valencia, Spain, April 22-25, 2010

20th World Congress on Fertility and Sterility
Munich, Germany
September 12-16, 2010

PROF. DR. WILFRIED FEICHTINGER



Професор Файхтингер (Univ. Prof. Dr. Wilfried Feichtinger) е роден през 1950 г. във Виена. През 1975 г. завършва медицина във Виенския университет, след което специализира акушерство и гинекология. В областта на асистираната репродукция работи от 1978 г. В периода 1979 - 1982 г. е ръководител на програмата по оплождане "ин-витро" във Университетската АГ-болница във Виена, където през 1982 г. се ражда първото "ин-витро" бебе в Австрия. През 1983 г. заедно с д-р П. Кеметер създават Института по репродуктивна ендокринология и оплождане ин-витро. От 1991 г. е ръководител на Wunschbaby-Zentrum – един от водещите световни центрове в областта на асистираната репродукция. От 1988 г. е професор; автор е на повече от 200 научни труда, включително няколко монографии. Постоянно ръководи дипломни работи и дисертации в медицинския университет във Виена.

Проф. Файхтингер е президент на Австрийската асоциация по стерилитет, консултант е по репродуктивна медицина на световната асоциация по акушерство и гинекология (FIGO), участва в ръководството на редица международни организации. От 1998 до 2005 г. е президент на световната асоциация на центрoвете за асистирана репродукция (APART). Почетен член е и на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология. Многократно е награждаван за професионалната си дейност. Сред приносите му за развитието на асистираните репродуктивни технологии са:

- 1982 г. - раждане на първото бебе в епруветка в Австрия;
- 1984 г. - разработка и внедряване в практиката на използвания в момента метод за трансвагинална пункция на фоликулите под ултразвуков контрол (в сътрудничество с фирмата Kretz-Technik);
- 1990 г. - внедряване на метода "изкуствен хетчинг" (изтъняване на обвивката на ембриона с цел облекчаване на имплантацията) с помощта на лазер. Разработка на предназначено за целта устройство съвместно с фирмата LISA-Laser.
- 2000 г. - разработка на методи и апаратура за ултразвуковото изследване, даващи възможност за получаване на триизмерен образ.

Проф. Файхтингер е женен, има *седем* деца. Увелича се от подводен риболов, кара ски. Благодарение на прекрасния си глас проф. Файхтингер нееднократно е канен да участва в различни концерти, включително професионални. Няколко пъти е пял и във Виенската опера. В интервю пред Австрийски вестник през 2008 г. на въпрос, как му се удава да запазва своята работоспособност и да изглежда толкова млад за възрастта си, проф. Файхтингер отговаря: „не пуша, обичам да пия червено вино и да се веселя, занимавам се със секс вместо физкултура“.

ИЗИСКВАНИЯ КЪМ АВТОРИТЕ:

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

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

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

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

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

За повече информация и изпращане на материали:

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

E-mail: gnikolov@yahoo.com;

plamen@ivf.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



www.ecopharm.bg

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

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