

ЕМБРИОЛОГИЯ

embryology



СЪДЪРЖАНИЕ:

Криоконсервация на човешка овариална тъкан - нашият опит,
П. Тодоров, Р. Конакчиева, Й. Димитров,
Б. Славчев, В. Новачков.....4

Клонирание чрез нуклеарен трансфер,
Я. Тодоров, Т. Тодорова.....11

Ин-витро матурация (IVM) на човешки ооцити,
Д. Тачева, Г. Ингилизова, Д. Петрова и
Я. Владимиров.....16

CONTENTS:

Cryopreservation of human ovarian tissue - our experience,
P. Todorov, R. Konakchieva, Y. Dimitrov,
B. Slavchev, V. Novachkov.....4

Cloning using a nuclear transfer procedure,
I. Todorov, T. Todorova.....11

In-vitro maturation (IVM) of human oocytes,
D. Tacheva, G. Ingilizova, D. Petrova and
I.K. Vladimirov.....16

Редакционна Колегия:
Д-р Георги Николов - главен редактор;
Пламен Тодоров, дб - зам. гл. редактор

Членове:
Доц. д-р Иван Николов, дм;
Доц. Росица Конакчиева, дб;
Доц. Янчо Тодоров, дб;
Димитър Баров; д-р Иво Тодоров, дм;
Десислава Тачева, дб; д-р Георги Вакрилов;
Диана Гуленова

Чуждестранни членове:
д-р Владимир Исаченко - Германия
д-р Кристина Магли - Италия



Уважаеми читатели,

През последното десетилетие научните (в това число и медицински) списания се множат с експоненциално нарастващи темпове, така както се множат и сдруженията на тесните специалисти. Не мисля, обаче, че е редно да се поддам на модата и да започна да се извинявам за ангажирането на Вашето внимание с поредното издание на поредната асоциация. И мисля, че ще ме разберете, като спомена следните няколко факта:

1. В България вече повече от 20 години се работи в една супер-авангардна област - човешката репродуктивна биология (вкл. ембриология), без която биха били немислими повечето, да не кажа, всички съвременни асистиранни репродуктивни технологии;
2. Центровете, занимаващи се активно с асистиранни репродуктивни технологии (в частност "ин витро" оплождане и трансфер на ембриони), през последните години буквално "никнат като гъби след дъжд" - 2 през 1990 г.; 5 през 2000 г.; 15 през 2005 г.(!) и всички те имат своите опит и резултати;
3. У нас, както и в чужбина, бъдещето на медицинската наука през следващия век очевидно ще принадлежи на дженомикса, генната терапия, изследванията в областта и приложението на стволовите клетки и др. модерни технологии, пряко свързани с човешката репродукция и ембриология;
4. До момента нямаше организация на специалистите в областта на човешката репродуктивна биология, както и тяхно официално печатно издание;
5. Учудващо и за мен самия, името на списанието - "Ембриология" (Embryology) - беше изкушаващо свободно.

Добре, признавам си, не издържах на изкушението и ето, че току що обърнахме заедно началната страница на първия брой на списание "Ембриология". Оттук насетне ни очаква едно интересно "пътешествие" сред гамети, ембриони, в хранителни среди и клетъчни култури, стволови клетки и какво ли още не...

Всички коментари, мнения, идеи, статии (дано няма и много критики) са добре дошли за нашия редакционен екип, защото това списание всъщност е Ваше! То е Вашия форум - използвайте го.

И за да не Ви отегчавам повече, позволете ми да завърша, като пожелаая на всички колеги, работещи в областта на репродуктивната биология и асистираните репродуктивни технологии, много късмет, здраве и успехи през 2006 г.

Д-р Георги Николов,
(главен редактор)

БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ (БАРЧЕ)

BULGARIAN ASSOCIATION FOR REPRODUCTIVE HUMAN EMBRYOLOGY (BARHE)

На 10.11.2005 год. в гр. София бе учредено дружество с нестопанска цел "БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ (БАРЧЕ)". Асоциацията има седалище и адрес на управление в гр. София, ул. "Константин Иречек" 17. Съгласно (извадки от) приетия с единодушие Устав:

1. *Асоциацията има следните основни цели:* обединяване на работещите в областта на човешката репродуктивна ембриология и асистираните репродуктивни технологии лекари и биолози, с оглед повишаване на тяхната квалификация, клиничната и лабораторната им практика; популяризиране на методите на асистираната репродукция при човека сред населението и медицинските и научните среди в Р.България; разпространение у нас и в чужбина на достиженията на българската репродуктивна ембриология; подпомагане на процеса за обучение и създаване на компетентни кадри в областта на асистираните репродуктивни технологии, особено по отношение на биологичните и лабораторните им аспекти; подпомагане изграждането и сертифицирането на бази за осъществяване на асистираните репродуктивни технологии и др.

2. *В осъществяване на своите цели Асоциацията си поставя следните задачи:*

- а./да създаде платформа за изследователска дейност, наука и практика, която да дава отговори и решения на наболели въпроси и проблеми от областта на човешката репродуктивна биология и ембриология;
- б./да осигури постоянен форум за информационна размяна на теоретични и практически постижения в областта на репродуктивна биология и ембриология и асистираните репродуктивни технологии, включително и да организира вътрешни прояви - семинари, работни срещи и симпозиуми за своите членове и с участието на сходни организации и специалисти;
- в./да сътрудничи на държавните институции, научно-медицинските

дружества, лечебните заведения и други организации при въвеждането на асистираните репродуктивни технологии в ежедневната практика;

- г./да води специализирани дискусии на национално и международно равнище;
- д./да организира, стимулира и подпомага проучвания и проекти по отделни проблеми, свързани с човешката репродукция;
- е./да инициира, развива и подпомага образователни и квалификационни програми;
- ж./да установява взаимодействие със сходните български и чуждестранни сдружения, организации и институти.
- з./ да подпомага съответните институции при одит, сертифициране и лицензиране на дейности и звена, свързани с човешката репродуктивна ембриология и асистираните репродуктивни технологии.

3. *Предмет на дейност* - Асоциацията осъществява целите си посредством: организиране и провеждане на специализирани конгреси, симпозиуми, "кръгли маси", съвещания и други научни форуми с участието на биолози, ембриолози, акушер-гинеколози и медицински кадри от други сродни специалности в областта на репродуктивна биология и ембриология; организиране създаването и поддържането на Национален регистър към Асоциацията на АРТ-центровете в страната и извършваните от тях методики, както и на получените резултати; издаване и разпространение на научни разработки и други образователни материали - бюлетин (списание), учебници, монографии, практически ръководства, проспекти, образователни видеофилми, софтуер и други; осъществяване на контакти и членство в други сродни национални и сродни организации; осъществяване на образователна за населението дейност чрез контакти и колаборация със средствата за масова информация (телевизия, радио, вестници и списания, интернет - страници, пресконференции); провеждане на обучения и квалификационни курсове за групово и индивидуално обучение на кадри в

областта на човешката репродуктивна ембриология и асистираните репродуктивни технологии, както и издаване на сертификати за получена квалификация; събиране, разработване, обсъждане и предлагане на компетентните за това държавни органи и обществени институции внасянето на промени в законодателството, касаещи човешката репродуктивна биология и ембриология и в частност асистираните репродуктивни технологии; осъществяване на контакти с Министерство на здравеопазването, Комисията по здравеопазване към НС, неправителствени и благотворителни организации, колаборация с извънболничните и болничните заведения в страната с налична или бъдеща база асистирана човешка репродукция; набиране на средства за финансиране на национални форуми, издателска дейност и подпомагане изграждането на звена по асистирана човешка репродукция и репродуктивна биология.

4. *Имуществото на Асоциацията се състои* от движими и недвижими вещи, права върху вещи, пари, вземания, ценни книги, дялово участие в местни и задгранични дружества, право на собственост върху произведения на изкуството и културата и целеви средства от държавни органи, общини, юридически и физически лица, предоставени на сдружението за осъществяване на неговата дейност, както и целево имущество и финансови средства по програми и проекти.

5. *Финансирането на Асоциацията се осъществява чрез:*

- членски внос;
- целеви вноски от членовете;
- спонсорство, дарения и завещания от български и чуждестранни физически и юридически лица;
- средствата постъпили от осъществяването на предмета на дейност;
- други разрешени от закона източници.

6. *Членуването в Асоциацията* е доброволно, без ограничения по отношение на националност, етническа принадлежност, политически убеждения, раса, пол, религия. Членовете на Асоциацията запазват юридическа и икономическа самостоятелност. В Асоциацията може да членуват:

- а./индивидуални членове - дееспособни физически лица, съпричастни към целите на Асоциацията, работещи в областта на човешката репродуктивна ембриология и приемащи Устава му;
- б./колективни членове - юридически лица, чрез редовно избрани представители.

Приемането на членове става след подаване на писмена молба до Председателя на Асоциацията, в която следва да се посочи, че кандидатът приема Устава и споделя неговите цели. Молбата се докладва от Председателя и се гласува от членовете на Управителния съвет (УС) на първото заседание след подаване на молбата за членство. Решението на УС подлежи на обжалване пред Общото събрание (ОС) в едномесечен срок от узнаването му от заинтересуваните лица, на които е отказано членство. Членовете на Асоциацията имат права и задължения съгласно упоменатите в чл. 22 - 25 от Устава. Прекратяването на членство е уредено в чл. 26 - 29 от Устава.

7. *Ръководни органи на Асоциацията са:* Общото събрание (ОС); Управителния съвет (УС); Председателя на Асоциацията и нейния Секретар. Съгласно Чл.39 Асоциацията се управлява от Управителен съвет (УС), който се избира за срок от 3 (три) години, като до избирането на нов, старият УС продължава да изпълнява своите функции. УС се състои от 5 (пет) члена, избрани от ОС на Асоциацията. Членовете на УС могат да бъдат преизбрани без ограничение в броя на мандатите. Според Чл.45. Председателят и Секретарят на Асоциацията се избират от ОС с квалифицирано мнозинство за срок от 3 (три) години измежду членовете на УС. Председателят на Асоциацията е и председател на УС.

Общото събрание с консенсус избира следния Управителен съвет:

- Д-р Георги Иванов Николов - председател;
- Пламен Тодоров Тодоров, дб - секретар;

Членове:

- Десислава Тачева-Владиминова, дб;
- Димитър Панчев Баров;
- Д-р Иво Йорданов Тодоров, дм.

На 18.11.2005 г. с решение No.1 по ФД No. 12952 / 2005 г. на ФО на СГС Асоциацията бе официално вписана в регистъра на юридическите лица с нестопанска цел.

Д-р Г. Николов,
Председател на БАРЧЕ

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА ЧОВЕШКА ОВАРИАЛНА ТЪКАН - НАШИЯТ ОПИТ

П. Тодоров, Р. Конакчиева, Й. Димитров *, Б. Славчев *, В. Новачков **

Институт по биология и имунология на размножаването - БАН

* СБАЛАГ "Майчин дом" - София

** УМБАЛ "Света Ана" - София

CRYOPRESERVATION OF HUMAN OVARIAN TISSUE - OUR EXPERIENCE

P. Todorov, R. Konakchieva, Y. Dimitrov *, B. Slavchev *, V. Novachkov **

Institute of Biology and Immunology of Reproduction

* *University Hospital "Maichin dom", Sofia*

** *University Hospital "Sveta Ana", Sofia*

Резюме: Криоконсервацията на овариална тъкан е нова биотехнология, разработена с цел създаване на герминативни банки. Развитието ѝ се свързва с възможностите за възстановяване на женските репродуктивни функции, увредени в следствие на определено заболяване, химиотерапия и др. В България през 2001 г. е стартирана фундаментална изследователска програма върху приложението на овариалната криоконсервация и трансплантация в асистираната репродукция и лечението на инфертилитет при жената, в която са включени представители на академични и клинични центрове. След създаването на криобанка за овариална тъкан тази област привлече още по-силен интерес у специалистите и бе даден нов тласък за развитието ѝ.

Abstract: The cryopreservation of ovarian tissue is a biotechnology which was developed in order to bank oocytes to counter the loss of all viable eggs following a medical treatment, disease or premature menopause. Ovarian cryopreservation may be used to restore fertility and normal ovarian hormone production without the need of hormone replacement therapy. A basic research program on the application of ovarian cryopreservation and transplantation in IVF treatment and infertility was started in Bulgaria in 2001 including academic and clinical centers. Since the establishment of a cryobank of human ovarian tissue there has been a growing interest and merit scientific developments into the field. The potential impact of ovarian cryopreservation upon assisted fertility and in the restoration of ovarian function following cancer treatment or menopause is being discussed.

Криоконсервацията на овариална тъкан е сравнително ново направление в репродуктивната медицина. Специалистите виждат в тази биотехнология възможност за съхраняване на фертилитета на млади пациентки с онкологични заболявания, преждевременно отпадане на яйчниковата функция и др. Известно е, че повечето онкотерапевтични агенти са цитотоксични, а гонадите са чувствителни към такива въздействия, особено към влиянието на алкилиращи агенти и йонизираща радиация. Нарастналите възможности на онкологичната медицина позволяват на много пациенти да бъдат успешно лекувани и да имат дълга преживяемост. За съжаление те не могат да възстановят репродуктивния си потенциал след високите дози химиотерапия, а около 20% губят и стероидогенезата си. Замразяването на овариални фрагменти преди началото на терапията може да се разглежда като потенциална стратегия за запазване на фертилитета на тези жени. Създаването на

овариалните тъканни банки се базира на принципа на криорезистентността (устойчивост към замразяване) на овариалната тъкан. Овариалният кортекс съдържа хиляди фоликули, които, за разлика от яйцеклетките, могат успешно да бъдат замразявани. Сравнително ниският метаболизъм, липсата на *zona pellucida*, отсъствието на делително вретено са в основата на по-високата криорезистентност на примордиалните фоликули в сравнение с големите растящи фоликули. Малките размери на фоликулите улесняват бързото проникване на криопротекторите (вещества с криозащитни свойства, които се добавят преди замразяване). Автотрансплантацията на криоконсервирана овариална тъкан би довела до възстановяване на фертилитета на пациентите след химиотерапия. Друг възможен подход е култивирането на размразените примордиални фоликули с последващо оплождане *in vitro* на съдържащите се в тях ооцити и трансфер на така получените ембриони в матката на жената ^(1,2).

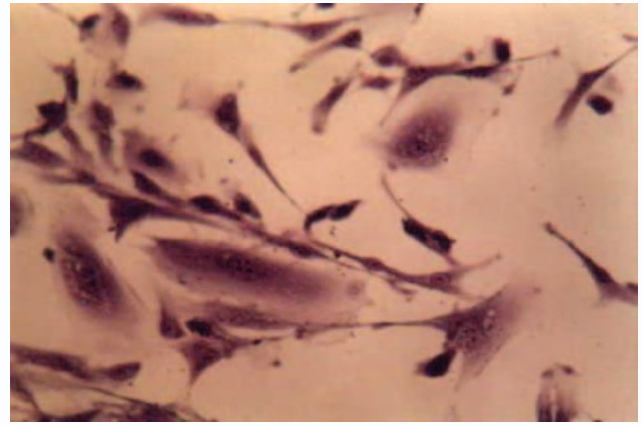
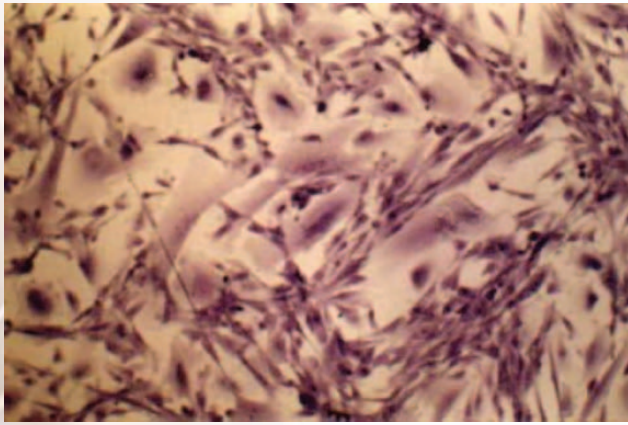
За пръв път за замразяване на парчета яйчници от мишки с последваща трансплантация и раждане на живи малки е съобщено през 1960 г. ⁽⁶⁾. По-късно методът е приложен и при други видове лабораторни и селскостопански животни ^(4,5). В специализираната литература през последното десетилетие се появяват и доста съобщения за успешно замразяване на човешка овариална тъкан ⁽⁶⁻⁸⁾. През октомври 2004 г. е съобщено за първото родено бебе, Тамара, след автотрансплантация на замразена овариална тъкан на жена с лимфома на Ходжкин ⁽⁹⁾. Впоследствие още няколко екипа от различни страни съобщават за родени деца след трансплантация на овариална тъкан ^(10,11). В момента в много страни функционират криобанки, в които се съхранява тъкан от жени с онкологични заболявания и предстояща химиотерапия.

Биотехнологията за криоконсервация на овариална тъкан е многоетапен процес, в който участват специалисти от различни области. След провеждане на предварителни изследвания и попълване на съответните документи (декларация за информирано съгласие, договор за замразяване и съхранение на овариалната тъкан и др.) се пристъпва към самата процедура. Тъканта се получава чрез лапароскопия или мини-лапаротомия през ранната фоликуларна фаза на цикъла. Обикновено се отделя само единият яйчник или част от него с цел запазване на нормалната секреторна активност на втория яйчник. Кортексът се нарязва на малки фрагменти, които след неколкратно промиване се замразяват и съхраняват при -196 °C. За намаляване на криоуврежданията в състава на средите за замразяване се включват различни криопротектори (диметилсулфоксид, етиленгликол, захароза и др.). Яйчниковата тъкан се замразява с помощта на програмен биофризер (контролирано програмно замразяване) или чрез витрификация ⁽¹²⁾. Технологията за бавно програмно замразяване с последващо бързо размразяване се използва успешно от доста екипи, но за съжаление не е оптимална. Тя е разработена за консервация на изолирани единични клетки, докато тъканите са изградени от различни клетъчни типове. Това води до затруднения при подбора на подходящи криопротектори и скорости за замразяване. Поради тази причина в последните години усилията на специалистите са насочени към внедряване в практиката на технологии за витрификация на овариалната тъкан. Сроковете за съхранение са практически неограничени. Моментът за размразяване и трансплантация на овариалните фрагменти зависи преди всичко от успеха на онкотерапията и физиологичното

състояние на жената. Трансплантацията може да бъде както ортотопна, така и хетеротопна. И при двата вида трансплантация хормоналната продукция се възстановява след няколко месеца - от 3 до 5 по данни на различни автори ⁽¹³⁾. При ортотопната трансплантация размразените фрагменти се прикрепват абдоминално, близо до фалопиевата тръба или върху останалия яйчник, с което се цели постигането на естествена овулация и концепция. Първата такава трансплантация при хора е осъществена през 2000 г. от американски специалисти ⁽¹⁴⁾. При хетеротопната трансплантация овариалната тъкан се трансплантира подкожно на предната коремна стена, в ръката между лакътя и китката или други места с добра васкуларизация. Това е технически по-проста процедура, но при нея бременност може да бъде постигната единствено след пункция на фоликул и *in vitro* оплождане на получената яйцеклетка с последващ ембрио-трансфер.

В България изследванията в тази област започват през 2000 г. в рамките на договор за съвместна научно-изследователска и приложна дейност между Института по биология и имунология - БАН и АГ Център "Димитров". С помощта на специалисти от Института по проблемите на Криобиологията и криомедицината към Украинската академия на науките са направени първите опити за криоконсервация на човешка овариална тъкан. На базата на внедряване на световните достижения и проведените научни експерименти година по-късно е създадена единствената засега в нашата страна криобанка за човешка овариална тъкан ⁽¹⁵⁾. През 2004 г. е осъществена първата в страната автотрансплантация на човешка овариална тъкан на жена след лечение на Ходжкинов лимфом ⁽¹⁶⁾. През последната година благодарение на добрата колаборация със специалистите-онколози значително се увеличава количеството пациенти, желаещи да ползват услугите на криобанката. Към замразяване се пристъпва при различни заболявания (Синдром на Гърнър, Ходжкинов лимфом, карцином на маточната шийка, на млечната жлеза и др.). Прави впечатление, че списъкът на заболяванията, при които се препоръчва криоконсервация на овариална тъкан, непрекъснато се допълва и разширява. При повечето ракови заболявания не се наблюдават метастази в яйчника, което дава възможност за бъдеща трансплантация на замразената тъкан.

Наред с практическото приложение на метода в нашата страна се наблюдава и засилен научен интерес към тази важна за медицината област. Отработени са методики за култивиране на



Фиг.1. Монослойна култура човешки овариални клетки (H&E)

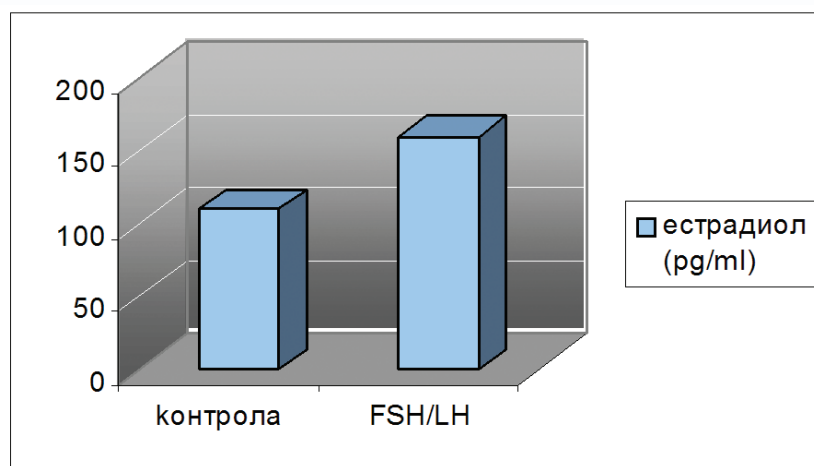
овариални клетки и тъканни фрагменти *in vitro*. Наблюденията показват, че монослойна смесена култура от човешки овариални клетки се характеризира *in vitro* с добра способност за пролиферация, базална секреция на стероидни хормони (естрадиол и прогестерон) и запазен капацитет за конвертиране на андрогени (Фиг.1).

Добавянето към средата за култивиране на гонадотропни хормони (комбиниран ФСХ/ЛХ препарат) води до стимулиране на секрецията на 17-β естрадиол от овариалните клетки (Фиг.2) и може да бъде използвано за функционален тест за секреторната активност на клетките ⁽¹⁷⁾.

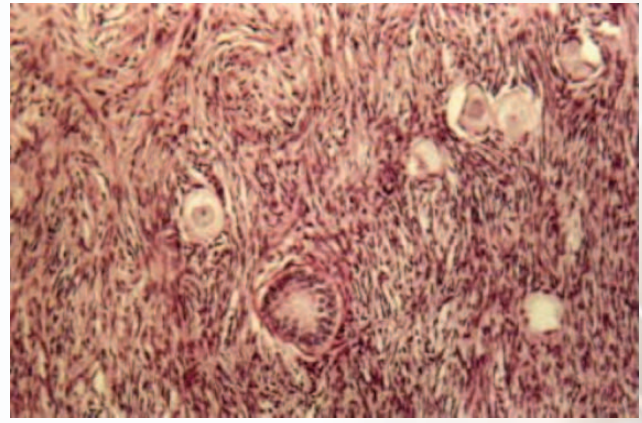
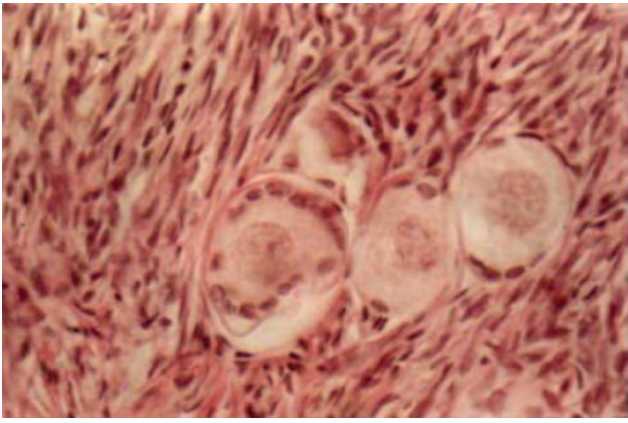
При тъканно култивиране върху милипорови филтри след известен латентен период (2-3 денонощия) се наблюдава адхезия на овариалните фрагменти към субстрата, миграция на клетъчни елементи по филтъра и формиране на растящи зони около "изходния" фрагмент. Наред с миграцията се наблюдава митоза, както и значително количество клетки на стадий телофаза. След около 2-седмично култивиране ръстът и развитието на културата се

забавя, в повечето периферни клетки се наблюдава неспецифична дегенерация, изразяваща се преди всичко в пикнотизация на ядрото. Пикът на секрецията на стероидни хормони е в периода 6-8 ден култивиране.

Изследвано е токсичното действие на широка гама екзо- и ендоцелуларни криопротектори и техни комбинации върху овариалните клетки. Установено е, че етиленгликолят е по-слабо токсичен за човешките овариални клетки от глицерола и диметилсулфоксида ⁽¹⁸⁾. През 2004 г. към катедра "Клетъчна биология" на биологическия факултет успешно е защитена дипломна работа на тема "Морфофункционални характеристики на човешки овариални клетки след третиране с различни криопротектори". Предложена е ефективна технология за витрификация на овариални фрагменти. Методът се базира на използването на предварително охладен до -196 °С междинен хладоносител (алуминиев окис) и комбинация от висококонцентрирани разтвори на проникващи (етиленгликол и глицерол) и непроникващи (захароза и Фикол-70) криопротектори.



Фиг.2. Базална и стимулирана секреция на 17-β естрадиол от човешки овариални клетки при култивиране *in-vitro*



Фиг.3. Човешка овариална тъкан след криоконсервация (H&E)

След размразяване, така консервираната тъкан запазва напълно морфофункционалните си показатели (морфологична цялост, пролиферативен потенциал, базална и стимулирана секреция на естрогени, ароматна активност и др.) при култивиране *in vitro* (Фиг.3).

Отработена е методика за изолиране на примордиални и първични фоликули от свежа и криоконсервирана овариална тъкан. В момента се работи по оптимизиране на условията за култивиране на изолирани фоликули.

През 2002 г. изследванията са финансирани от Съвета по медицинска наука към Медицински университет - София (проект 19/2003 "Морфофункционални показатели на човешка овариална тъкан след различни методи на криоконсервация" с ръководител д-р Й. Димитров). За успешно изпълнение на проекта колективът е удостоен с почетен знак "*Signum Laudis Pro Scientae Meritis*" за най-успешна научна разработка в област "медицина" за периода 2002 - 2003 г. Резултатите са докладвани на редица наши и международни форуми^(19,20).

Независимо от постигнатите успехи и наблюдаваната тенденция за все по-широко внедряване на метода за криоконсервация на овариална тъкан, в практиката следва да се отбележи, че остават ред нерешени проблеми както от чисто научно, така и от практическо естество:

- успеваемостта на метода все още е твърде ниска. До момента само две от публикуваните съобщения за успешно раждане след трансплантация на криоконсервирана овариална тъкан са официално потвърдени;
- няма отработена методика за култивиране *in vitro* на размразените примордиални фоликули. Това ограничава възможностите за *in vitro* матурация и оплождане на

- яйцеклетките и последващ трансфер на получените ембриони в матката на жената;
- невъзможно е замразяването на цял яйчник. Размерите на замразяваните фрагменти овариална тъкан са ограничени до няколко милиметра (с цел облекчаване проникването на криопротекторите и ограничаване вредните въздействия на процеса на криоконсервация). Малките размери затрудняват последващата трансплантация;
- преживяемостта на фрагментите след трансплантация е сравнително кратка - до няколко месеца. Наблюдават се случаи на исхемични увреждания, проблеми с неоваскуларизацията и др.;
- не е напълно проучен риска от трансмисия на туморни клетки при трансплантация на размразената тъкан;
- етични проблеми (свързани например с ксенотрансплантация) и др.

Всичко това предполага продължаване и задълбочаване на изследванията по криоконсервация на овариална тъкан. При практическото приложение на метода несъмнено следва да се отчита международният опит и да се съблюдават общоприетите медицински стандарти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тодоров П., Стаменов Г., Димитров Й. Криоконсервация на човешка овариална тъкан - поглед в бъдещето. *Репродуктивно здраве* 2002, 3: 12-16
2. Kim S.S. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertility Sterility* 2006, 85, 1: 1-11
3. Parrot D. The fertility of mice with orthopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J. Reprod. Fertility*, 1960, 1: 230-232
4. Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 °C. *Human Reproduction* 1994, 4: 597-603

5. Wolvekamp MC, Cleary ML, Cox SL, Shaw JM, Jenkin G, Trounson AO. Follicular development in cryopreserved Common Wombat ovarian tissue xenografted to nude rats. *Anim. Reprod. Sci.* 2001, 1-2: 135-147
6. Newton H., Aubard Y., Rutherford A., Sharma V., Gosden R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Human Reprod.* 1996, 7: 1487-1491
7. Oktay K., Newton H., Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil. Sterility* 2000, 3: 599-603
8. Oktay K., Buyuk E., Veeck L., Zaninovich N., Xu K., Takeuchi T., Opsahl M., Rosenwaks Z. Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004, 13: 837-840
9. Donnez J., Dollmans M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J., Martinez-Madrid B., Van Langendonck A. Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 2004, published online September 24
10. Lee DM, Yeoman RR, Battaglia DE, Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB, Fanton JW, Wolf DP. Live birth after ovarian tissue transplant. *Nature* 2004, 11: 137-138
11. Dor J., Meirou D. Ovarian tissue storing is an effective technique for fertility preservation. *13th World Congress on In-vitro Fertilization, Assisted Reproduction and Genetics. Istanbul, Turkey, May 26-29, 2005*
12. Salehnia M., Mohadam E., Velojerdi M. Ultrastructure of follicles after vitrification of ovarian tissue. *Fertil. Sterility* 2002, 3: 644-646
13. Kiran G., Kiran H., Coban Y., Guven A. Ovarian cortical transplantation may be alternative to hormone therapy in patients with early climacterium. *Fertility Sterility* 2005, 84, 5: 1509-1512
14. Oktay K., Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. *N. Engl. J. Med.* 2000, 342: 1919-1921
15. Тодоров П. Кр̀иоконсервацията на репродуктивни клетки и тъкани - важно звено програмите за асистирана репродукция. *Репродуктивно здраве* 2004,2:
16. Стаменов Г., Доганов Н., Тодоров П., Димитров Й., Лазаров Р. Ор̀тотропна ав̀тотрансплантация на човешка овариална тъкан на жена след лечение на Ходжкинов лимфом. *Шести Национален Конгрес по Стерилитет, Контрацепция и хормонзаместителна терапия с международно участие, Боровец* 2005.
17. Todorov P., Konakchieva R., Stamenov G., Todorov I., Novachkov V., Dimitrov Y. In vitro stimulation of the secretion of 17- β estradiol and progesterone in a primary ovarian cell culture. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 2002, 55, 6: 111-115
18. Todorov P., Stamenov G., Todorov I., Novachkov V., Dimitrov Y., Konakchieva R. Evaluation of the secretory capacity of ovarian tissue after treatment with different cryoprotectants by in vitro culture system. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 2002, 55, 3: 103-108
19. Stamenov G., Todorov P., Konakchieva R., Dimitrov Y., Novachkov V. Cryobanking of human ovarian tissue - experience from Bulgaria. *1st World Congress on Ovarian Cryopreservation & Ovarian Transplantation, 27-28 June 2003, Brussels*
20. Todorov P., Stamenov G., Konakchieva R., Dimitrov Y., Novachkov V. In-vitro evaluation tests of the functional viability of human ovarian tissue before and after freezing. *X Ybilee International Symposium of Immunology of Reproduction. 4-6 September 2003, Varna*

Адрес за кореспонденция:

Пламен Тодоров

Институт по биология и имунология на размножаването - БАН

София, 1113

plamen@ivf.zzn.com

КЛОНИРАНЕ ЧРЕЗ НУКЛЕАРЕН ТРАНСФЕР

Я. Тодоров, Т. Тодорова

Институт по животновъдни науки - Костинброд

CLONING USING A NUCLEAR TRANSFER PROCEDURE

I. Todorov, T. Todorova

Institute of Animal Science, Kostinbrod

Резюме: През последните години методите за получаване на генетично идентични животни се развиха стремително. Най-простият метод е разделянето на ембриона на две или четири части и трансфер върху реципиенти. Друг метод е инжектирането на ядра от тотипотентни клетки в цитоплазмата на неоплодени яйцеклетки. До 1997 година не бе отбелязан успешен случай на нуклеарен трансфер с използване на соматични клетки. След успешните експерименти на учените от Института Рослин бяха получени живи приплоди от голям брой видове животни. При хората проблемът не е толкова от техническо, колкото от морално естество. Целта на настоящата статия е да се дискутират различните типове клониране и проблемите свързани с тяхното прилагане при хората. Акцентът е главно върху репродуктивното и терапевтичното клониране, както и върху някои морални и етични аспекти.

Abstract: In the past few years, there has been a phenomenal progress in producing genetically identical mammalian multiplets by asexual means. The simplest method is to divide embryos (the morula) into two, three, or four parts and transfer the parts to surrogate mothers for gestation to term. Another approach is to inject nuclei from totipotent cells into the cytoplasm of unfertilized eggs. Until present time production of identical animals from cells different from embryonal cells was impossible. With the work of Wilmut et al. (1997) it has become a reality. The fact, also generated uncertainty over the meaning of "cloning" - a term traditionally used by scientists to describe different processes for duplicating biological material. The goal of this article is to discuss the different types of cloning and making the best possible decisions. The following two types of cloning technologies will be discussed: reproductive cloning, and therapeutic cloning as well some ethical and moral aspects.

Възможността за клониране на хора, благодарения на работата на учените от института Рослин⁽¹⁾, предизвика голям интерес и породи голямо безпокойство сред хората по целия свят поради своите научни и етични последици. Това постижение за пореден път предизвика дискусия за значението на термина "клонинг", обикновено използван от учените при описание на различни процеси за дублиране на биологичен материал.

Какво представлява клонирането? Има ли различни видове клониране?

Най-широкото разпространение на термина "клонинг" е във връзка с метода, наречен "репродуктивно клониране". В света на сексуалната репродукция животът започва при оплождането, след съединяването на сперматозоида и яйцеклетката. Напълно развитите, зрели, многоклетъчни организми (хора, животни) започват своето развитие от една клетка (зигота) и се оформят след многобройни клетъчни деления и клетъчни диференциации. Следователно, теоретически, всяка клетка на даден многоклетъчен организъм трябва да има еднакъв генетичен състав (с изключение на мутациите).

Различните типове клетки функционират различно; функционалните, фенотипни различия са резултат главно на селективна експресия на определени гени, докато други гени са неактивни по време на ембрионалното развитие и диференциране. Въпросът, който възниква, е дали определени диференцирани клетки, ако се поставят в определена среда, могат да бъдат реактивирани, за да дадат начало на друг тип клетки или тъкани (плюрипотентни) или даже цял организъм (тотипотентни).

В последно време се говори и за други видове клониране освен за получаване на генетически идентични индивиди. Основно се обсъждат три вида технологии за клониране, а именно:

1. рекомбинантна ДНК или клониране на ДНК;
2. репродуктивно клониране;
3. терапевтично клониране.

В статията ще бъдат дискутирани последните две.

Репродуктивно клониране

Това е технология, използвана за получаване на индивид, който има същата ДНК като съществуващ или изчезнал индивид. Овцата

Доли бе получена чрез репродуктивно клониране. С използването на процес, наречен "нуклеарен трансфер на соматична клетка", изследователите прехвърлят генетичен материал от ядрото на донорна соматична клетка в яйцеклетка, чиито хромозоми са отстранени. Реконструираната яйцеклетка, съдържаща ДНК на донорната клетка се третира с определени химически вещества или електрически ток, за да се активира и да се стимулира развитието. След достигане на определен стадий, полученият ембрион се връща в матката на реципиент до раждането.

Доли и другите животни, получени чрез нуклеарен трансфер, фактически не са абсолютно идентични клонове на донорното животно. Само нуклеарната ДНК е идентична (като се изключат мутациите) с донорната ДНК. Митохондриалната ДНК произлиза от реципиентната яйцеклетка. Тъй като митохондриите са органелите, които осигуряват енергията на клетката се счита, че те влияят директно на продуктивните качества на животните. Предполага се, че мутациите в митохондриалната ДНК играят важна роля и в процеса на стареене. Раждането на Доли е много важно, понеже доказва, че генетичен материал от специализирана клетка, програмирана да експресира само гените, необходими за функцията на клетките на вимето, може да бъде препрограмизирана да даде начало на нов организъм. Някои учени твърдят, че грешки в процеса на репрограмирането или непълното репрограмиране водят до голямата смъртност и малформации, наблюдавани при клонирани животни. Тук е мястото да се каже, че тези постижения са изцяло адаптирани методики, разработени още през 50-те и 60-те години на миналия век. Техниките са ползвани за пръв път от Briggs and King при жаба (*Rana pipiens*)⁽²⁾. При тези експерименти авторите показват, че ядра от бластулни клетки, инжектирани в цитоплазмата на ооцит, могат да поддържат развитието до нормални ларви⁽³⁾. Тъй като по-нататъшното развитие е било нарушено, те са доказали, че тези ядра са плурипотентни (а не тотипотентни). Но при по-късни експерименти след трансфер на бластулни ядра, се стига до развитие на зрели организми, както при *Rana pipiens*, така и при *Xenopus laevis*^(4,5). Доказано е, че клетъчната диференциация не винаги води до необратими промени в ядрото⁽⁶⁾. Ядра получени от диференцирани клетки на чревен епител от ларви на *Xenopus laevis*, инжектирани в енуклеирани яйцеклетки, водят до получаването на малък брой зрели организми^(7,8).

От друга страна ядра, получени от диференцирани клетки на зрели организми, водят развитието само до ларви, които не претърпяват метаморфоза до зрели организми^(9,10). Наблюдава се подобно спиране в развитието след инжектиране на ядра от лимфоцити в яйцеклетки⁽¹¹⁾. Постигнатите резултати от нуклеарният трансфер при амфибии са много впечатляващи и окуражаващи, но подобни експерименти при бозайници са били разочароващи, особено при основният експериментален вид животни в ембриологията - мишката⁽¹²⁻¹⁵⁾. McGrath стига дотам да твърди, че клонирането при бозайници е невъзможно. Но експериментите на Willadsen с овце⁽¹⁶⁾ и Prather *et al.* с говеда⁽¹⁷⁾ са успешни и водят до получаване на живи приплоди при тези видове животни. Чрез използване на подобни методи в редица лаборатории успешно са клонирани няколко вида животни (овце, кози, говеда, прасета, кучета, котки, зайци, мишки)⁽¹⁸⁻²⁷⁾. Опитите за клониране на маймуни, птици и коне от соматични клетки засега са неуспешни. Това може да се дължи на видови различия, но по скоро трябва да се индивидуализира метода за клониране според вида на животното.

Терапевтично клониране

Терапевтичното клониране, наричано още "клонирание на ембриони", цели създаване не на човешко същество, а по скоро получаване на стволови клетки, които могат да се използват за изучаване развитието на човека и за третиране на някои болести. Стволовите клетки са важни за биомедицинските изследвания, понеже могат да генерират всеки тип специализирани клетки на човешкото тяло. Те се получават от бластоцисти, които в процеса на изолирането на вътреклетъчната маса се разрушават. Това от своя страна повдига много въпроси, свързани с етиката и морала. Въпреки това, учените се надяват един ден стволовите клетки да се използват при лечение на сърдечни заболявания, болест на Алцхаймер, множествена склероза, рак и други заболявания.

Как могат да се прилагат методите на клониране?

Рекомбинантната ДНК технология е важна за изучаването на други подобни технологии, като напр. генна терапия, генно инженерство и разчитане на генома. Генната терапия може да бъде използвана за третиране на определени генетични проблеми чрез използване на вирусен носител, който вкарва коригирани копия на увредените гени в клетките на гостоприемниковия организъм. Гени от други организми, които например подобряват вкуса и

хранителната стойност или придават устойчивост към определени заболявания могат да бъдат използвани за генно инженерство на зърнени храни, зеленчуци и плодове. За секвениране на генома, фрагменти от хромозомална ДНК се вкарват в различни клониращи вектори за получаване на фрагменти с подходящ размер.

Ако се подобри успеваемостта на метода (овцата Доли бе получена след 276 неуспешни опита!), *репродуктивното клониране* може да бъде използвано за размножаване на животни със специални качества, напр. животни произвеждащи определени лечебни субстанции или генетично променени животни, които могат да служат като модели за изучаване на човешките болести. Репродуктивното клониране може да бъде използвано за умножаване на популациите на застрашени животински видове или животни, които се размножават трудно. През 2001 година е роден първият клон на застрашен вид диво животно, гаур⁽²⁸⁾. Тук за първи път е приложен междувидов клонинг, като за реципиентни клетки са използвани яйцеклетки от крава. За съжаление новороденият гаур умира от инфекция 48 часа след раждането си. През 2001, Loi P. *et al.*, докладват за успешно клониране на муфлон⁽²⁹⁾, който е жив и се радва на добро здраве в зоопарк в Сардиния. Други застрашени видове, потенциални кандидати за клониране, са африканската антилопа бонго, тигъра от Суматра и гигантската панда. Най-голямото предизвикателство пред учените е клонирането на изчезнали видове, понеже и реципиентната клетка и приемната майка ще бъдат от видове различни от клона.

Терапевтичното клониране може да бъде използвано при хора за получаване на цели органи от единични клетки или получаване на здрави клетки, които да заменят увредените при дегенеративни болести като напр. Алцхаймер или Паркинсон. Все още предстои много работа, докато терапевтичното клониране стане реална възможност за третиране на заболявания.

Може ли да се клонират органи за трансплантация?

Учените се надяват, че един ден терапевтичното клониране може да бъде използвано за получаване на тъкани и органи за трансплантация. За да се постигне това се трансплантира ядро от клетка на пациента в енуклеирана яйцеклетка. След достигане на стадий бластоцист се изолират стволовите клетки. Тези клетки могат да бъдат използвани за получаване на орган или тъкан, които да се

трансплантират без риск от несъвместимост. Това, до голяма степен, би намалило нуждата от донорски органи за трансплантация. Все още са налице много препятствия преди трансплантирането на клонирани органи да стане реалност. Трябва да се развият по-ефективни технологии за получаване на човешки ембриони, изолиране на стволовите клетки и получаване на органи от тях.

През месец февруари 2002 година учени от биотехнологичната компания Advanced Cell Technology докладват, че успешно са трансплантирали подобни на бъбреци органи на крава⁽³⁰⁾. Те клонират ембрион от крава като използват соматична клетка, изолирана от ухото на животното. Въпреки огромният обем работа извършен върху изолирането на стволови клетки при крава, все още резултатите са нищожни. Затова учените използват друг вариант. Те трансплантират клонирания ембрион и го оставят да се развие във фетус. След изваждане на фетуса на 56 ден чрез цезарево сечение изолират тъкани от него. Тези тъкани се трансплантират върху донора на ембриона. В продължение на три месеца след трансплантацията не са наблюдавани признаци на отхвърляне на тъканта. Друго възможно приложение на клонирането на органи за трансплантация е създаването на генетично модифицирани прасета, от които да се получават органи, подходящи за трансплантация у хора (ксенотрансплантация). Тук възниква въпроса "защо прасета, а не примати, които генетически са по-близо до хората?".

Приматите се размножават с много по-малка скорост от прасетата, а освен това са трудни за клониране. От животинските видове, които са клонирани успешно до момента, свинските тъкани и органи са най-близко до човешките. Иммунната система на хората бързо отхвърля трансплантираните свински тъкани, понеже те отделят захар, наречена α -1,3-галактоза, която е таргет за клетките на имунната система. Целта на учените е да инактивират гените, които са отговорни за синтеза на ензима, пренасящ тази захар до повърхността на клетката. Тези гени се отстраняват чрез "knock-out" в индивидуални клетки, които се използват като донори на ядра. През 2002 г., британската биотехнологична компания PPL докладва, че са успели да получат "double knock-out" прасета, при които липсват и двете копия на гена отговорен за отхвърлянето на трансплантите. Все още предстои много работа по изследване на възможностите за ксенотрансплантация на органи от прасета.

Какви са рисковете от клонирането?

Репродуктивното клониране е скъпо и много неефективно. Повече от 90% от опитите за получаване на жизнен приплод са неуспешни. Средно са необходими около 100 процедури за нуклеарен трансфер за получаване на един жизнен клон. В добавка към ниската степен на успех, при клонираните животни се наблюдават проблеми с имунната система, повишена податливост на инфекции, тумори и други малфункции. Изследвания на японски учени показват, че клонираните мишки са с влошено здравословно състояние и умират в ранна възраст. Около една трета от клонираните живородени телета умират в ранна възраст, а голям процент от тях при раждане са с ненормално голямо тегло. В тази връзка трябва да се отбележи, че този феномен се наблюдава и при телета, получени чрез конвенционални *in vitro* методи. Може би това се дължи и на средите за култивиране и манипулациите. Този въпрос, обаче, се нуждае от допълнителни изследвания преди да се твърди категорично, че това е проблем свързан с клонирането. Все още броят на клонираните животни е недостатъчен и не са събрани категорични данни за продължителността на живота им, както и за неговото качество. Добрите жизнени показатели в ранна възраст не са гаранция за продължителен живот. При много клонинги се наблюдава внезапна и мистериозна смърт. Например първата овца клонирана в Австралия умира внезапно без никакви видими признаци за влошаване на състоянието и аутопсията и не успява да обясни причината за смъртта.

През 2002 г. изследователи от Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts, докладват, че геномите на клонирани мишки са увредени ⁽³⁶⁾. При анализ на повече от 10,000 чернодробни и плацентарни клетки от клонирани мишки те откриват, че около 4% от гените не функционират нормално. Уврежданията не се дължат на мутации на гените, а на промени в нормалната активация или експресия на определени гени. Проблемите може да възникват от програмни грешки в генетичния материал на донорната клетка. При нормалната репродукция ембриона получава по едно копие на даден ген от майката и бащата. Чрез процес наречен "imprinting" химически се маркира ДНК на майката и бащата, така че само един ген (майчиния или бащиния) се активира. Дефекти при импринтинга на ДНК от клонирането на една единствена донорна клетка само би довело до мултиплициране на проблема.

Трябва ли да бъдат клонирани хора?

Лекари от American Medical Association и учени от American Association for the Advancement of Science изказаха мнение срещу репродуктивното клониране на хора. В повечето страни правителствата, също така, излязоха с официални становища срещу репродуктивното клониране. Както бе посочено по-горе, засега неефективните процедури по клонирането, големият процент малформации и високата смъртност при клонираните животни водят до извода, че клонирането на хора ще бъде неетично, тъй като същите проблеми, по всяка вероятност, ще се наблюдават и при клонираните хора. Освен това не е известно как клонирането ще се отрази на умствените качества. Докато фактори като интелект и поведение не са важни за една крава или мишка, те са от извънредно голямо значение за развитието на едно човешко същество. С толкова много въпроси, които все още не са намерили отговор, всеки опит за клониране на човешко същество се счита за потенциално опасен и етично безотговорен.

В тази връзка може да се дискутира и безотговорното поведение на корейските учени, ръководени от Dr Woo Suk Hwang от Националния университет в Сеул, които през 2004 година породиха големи надежди за пробив в областта на получаването и поддържането на линии от човешки стволови клетки. По-късно те бяха разобличени от международната научна общественост и по този начин да дискредитираха усилията на много други учени. Скандалът може да доведе до намаляване или спиране на средствата за изследвания в тази област и то при колективи, които нямат никаква вина.

Това идва да потвърди, че етиката не се отнася само за репродуктивното клониране, а при всяко изследване свързано с хора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilmut, I., A.E.Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind and K.H.S. Campbell, 1997, *Nature*, 385, 810-13
2. Briggs, R. and King, T.J., 1952, *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)* 38, 455-463.
3. King, T.J. and Briggs, R, 1955, *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)* 41, 321-325.
4. Gurdon, J.B., 1962, *Devel.Biol.*, 5, 68-83.
5. McKinnel, R.G. 1962, *J.Hered.*, 53, 199-207.
6. Gurdon, J.B. 1986, *J.Cell Sci.,Suppl.*, 4, 287-318.
7. Gurdon, J.B., 1962, *Devel.Biol.*, 5, 68-83.
8. Gurdon, J.B. and Uehlinger, V. 1966, *Nature*, 210, 1240-1241.
9. Di Berardmo, M.A. and Hoffner, N. 1971, *J.Exp.Zool.*, 176, 62-72.
10. Gurdon, J.B. 1975, *J. Embryol. Exp.Morph.*, 34, 93-112.
11. Wabl, M.R., Brun, R.B. and Du Pasquier, L. 1975, *Science*, 190, 1310-1312.
12. McGrath, J.S. and Solter, D. 1983a, *Science*, 220, 1300-1302.

13. McGrath, J.S. and Solter, D. 1983b, *J.Exp.Zool.*, 228, 355-362.
14. Robl, J.M., Gilligan, B., Critser, E.S. and First, N.L. 1986, *Biol.Reprod.*, 34, 733-739.
15. Smith, L.C., Wilmut, I. and Hunter, R.H.F. 1988, *J.Reprod.Fert.* 84, 619-624.
16. Willadsen, S.M. 1986, *Nature*, 32, 63-65.
17. Prather, R.S., Barnes, F.L., Sims, M.M., Robl, J.M. and First, N.L., 1987, *Biol. Reprod.*, 37
18. Bondioli, K.R., Westhusin, M.E. and Looney, C.R., 1990, *Theriogenology*, 33, 165-174.
19. Collas, P. and Robl, J.M., 1990, *Biol.Reprod.*, 43, 877-884.
20. Heyman, Y., Chesne, P. and Renard, J.P. 1990, *C.R.Acad.Sci.Paris*, 311, 321-326.
21. Kono, T., Kwon, O.Y. and Nakahara, T. 1991, *J.Reprod.Fert.*, 93, 165-172.
22. Stice, S.X. and Robl, J.M. 1988, *Biol.Reprod.*, 39, 657-664.
23. Smith, L.C. and Wilmut, I. 1989, *Biol.Reprod.*, 40, 1027-1035.
24. Willadsen, S.M. 1989, *Genome*, 31, 956-962.
25. Heyman, Y., Chesne, P. and Renard, J.P. 1990, *C.R.Acad.Sci.Paris*, 311, 321-326.
26. Yang, X., Jiang, S. and Foote, R.H. 1991, *Theriogenology*, 35:298 (abs).
27. Chesne, P., P.G. Adenot, C. Viglietta., M. Baratte, L. Boulanger and Jean-Paul Renard. 2002, *Nature Biotechnology* 20, 366-369.
28. Lanza R.P., Cibelli J.B., Diaz F., Moraes C.T., Farin P.W., Farin C.E., Hammer C.J., West M.D., Damiani P. *Cloning*. 2000;2(2):79-90.
29. Loi, P., Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M. *Nature* 2001; 19:962-964
30. Lanza, R.P., H.Y. Chung, J.J. Yoo, P.J. Wettstein, C. Blackwell, N. Borson, E. Hofmeister, G. Schuch, S. Soker, C.T.Moraes, M.D. West and A. Atala. *Nature Biotechnology*, 2002, 20, 689 - 696.
31. Humpherys, D., K. Eggan, H. Akutsu, A. Friedman, K. Hochedlinger, R. Yanagimachi, E.S. Lander, T.R. Golub and R. Jaenisch. *Proc Natl Acad Sci USA*. Published online September 16, 2002.

Адрес за кореспонденция:
 Д-р Янчо Тодоров
 Ж.к. Бъкстон, бл. 160, А, 21
 1618, София
 Тел./факс: 855 0920
 GSM: 088 842 0763
 E-mail: ianchot@abv.bg

ИН-ВИТРО МАТУРАЦИЯ (IVM) НА ЧОВЕШКИ ООЦИТИ

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

¹ Център по Репродуктивна медицина и оплождане *ин витро* - София;

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

IN-VITRO MATURATION (IVM) OF HUMAN OOCYTES

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

¹ Center of Reproductive medicine and IVF, Sofia;

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

Резюме: *Ин витро* матурацията (IVM) на човешки ооцити е нов метод с големи перспективи за асистираните репродуктивни технологии. Методът се изразява в зреење на ооцитите *ин витро* от стадий герминален везикул (GV) до стадий метафаза на второто мейотично делене. Клиничното приложение на IVM се увеличава с оптимизиране на протоколите за изолиране на незрели яйцеклетки и условията за култивиране на ооцити и ембриони. С цел реализиране на висок процент клинични бременности, бъдещите изследвания в тази област трябва да акцентират върху регулацията на цитоплазмената матурация и изясняване на въздействието на произвежданите от ооцитите фактори върху активацията на генома на зиготата и способността ѝ за ембрионално развитие.

Ключови думи: *матурация / IVM / IVF / човешки ооцити*

Abstract: *In vitro* maturation (IVM) of human oocytes is an emerging assisted reproductive technology with great promise. The basis of IVM is the maturing of oocytes *in vitro* from the germinal vesicle stage (GV) to the metaphase II stage. Advances made in immature oocyte isolation and oocyte and embryo culture conditions have increased the clinical feasibility of IVM. In order to achieve a higher percent of clinical pregnancies, future studies should focus on characterization and regulation of oocyte cytoplasmic maturation and how oocyte-derived factors influence zygotic genome activation and embryonic development competence.

Key words: *maturation / IVM / IVF / human oocytes*

Растеж и зреење на ооцита

Ин витро матурацията на ооцитите не е просто активация на намиращата се в покой гамета, а по-скоро кулминация от серия подготвителни процеси, които се осъществяват по време на растежа на яйцеклетката.

Репродукцията е биологичен процес, който се изразява в размножаване на видовете и интеграция на генетичното разнообразие. Способността на ооцита за оплождане и развитието на генетично уникално поколение се дължи на основни процеси като растеж, развитие и хромозомни модификации. При индивида от женски пол герминалните клетки започват мейотично делене в ранните фази на вътреутробното развитие (около 11 гестационна седмица), като с раждането броят на ооцитите е вече детерминиран - 1-2 милиона яйцеклетки, които са блокирани в профаза I на мейозата. Те остават в тази фаза до пубертета^(1,2). По време на репродуктивния живот на жената не повече от

400 фоликула (яйцеклетки) достигат до овулация. Голяма част от фоликулите претърпяват обратно развитие (атрезия). Завършването на първото мейотично делене се осъществява само след като ооцита и заобикалящият го фоликул са претърпели продължителен растеж. Фазата на активен растеж на фоликула е свързана с пролиферация на гранулозните клетки, диференциация на тека клетките и увеличаване на диаметъра на ооцита - от 30 μm до 120 μm . По време на неговия растеж се наблюдава увеличаване броя на цитоплазмените органели и поява на нови структури, т.нар. *кортикални гранули*⁽²⁾. Характерни за този стадий са активна транскрипция и трансляция, водещи до натрупване на запаси от протеини, необходими за по-късните фази от зреењето на яйцеклетките, което съответно подпомага и ранното ембрионално делене.

Ооцитът секретира гликопротеини, които се структурират около него и формират прозрачна

неклетъчна обвивка, наречена *zona pellucida*, която го отделя от заобикалящите го гранулозни клетки. Въпреки това, контактът с ооцита се поддържа чрез цитоплазмени израстъци, които проникват през *zona pellucida* и формират т.нар. *gap junctions* по повърхността на яйцеклетката. Те дават основа за обширна вътреклетъчна комуникационна система между гранулозните клетки (фиг. 1).

С настъпване на овулацията, транскрипцията се преустановява, в резултат на което ооцита и ранния ембрион са зависими от майчините запаси от рибонуклеинови киселини (РНК) и протеини до активирането на ембрионалния геном и иницирането на синтеза на РНК. Счита се, че при човека ембрионалната транскрипция започва на 4-6 клетъчен стадий от развитието⁽³⁾.

Матурацията на ооцитите се дефинира като реинициация на първото мейотично делене, прогресия до метафаза II (МII) и съгътстващите цитоплазмени процеси в яйцеклетката, които са от съществено значение за оплождането и подпомагат ранното ембрионално развитие. За да бъде успешен процесът на зреене, в яйцеклетката трябва да се осъществят ядрена и цитоплазмена матурация⁽⁴⁾.

Ядрената матурация представлява възобновяване на мейозата в ооцита и достигането му до метафаза на второто мейотично делене. Изразява се в разпадане на ядрената мембрана, разделяне на хомоложните хромозоми и екструзия на първото полярно телце в перивителното пространство (Фиг. 1-3). Ооцитите, блокирани в профаза I на мейозата, се характеризират с видимо ядро, известно още като *герминален везикул*. С възобновяването на мейозата се осъществява разпадане на герминалния везикул (GVBD, *germinal vesicle breakdown*). Това е моментът, в който мейозата отново се блокира, очаквайки сигнал за реинициране съвместно с пенетрацията на сперматозоида.

Освен тези ядрени промени, при зреенето се осъществяват и цитоплазмени такива, които са от важно значение за процеса на оплождане и способността на яйцеклетката за по-нататъшно развитие. Тези промени определят т.нар. *цитоплазмена матурация*. Характерни за нея са продукцията и присъствието на специфични фактори, релокализация на цитоплазмените органели и посттранскрипционна модификация на информационна РНК, която се е натрупала при оогенезата. Ядрената и цитоплазмената матурация са

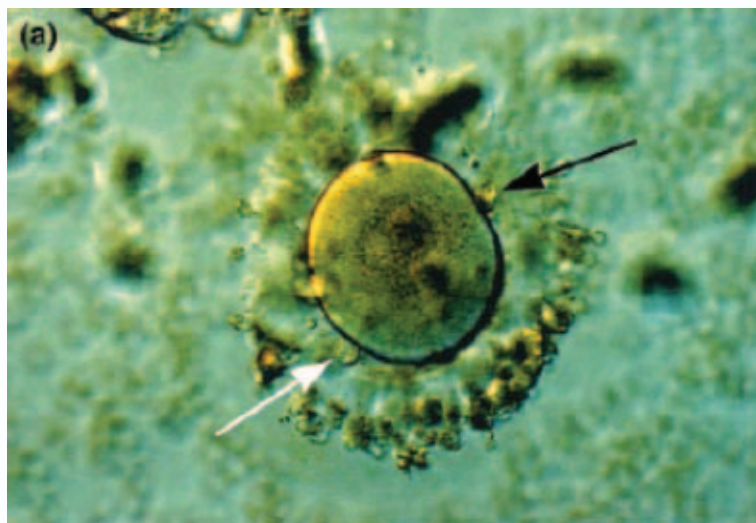
неразделни, взаимносвързани процеси. Те са високо координирани по време на нормалните репродуктивни цикли, но тази връзка може да бъде разединена чрез технологиите на ин витро матурацията⁽⁵⁾.

Въпреки способността на ооцитите да завършват ядрена матурация, цитоплазмената им матурация може да е непълна, поради което възобновяването на мейозата е недостатъчен белег, характеризиращ способността за развитие⁽⁶⁾. В повечето случаи, непълната цитоплазмена матурация на ооцитите е свързана с осъществяване на цитоплазмено репрограмиране като резултат от неизвестни за сега причини⁽⁷⁾. Установено е, че ин витро зрелите ооцити в МII имат намалено съдържание на протеини, в сравнение със зрелите ин vivo ооцити^(8,9). От друга страна, Sathananhan⁽¹⁰⁾ установява чрез трансмисионна електронна микроскопия на зрели ооцити, че няма разлика в ултраструктурата на ин vivo и ин витро зрелите яйцеклетки. Зрелият ооцит има основните клетъчни органели като митохондрии, лизозоми и гладък ендоплазмен ретикулум. Рибозомите са разпръснати и липсва зърнест ендоплазмен ретикулум. Това, заедно с ниското ниво на активност на комплекса на Голджи отразяват неактивния характер на зрелите овоцити по отношение на протеиновата синтеза и секреция. Най-важните периферни органели са кортикалните гранули, които играят специална роля в процеса на фертилизация. Те произлизат от повърхността на комплекса на Голджи по време на растежа и стадия на герминален везикул.

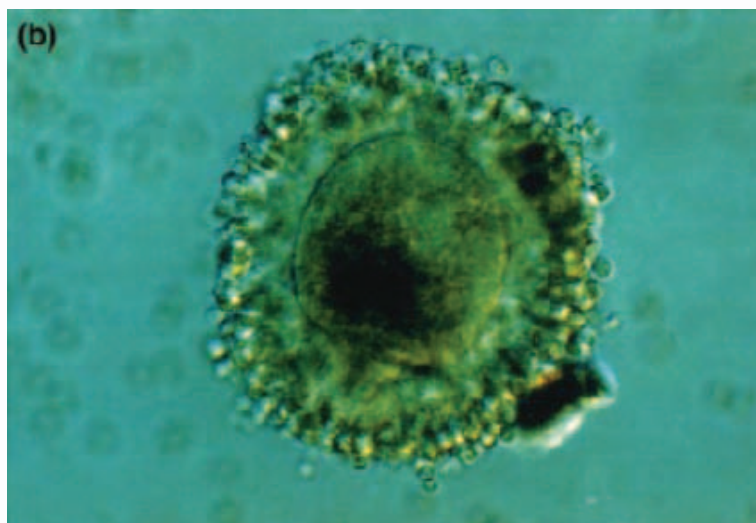
Редица проучвания показват, че все още не са идентифицирани събитията, които определят завършването на матурацията на ооцита. Важен критерий за качеството на ооцитите се счита оценяването на ембрионалното им развитие след оплождане⁽¹¹⁾. Неуспешната цитоплазмена матурация често се свързва с проблеми в клетъчното делене и предимплантационното развитие⁽⁶⁾.

Регулацията на матурацията на ооцитите е сложен процес, който не е напълно изяснен. Значението на факторите, повлияващи матурацията на ооцитите и нейното инхибиране са проучени при животински модели ин витро^(12,7). Според Schultz *et al.*⁽⁸⁾ от важно значение за прогресията на ооцитите от стадий герминален везикул до стадий МII, както и за поддържането на МII, е протеиновата синтеза, която е различна преди и след GVBD. Поддържането на яйцеклетките на бозайниците в профаза I на мейозата се повлиява от редица фактори, включващи цикличен аденозинмонофосфат

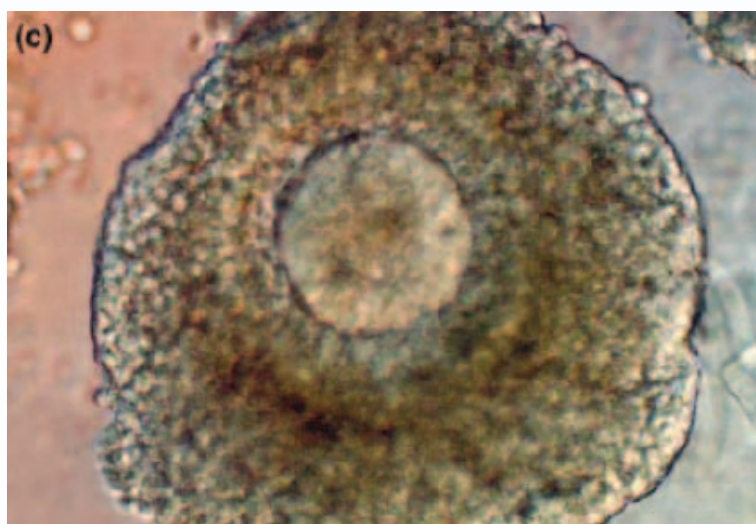
Фиг.1:
Човешки ооцит след ин витро матурация с видимо първо полярно телце (черна стрелка) и остатъци от цитоплазмените израстъци на кумулусните клетки (бяла стрелка).



Фиг. 2:
Ооцит на стадий герминален везикул, заобиколен от кумулусни клетки.



Фиг. 3:
Ооцит на стадий герминален везикул, заобиколен от фоликуларни гранулозни клетки



(сАМР), наред с ензимните системи участващи в регулацията на сАМР, както и вътреклетъчните взаимодействия между кумулусните клетки и между кумулусните клетки и ооцита⁽¹³⁾.

Матурация на ооцити в човешката асистирана репродукция

Процедурата по ин витро оплождане - ембриотрансфер (IVF-ET) е доказан метод за лечение при различни форми на безплодието. Първото успешно приложение на ин витро метода е осъществено на естествен цикъл⁽¹⁴⁾. Ин витро процедурата на естествен цикъл обаче, се свързва с проблеми като риск от прекъсване, незадоволително развитие на фоликулите, липса на ооцит при аспирацията по време на фоликуларната пункция, отсъствие на оплождане, респ. и ембриотрансфер.

Гонадотропните препарати се прилагат за стимулация на яйчниковите структури, с цел образуване на множество фоликули обикновено в продължение на 10-12 дни. Подновяването на мейотичната матурация на ооцита се индуцира чрез еднократно инжектиране на hCG (човешки хорион гонадотропин) по време на късната фоликуларна фаза. Преждевременното покачване на нивото на лутеинизиращия хормон (LH) в серума, водещо до неконтролирана индукция на овулацията, може да бъде избегнато чрез същевременно прилагане на гонадотропин релизинг хормон (GnRH) агонист или антагонист.

В сравнение с естествения цикъл, отговорът на това лечение е по-предсказуем и трансфера на няколко ембриона увеличава шансовете за бременност⁽¹⁵⁾. Не е за пренебрегване, обаче, цената платена от пациентите (в буквален и преносен смисъл). Някои жени са екстремно сензитивни при стимулация с екзогенни гонадотропини и при тях е повишен рискът от развитие на овариален хиперстимулационен синдром (OHSS), водещ до хоспитализация на около 2-3 % от случаите. Тежките форми на OHSS понякога предизвикват усложнения като белодробен тромбоемболизъм, бъбречна недостатъчност, респираторен дистрес (ARDS) и в много редки случаи - смърт. От друга страна, все още не са известни евентуални бъдещи странични ефекти върху здравословното състояние на организма и репродуктивната система след приложението на гонадотропини. Редица автори лансират хипотезата, че в някои случаи, по-ниската степен на имплантация при трансфериране на ембриони с добро качество е в резултат на намаляване рецептивността на маточната лигавица, в следствие на

свърхфизиологичните хормонални нива по време на стимулация. Безпокойство буди и фактът, че при чести стимулации в неопределено бъдеще има риск от поява на яйчников и ендометриален карцином и особено карцином на млечните жлези. Освен това, не е ясно дали множеството стимулации не биха довели до ранно изчерпване на яйчниковия резерв.

Поради тези причини се проучват и обсъждат алтернативни възможности за лечение на безплодието чрез асистирана репродуктивни технологии (ART). **Ин витро матурацията (IVM)** на незрели яйцеклетки се явява потенциален подход, елиминиращ посочените по-горе рисковете.

През 1969 г. Edwards *et al.*⁽¹⁶⁾ за първи път докладват за успешно оплождане на човешки ооцити матурирани ин витро. Първата бременност и раждане на дете след матурация на човешки ооцити е съобщена през 1983 г. от Veek *et al.*⁽¹⁷⁾ През 1994 г. Trounson *et al.*⁽¹⁸⁾ съобщават за първа бременност и раждане на здраво дете след ин витро матурация на незрели ооцити, аспирирани от пациентка с поликистозен овариален синдром. Следващата година Barnes *et al.*⁽¹⁹⁾ съобщават за успешна бременност при пациентка с поликистозен овариален синдром (PCOS), лекувана чрез IVM, комбинирана с интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди (ICSI) и асистирано излюпване на ембриони (assisted hatching, AH).

Кои са предимствата на този метод?

- по-малък риск за пациентите (рискът от OHSS е равен на нула);
- кратък период на лечение;
- намалява финансовите разходи за лечение.

При кои случаи е подходящо лечение чрез IVM?

- жени с висок риск от овариален хиперстимулационен синдром (OHSS);
- случаи с поликистозен яйчников синдром (PCOS);
- всички случаи, при които е налице необходимост от лечение чрез IVF процедура.

Децата родени чрез IVM

Публикуваните данни сочат, че не се увеличава процентът на вродените малформации при децата родени след IVM, в сравнение с децата родени чрез IVF и ICSI процедури.

Заклучение:

IVM е метод, който може да се използва за лечение на някои форми на безплодие, без необходимост от хормонална стимулация.

IVM може да се прилага като възможна линия на поведение преди стимулация с гонадотропини, т.е. последователността на терапията би била следната: вътрематочна инсеминация (IUI) - Ин Витро Матурация (IVM) - стимулиран IVF цикъл. В бъдеще ин витро матурацията на незрели ооцити, вероятно, би могла да замести стандартната стимулирана IVF процедура при селектирани пациенти.

Проучванията в областта на IVM имат за цел да усъвършенстват условията за зреене на човешките ооцити ин витро, да оптимизират методите за замразяване на изолирани от яйчника незрели ооцити, което е от важно значение за съхраняване на фертилността при деца и млади жени, лекувани от злокачествени заболявания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Driancourt M-A, Gougeon A, Royere D *et al.* (eds): *Reproduction in Mammals and Man. Ellipses, Paris 1993, pp. 281-305.*
2. Gougeon A 1996 Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis. *Endocrine Reviews* 17, 121-155.
3. Braude P, Bolton V and Moore S. Human gene expression first occurs between the four and eight cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-61
4. Gary D. Smith: In Vitro Maturation of Oocytes. *Current Women's Health Reports* 2001, 1:143-151.
5. Eppig JJ: Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:485-9.
6. Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M and Chesnel F: Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994;164:1-9.
7. Fulka J Jr, First NL and Moor R: Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:41-9.
8. Schultz GA, Gifford DJ, Mahadevan MM, Fleetham JA, Taylor PJ: Protein synthetic patterns in immature and mature oocytes. In Jones JR, HW and Schrader C (eds) *In vitro fertilization and assisted reproduction. Ann NY Acad Sci* 1988, 541; 237-247.
9. Trounson A, Anderiesz C and Jones G: Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reprod* 2001; 121: 51-75.
10. Sathananthan AH: Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 1997;10:21-38.
11. Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL and Watanabe S: Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: Follicle stimulation hormone and insulin. *Biol Reprod* 1998; 59:1445-53.
12. Heikinheimo O and Gibbons WE: The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insight into reproductive medicine. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:745-56.
13. Wasserman PM and Albertini DF: The mammalian ovum. In *Physiology of Reproduction, second edition, edited by Knobel E and Neil JD. Raven Press. Ltd., NY, 1994; 79-122.*
14. Steptoe PC and Edwards RG: Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;ii: 366.
15. Mikkelsen AL: Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reproductive BioMedicine Online* 2005, 10 (5): 593 - 9.
16. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC: Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969;221: 632-635.
17. Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmeyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS and Jones HW, Jr: Maturation and fertilization of morphological immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39: 594-602.
18. Trounson A, Wood C and Kausche A: In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil. Steril* 1994;62:353-62.
19. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lachham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J., Wood, C., Trounson, A: Blastocyst development and birth after invitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 1995;10:3243-7.

Адрес за кореспонденция:

Д-р Десислава Тачева,

Център по репродуктивна медицина и оплождане ин-витро "София",

бул. "Цар Борис III" 54, София

тел. 954 5102

НОВИНИ ОТ МРЕЖАТА

д-р Г. Николов

МЦ "РепроБиоМед" - София

Пореден удар върху успеваемостта на IVF-ET във Великобритания

Според наложените от HFEA (Human Fertility and Embryology Authority) правила за момента, в Обединеното кралство, при жени до 40 г. възраст е възможно да бъдат трансферирани в маточната кухина само по 2 ембриона, а над 40 г. - до три. Понастоящем във Великобритания 90% от циклите завършват с трансфер на 2 или 3 ембриона. От лятото на 2005 г. се обсъжда възможността за възприемане на практиката на някои европейски страни за трансфер само на един ембрион при всички жени (т.нар. SET - Single Embryo Transfer). Според едно ново проучване на специалисти от Университетската Болница в Маастрихт, Холандия, публикувано в Human Reproduction, това би довело до намаляване на успеваемостта от IVF на половина. Така например, при неселектирана група жени, успеваемостта е била 40.3% бременности на ембриотрансфер при тези с върнати 2 ембриона, срещу 21.4% за жените със SET, като честотата на двуплодните бременности в първата група е около 13%. Според Д-р Мохамед Таранизи (Assisted Reproduction and Gynaecology Centre - London), това проучване показва, че ако се въведе нова политика по отношение на връщането само на един ембрион, ще се регистрира сериозно намаляване на успеваемостта на метода. Много пациентски организации са възмутени от тази перспектива и напомнят, че вече са получили един "удар" от страна на правителството с изваждането на "ин витро" фертилизацията от системата на NHS (National Health Service).

Нова информация за хиперактивацията на сперматозоидите

Американски учени от Boston Children's Hospital и The Howard Hughes Medical Institute са получили нови данни за причините, поради които сперматозоидите изпадат в състояние на хиперактивация и добиват нужната им кинетична енергия, за да преодолеят zona pellucida на ооцита. Според проучването на д-р Юри Киричук и д-р Бетси Наваро от Бостън, публикувано в Nature, от значение е електрическият ток, протичащ по външната страна на мембрана на опашката. За пръв път, след 20 години опити, учените са в състояние да измерят този ток, както и да изучат ролята на CatSper - протеин от важно значение за фертилитета при мъжете, намиращ се в

опашките само на зрели сперматозоиди. Според тези изследвания CatSper представлява изключително важен Ca^{2+} канал, който дава възможност, чрез инфлукс на калциеви йони, измерено като електрически ток по мембраната на опашката, да доведе до хиперактивацията на сперматозоида. Бъдещите изследвания в тази насока имат значение от една страна за намирането на начини за активиране подвижността на сперматозоидите, а от друга за нови методи за контрацепция.

Международна работна среща по проблемите на човешките ембрионални стволови клетки

Между 25 и 27 юли 2006 г. в Техеран, Иран ще се проведе международна работна среща по проблемите на ембрионалните стволови клетки (ESCs).

ESCs са недиференцирани клетки, изолирани най-често от вътрешната клетъчна маса (ICM - Inner Cell Mass) на ембриони в стадий бластоциста. Отглеждани в клетъчна култура, те могат да се самовъзпроизвеждат като недиференцирани клетки или да бъдат насочени към диференциация в клетъчни линии от различните тъканни слоеве (ендо-, екто- и мезодерма), израз на тяхната плурипотентност. Тъй като това е от важно значение за бъдещите възможности за отглеждане на различни клетъчни линии и дори за "конструирането" на човешки тъкани и органи *in vitro*, подобна международна среща би била от важно значение за работещите в областта на човешките стволови клетки.

На работната среща в Техеран ще се обсъждат следните теми:

- Подготовка и криоконсервация на миши ембрионални фибробласти (MEFs);
- Имунохирургия на бластоцисти;
- Оценка, култивация и витрификация на hES;
- Имунохистохимия на hES;
- RT-PCR;
- Цитогенетичен анализ на hES чрез кариотипизиране;
- Ин витро диференциация и др.

Повече информация може да бъде получена на:

E-mail: stemcell@royaninstitute.org

Jokes (for English-speaking IVF NERDs)

A counsellor was conducting a group therapy session with four young mothers and their small children...

"You all have obsessions", he observed.

To the first mother, he said "You are obsessed with food - you've named your daughter Candy".

To the second mother he said: "Your obsession is with money. Again it manifests itself in your child's name - Penny".

Then he turned to the third mother: "Your obsession is alcohol. That too manifests itself in your child's name - Brandy."

At this point the fourth mother stood up, took her little boy by the hand and whispered: "Come on, Dick we're leaving...."

(Fwd'ed by Ani Racheva from Organon)

* * *

"Doc," said the young man lying down on the couch, "You've got to help me! Every night I have the same horrible dream. I'm lying in bed when all of a sudden five drop dead gorgeous women rush in and start tearing off my clothes."

The psychiatrist nodded, "And what do you do?"

"I push them away!"

"I see. And what can I do to help you with this?"

The patient implored, "Please, Break my arms!"

(From the Internet, http://www.pegusisfreeware.com/Jokes/just_jokes.htm)

* * *

Reproduction statements:

"Artificial insemination is when the farmer does it to the cow instead of the bull."

"To prevent contraception, wear a condominium."

"Many women believe that an alcoholic binge will have no effects on the unborn fetus, but that is a large misconception."

(From the Internet, <http://www.medindia.net/Humour>)

ИЗИСКВАНИЯ КЪМ АВТОРИТЕ

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

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

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

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

За повече информация и изпращане на материали:

Българска Асоциация по Репродуктивна Човешка Ембриология (БАРЧЕ),
гр. София - 1606, ул. "Константин Иречек" № 17,
E-mail: gnikolov@yahoo.com;
plamen@ivf.zzn.com
Тел.: 088 870 3786 (д-р Г. Николов)
088 821 7095 (П. Тодоров)