

ЕМБРИОЛОГИЯ

Embryology



ISSN 1312-7349



Настоящият брой на сп. Ембриология е издаден
с финансовата подкрепа на МОН
чрез Споразумение ДО1-275/16.12.2019
НИ „Клетъчни Технологии в Биомедицината“
от Националната пътна карта
за научна инфраструктура
2017-2023 (НПКНИ 2017-2023)



НАЦИОНАЛНА ПЪТНА КАРТА
ЗА НАУЧНА ИНФРАСТРУКТУРА
(2017-2023 г.)

The Current Issue of the Journal is Supported by the Ministry of Education and Science under Grant
DOI-275/16.12.2019 "INFRAACT" of Bulgarian NRRI 2017-2023

ИЗДАВА БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ
ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ

ТОМ 10 КНИЖКА 1
2020

Всичко за Вашата лаборатория

Специализирани реактиви

Продуктовата линия обхваща културални среди, среди за обработка на сперма, среди за криосъхранение и ин витро диагностика, ензими, реактиви за подготовка и др.

Диагностични материали – Episcreeen, LeucoScreen, Fructose test, Varicoscreen, Vitalscreen, Hypo-osmotic Swelling test, Spermac stain.

Среди за клетъчно култивиране – Fercult IVF, Flushing, G3, PVP, ICSI kit, Mineral oil.

Среди за подготовка на семенна течност- Sil -Select Plus, Sil-Select Stock. Замразяващи среди – Embryofreeze, Spermfreeze, VitriFreeze, VitriThaw.

Специализирани консумативи

SparMed е датска компания специализирана в производството на пластмасови специализирани консумативи и филтри за IVF, отчитащи устройства за лаборатории, дезинфектанти, камери и др. консумативи.

Gynetics – компанията посветена на женското здраве, разработва и предлага най-добрите медицински продукти, осигуряващи областта на възпроизводството и контрацепцията- консумативи за вземане на проби, катетри за ембрио трансфер, катетри за вътрематочно оплождане, сет за аспирация на фоликули.

Лабораторна апаратура

Специализирани ламинарни боксове за IVF – съчетават в себе си иновативна енергоспестяваща система, ламинарна технология и HEPA филтрация. Боксовете са под постоянен микропроцесорен контрол, с визуална и звукова аларма, като осигуряват чисти и стерилни работни условия. В тези апарати може да бъде инсталиран стереомикроскоп. Продуктовата гама се допълва от CO₂ инкубатори, микроманипулатори, микроскопи - изправени, инвертни и стерео, лабораторни хладилници и фризери и всякакъв вид съпътстваща апаратура за IVF лаборатории.



GYNEMED
Medizinprodukte GmbH & Co. KG



IVFtech

illumina

GYNETICS

Leja

FertiPro

sparMED
GOsafe in IVF Laboratories

PHCBI

AIR LIQUIDE

eppendorf

Labotect
Labor-Technik-Göttingen

HAMILTON THORNE

Nikon

София, България
кв. Банишора, ул. Враня 82,
Тел. +359 2 983 96 49
Факс: +359 2 983 22 11
email: office@elta90.eu
www.elta90.com

Bucharest, Romania
Str. Nicolae G. Caramfil, Nr.22A Sector 1
Tel: +40 21 232 26 94
Fax: +040 21 232 26 96
email: office@elta90mr.ro
www.elta90mr.ro

Belgrade, Serbia
Svetog Klimenta 26
Tel: +381 11 2832650
Fax: +381 11 28 32 850
email: office@elta90ms.com
www.elta90ms.com

Skopje, Macedonia
Mobile: +389 78 304 645
Tel: + 389 02 5117 017
Fax: + 389 02 5117 017
tonistefanovski@elta90mm.mk
www.elta90mm.mk

СЪДЪРЖАНИЕ:

Репродуктивна медицина и АРТ в условията на SARS-CoV-2 – предизвикателства, оценка на рисковете и оптимизация на IVF практиките	2
<i>Маринова Е., Конакчиева Р., Николов Г.</i>	
България - Пълноправен партньор в Европейската мрежа на биомедицински научни инфраструктури	14
Репродуктивната имунология – все още влиятелна научна общност и област на изследване	16
<i>Тодорова К., Хайрабемян С.</i>	
С677Т полиморфизма на гена на метилентетрахидрофолат редуктазата (MTHFR) и неговата роля в човешката репродукция	20
<i>Механджиев Ц.</i>	
Бъдещето на човечеството зависи от репродукцията в космически условия	25
<i>Ефтимов П., Стефанова Н.</i>	
Овариални стволови клетки – развитие в изследванията през последните 15 години и перспективи за репродуктивната медицина	31
<i>Христова Е., Петрушко М.</i>	

CONTENTS:

Reproductive medicine and ART in SARS-CoV-2 conditions – challenges, risk assessment and optimization of IVF practices and its impact on human reproduction.	2
<i>E. Marinova, R. Konakchieva, G. Nikolov</i>	
Bulgaria - Full Member Of The European Network Of Research Infrastructures In Biomedicine	14
Reproductive Immunology – a still impactful scientific community and field of research	16
<i>K. Todorova, S. Hayrabyan</i>	
Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and its impact on human reproduction.	20
<i>T. Mehandjiev</i>	
The Future of the Human Species Depends on Reproduction in Space	25
<i>P. Eftimov, N. Stefanova</i>	
Ovarian stem cells – developments in the last 15 years and future perspectives for reproductive medicine	31
<i>E. Hristova, M. Petrushko</i>	

Редакционна Колегия

Доц. Пламен Тодоров, дбн – главен редактор
Д-р Георги Николов, дб – зам. гл. редактор

Членове:

Доц. д-р Иван Николов, дм
Доц. Янчо Тодоров, дб
Елена Христова, дб
Димитър Баров
чл-кор. Румен Панков, дбн

проф. Росица Конакчиева
д-р Иво Тодоров, дм
Десислава Тачева, дб
Диана Гуленова, дб
д-р Георги Вакрилов

Предпечатна подготовка и печат

"Л и Д Тера" ООД
office@ldtera.eu

Чуждестранни членове:

проф. Владимир Исаченко - Германия
проф. Кристина Магли - Италия
проф. Вилфред Файхтингер - Австрия
проф. Анна Вейга - Испания
проф. Миодраг Стойкович - Сърбия

РЕПРОДУКТИВНА МЕДИЦИНА И АРТ В УСЛОВИЯТА НА SARS-COV-2 - ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВА, ОЦЕНКА НА РИСКОВЕТЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ НА IVF ПРАКТИКИТЕ

Маринова Е.^{1,2}, Конакчиева Р.¹, Николов Г.²

¹ Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, Биологически факултет,

Катедра по цитология, хистология и ембриология;

² Медицински Център „РепроБиоМед“ – София

REPRODUCTIVE MEDICINE AND ART IN SARS-COV-2 CONDITIONS - CHALLENGES, RISK ASSESSMENT AND OPTIMIZATION OF IVF PRACTICES

E. Marinova^{1,2}, R. Konakchieva¹, G. Nikolov²

¹ Sofia University “St. Climent Ohridski”, Faculty of Biology,

Department of Cytology, Histology and Embryology;

² ReproBioMed Medical Center - Sofia

Глобална криза за здравните системи

През март 2020 г. Световната здравна организация (СЗО) обяви началото на пандемия на SARS-CoV-2 (COVID-19), безпрецедентно заболяване, което към края на 2020 г. е засегнало около 80 милиона души в целия свят, като смъртните случаи са над един милион.

COVID-19 е остро респираторно заболяване, причинено от едноверижен РНК вирус, известен под името „Коронавирус, причиняващ тежък остър респираторен синдром 2“ или SARS-CoV-2. Изключителната заразност на вируса, високият риск от развитие на животозастрашаваща инфекция и постоянното нарастване на случаите на SARS-CoV-2 доведоха до належаща необходимост от широкото прилагане на специфични стратегии за намаляване на риска от това заболяване, включително отлагането на всички несъществени дейности с цел избягване претоварването на здравните системи.

Международните и националните асоциации за репродуктивна медицина, включително финансиращи институции, като „Център за Асистирана Репродукция“ в България, предложиха преустановяване на нови ин-витро процедури, неналожителни дейности по криоконсервации на гамети и диагностични процедури⁽¹⁻⁵⁾, което бе факт в европейски и национален мащаб за най-малко 2-3 месеца през пролетта на 2020 г.; след м. май постепенно започна възстановяване на услугите в областта на репродуктивната медицина, но при едни по-ниски обеми. Спирането на процедурите за ин витро оплождане доведе до значимо снижаване успеваемостта на IVF, най-малкото поради допълнително нарастване на средната възраст на пациентите⁽⁶⁾.

От началото на пандемията са публикувани и актуализирани редица насоки, епидемиологични бюлетени и препоръки. В областта на репродуктивната медицина от големите медицински общности като ESHRE, ASRM, IFFS, REDLARA-SBRA бяха издадени препоръки към пациентите страдащи от безплодие да обмислят отлагане на бремен-

Global crisis for health systems

In March 2020, the World Health Organization (WHO) announced the onset of a SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic, an unprecedented disease that affected around 34 million people worldwide by the end of September 2020, with more than one million deaths. COVID-19 is an acute respiratory illness caused by a single-stranded RNA virus known as ‘Coronavirus causing severe acute respiratory syndrome 2’ or SARS-CoV-2. The extreme transmissibility of the virus, the high risk of developing a life-threatening infection and the steady increase in the incidence of SARS-CoV-2 have led to the urgent need for widespread implementation of specific strategies to reduce the risk of this disease, including postponing all non-essential activities to avoid overload of health systems.

International and national associations for reproductive medicine, including funding institutions such as the Center for Assisted Reproduction in Bulgaria, have proposed suspension of new in vitro procedures, non-essential gamete cryopreservation activities and diagnostic procedures⁽¹⁻⁵⁾, which was a fact in European and national scale for at least 2-3 months in the spring of 2020; after May this year, the recovery of services in the field of reproductive medicine gradually began, but at lower volumes. The suspension of in vitro fertilization procedures has led to a significant reduction in IVF success, at least due to a further increase in the average age of patients⁽⁶⁾. Since the beginning of the pandemic, a number of guidelines, epidemiological bulletins and recommendations have been published and updated. In the field of reproductive medicine, large medical communities such as ESHRE, ASRM, IFFS, REDLARA-SBRA have recommended that infertile patients consider postponing pregnancy^(1-4,7). General recommendations included discontinuation of reproductive therapy, such as ovulation induction, intrauterine insemination (IUI), in vitro fertilization, cryopreservation of egg and sperm cells, and transfer of fresh or frozen embryos. However, it was allowed for individual centers which have

ност^(1-4, 7). Общите препоръки включват прекратяване стартирането на репродуктивно лечение, включително индукция на овулация, втрематочна инсеминация (IUI), ин витро оплождане, криоконсервация на яйцеклетки и сперматозоиди, както и трансфер на свежи или замразени ембриони. Въпреки това, беше допусната възможност, в случай че отделни центрове разполагат с необходимите условия, да преценяват и решават индивидуално случаи, при които такова лечение е наложително поради онкологични причини, или такива, при които отлагането на лечението може да причини повече вреда за пациента (напр. пациенти с изчерпан яйчников резерв).

Причините за предприемането на тези извънредни стъпки включват избягване на възможни усложнения от лечението с асистирана репродукция и бременност, както и липсата на данни относно потенциални усложнения, свързани с бременността и опасения относно вертикалното предаване на COVID-19 към плода при положително диагностицирани пациенти.

Планиране на АРТ в условията на COVID-19

В резултат на интензивни научни изследвания в цял свят, от началото на пандемията, се появяват все повече нови данни за COVID-19, които позволяват нови реалности и възможности в различни страни и региони. Необходимо е цялостно преосмисляне на поведението и политиките, тъй като се очаква продължителен период на пандемия и още е рано да се мисли за т.нар. "post - COVID era". Много важен момент при определяне на новите стратегии за АРТ се отнася до две ключови концепции на СЗО:

- първо - безплодието е заболяване и трябва да се разглежда като такова.
- второ, всички жени трябва да могат да взимат самостоятелни решения при обмисляне на семейното планиране дори в условията на тази безпрецедентна криза (WHO, 2019).

Следователно спешно се изискват индивидуализирани препоръки, като се вземат предвид и геополитическите сценарии. Голямата дилема пред IVF центровете е създаването на безопасни условия и провеждането на процедури, хармонизирани с местните правителствени разпоредби и оптимизирани в подкрепа на нуждаещите се пациенти⁽¹⁻⁴⁾.

Въпреки че не съществуват достатъчно данни, се приема за малко вероятна възможността, при рутинните ин-витро процедури да се осъществи заразяване на сперматозоиди, ооцити и ембриони. Процедурите изискват систематично измиване и обработка, което би включвало значително разреждане на всеки предполагаем вирус, ако е присъствал в оригиналния материал (<https://www.eshre.eu/Press-Room/ESHRE-News>). В действителност, международните насоки за намаляване на риска от кръстосано замърсяване в случаите на полово предавани инфекции препоръчват многократно измиване на пробите като основна стра-

provided the necessary conditions, to assess and decide individually cases in which such treatment is necessary for oncological reasons, or those in which delaying treatment may cause more harm to the patient (patients with diminished ovarian reserve).

The reasons for taking these emergency steps included avoiding possible complications from assisted reproduction and pregnancy treatment, as well as lack of data on potential pregnancy complications and concerns about vertical transmission of COVID-19 to the fetus in positively diagnosed patients.

Planning of ART in COVID-19 conditions

As a result of intensive research around the world, since the beginning of the pandemic, more and more new data on COVID-19 have emerged, opening up new realities and opportunities in different countries and regions. A complete rethinking of behavior and policies is needed, as a long period of pandemic is expected and it is too early to think about the so-called "post - COVID era". A very important point in defining new ART strategies relates to two key concepts of the World Health Organization:

- first - infertility is a disease and should be considered as such.
- second - all women should be able to make their own decisions when considering family planning even in the context of this unprecedented crisis (WHO, 2019).

Therefore, individualized recommendations are urgently required, taking into account geopolitical scenarios. The big dilemma for IVF centers is to create safe conditions and conduct procedures harmonized with local government regulations and optimized to support patients in need⁽¹⁻⁴⁾.

Despite the insufficiency of available data, the possibility of infecting sperm, oocytes and embryos with routine in vitro procedures is considered unlikely. The procedures require systematic washing and processing, which would facilitate a significant dilution of any suspected virus if present in the original material (<https://www.eshre.eu/Press-Room/ESHRE-News>). In fact, international guidelines for reducing the risk of cross-contamination in cases of sexually transmitted infections recommend repeated sample washing as the main strategy for reducing viral load in biological samples (especially semen) and risk management during IVF procedures. In addition, the presumed role of Zona pellucida in protecting against *viruses* and reducing the susceptibility of the egg cell to viral infections must be taken into account⁽⁸⁾. Therefore, good universal standard laboratory practices (standard operating procedures - SOPs) for working with gametes and embryos have been established in embryological laboratories, therefore no significant technical changes are required in the existing protocols for working with human gametes and embryos.

Pathogenesis of SARS-CoV-2

Coronaviruses are a large family of *viruses* known to cause symptoms ranging from the common cold to

тегия за намаляване на вирусното натоварване в биологичните проби (особено семенна течност) и управление на риска от предаване по време на IVF процедура. Освен това трябва да се има предвид и предполагаемата роля на *Zona pellucida* в защитата срещу вируси и намаляване на чувствителността на яйцеклетката към вирусни инфекции⁽⁸⁾. Поради това в ембриологичните лаборатории са утвърдени добри универсални стандартни лабораторни практики (стандартни оперативни процедури – СОП) при работа с гамети и ембриони, поради което не се налагат значителни технически промени в съществуващите протоколи за работа с човешки гамети и ембриони.

Патогенеза на SARS-CoV-2

Коронавирусите са голямо семейство вируси, за които е известно, че причиняват симптоми, вариращи от обикновена настинка до по-тежки заболявания, като тежкия остър респираторен синдром (SARS) и респираторен синдром на Средния изток (MERS). Коронавирусът на тежкия остър респираторен синдром (SARS-CoV) причини огнище на SARS в Китай през 2002 г.^(9, 10), докато MERS коронавирусът (MERS-CoV) беше патогенът, отговорен за огнищата на тежките респираторни заболявания в Средния изток през 2012 г.⁽¹¹⁾ SARS-CoV-2 е седмият идентифициран член от семейството на коронавирусите, инфектиращи човека, като основните симптоми включват повишена температура, кашлица и отпадналост, подобни на тези след инфекция с SARS-CoV и MERS-CoV⁽¹²⁾.

Самите коронавируси са матрични едноверижни РНК вируси притежаващи голяма протеинова обвивка, със способност да заразяват хора и широк кръг животни. SARS-CoV-2 принадлежи към рода бета-коронавирус и може да произхожда от вирус у прилепи, тъй като геномната последователност на SARS-CoV-2 е приблизително 90% идентична с тази на коронавируса на прилепите. За разлика от това, генетичните последователности на SARS-CoV-2 показват само около 80% идентичност на последователността с SARS-CoV и около 50% с тази на MERS-CoV^(13, 14).

SARS-CoV-2 има четири ключови структурни протеина: нуклеокапсиден протеин (N), протеин в прикрепващите израстъци (S), малък мембранен протеин (SM) и мембранен гликопротеин (M).

Ангиотензин-конвертиращият ензим 2 (ACE2), който се експресира върху алвеоларните епителни клетки тип I и тип II, е основният рецептор на SARS-CoV-2, като инфектирането причинява респираторни симптоми и в крайна сметка остър респираторен синдром. Този рецептор се експресира също и в червата, макар и с ниско количество, и инфекцията може да доведе, макар и по-редки случаи, до разстройство и повръщане. S протеинът е необходим, за да може вирусът да навлезе в клетката гостоприемник посредством рецептор-свързващия домен. Този протеин включва две субединици, S1 и S2, при което S1 определя

more severe illnesses, such as severe acute respiratory syndrome (SARS) and Middle East respiratory syndrome (MERS). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) caused an outbreak of SARS in China in 2002^(9, 10), while MERS coronavirus (MERS-CoV) was the pathogen responsible for outbreaks of severe respiratory disease in the Middle East in 2012.⁽¹¹⁾ SARS-CoV-2 is the seventh identified member of the coronavirus family, which infects humans, the main symptoms of which include fever, cough and fatigue, similar to those after infection with SARS-CoV and MERS-CoV⁽¹²⁾.

Coronaviruses themselves are matrix single-stranded RNA viruses with a large protein envelope, capable of infecting humans and a wide range of animals. SARS-CoV-2 belongs to the beta-coronavirus family and may be derived from virus in bats, as the genomic sequence of SARS-CoV-2 is approximately 90% identical to that of a specific bat coronavirus. In contrast, the genetic sequences of SARS-CoV-2 show only about 80% sequence identity with SARS-CoV and about 50% with that of MERS-CoV^(13, 14).

SARS-CoV-2 has four key structural proteins: nucleocapsid protein (N), spike protein (S), small envelope protein (SM), and membrane glycoprotein (M).

Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), which is expressed on type I and type II alveolar epithelial cells, is the major receptor for SARS-CoV-2, where infection causes respiratory symptoms and ultimately acute respiratory syndrome. This receptor is also expressed in the intestines, although in small amounts, and in rare cases infection can lead to disorder and vomiting. The S protein is required for the virus to enter the host cell via the receptor-binding domain. This protein contains two subunits, S1 and S2, in which S1 determines cell tropism, while S2 is responsible for the fusion of the virus envelope with the cell membrane. After membrane fusion, viral RNA is released into the cytoplasm and viral replication is initiated. The newly formed virus particles then fuse with the plasma membrane through virion-containing vesicles to release the virus⁽¹⁵⁾. Of particular importance is the fact that SARS-CoV also uses ACE2 as a receptor for cell entry; however, the ability of SARS-CoV-2 receptors to bind is 10 to 20 times higher than that of SARS-CoV, which is why the number of SARS-CoV-2 infections exceeded that of SARS infections in 2002/ 2003, which confirms the high intensity of infection. In addition, men tend to have higher ACE2 levels than women, and Asians show higher levels of ACE2 expression in alveolar cells than Caucasians and African Americans, suggesting that Asian men are most susceptible to infection⁽¹⁶⁾.

Is SARS-CoV-2 a challenge for the reproductive system?

SARS-CoV-2 has been found in secretions in the respiratory tract, saliva, gastrointestinal samples, blood, feces, and urine⁽¹⁷⁾. In the human reproductive tract, the expression of the SARS-CoV-2 input

клетъчния тропизъм, докато S2 е отговорен за сливането на мембраната на вируса с клетъчната мембрана. След сливането на мембраната, вирусната РНК се освобождава в цитоплазмата и се иницира вирусна репликация. След това новообразуваните вирусни частици се сливат с плазмената мембрана през вирион-съдържащи везикули, за да освободят вируса ⁽¹⁵⁾. От особено значение е, че SARS-CoV също използва и ACE2 като рецептор за навлизане в клетките; способността за свързване на рецепторите на SARS-CoV-2 обаче е 10 до 20 пъти по-висока от тази на SARS-CoV, поради което броят на инфекциите със SARS-CoV-2 е надвишил този на инфекциите на SARS през 2002 г. / 2003, което потвърждава високия интензитет на заразяване. Освен това, мъжете обикновено имат по-високи нива на ACE2 от жените, а азиатците показват по-високи нива на експресия на ACE2 в алвеоларните клетки, отколкото хората от бялата раса и афроамериканците, което предполага, че азиатските мъже са най-податливи към инфекция ⁽¹⁶⁾.

Предизвикателство ли е SARS-CoV-2 за репродуктивната система

SARS-CoV-2 е открит в секрети в респираторния тракт, слюнка, проби от стомашно-чревния тракт, кръв, изпражнения и урина ⁽¹⁷⁾. В човешкия репродуктивен тракт, експресията на входния рецептор на SARS-CoV-2 - ACE2, на майчино-феталната граница, както и в основните органи на плода, поражда опасения за потенциално вертикално предаване и плацентарна дисфункция / аборт ⁽¹⁸⁾. Редица клетки в развиващите се човешки ембриони експресират рецепторите за SARS-CoV-2, съдържат необходимите механизми за вирусна интернализация и репликация; това поражда сходни опасения по отношение както на ембрионалното, така и на феталното развитие ⁽¹⁹⁾. При мъжете, ACE2 рецептори се съдържат в тестикуларната тъкан, като съществува възможност в случай на носителство SARS-CoV-2 да се освободи в спермата. Това би имало за последици предаване на вируса по полов път, с ефект върху ранната бременност и ранното вътреутробно ембрионално развитие.

По отношение на спермата, наличните данни за вирусноносителство се основават на доклади от отделни случаи или проучвания при малки групи хора. В кохортно проучване, проведено в Китай, новият коронавирус е открит в семенни проби от пациенти с COVID-19, както в острата (най-често идентифицирана), така и във фазата на възстановяване ⁽²⁰⁾. За разлика, в други изследвания SARS-CoV-2 не е бил идентифициран в спермата 8 и 30 дни след поставяне на диагноза COVID-19 ⁽²¹⁾. Противоречивите резултати показват необходимостта от по-обхватни проучвания на семенен материал, които да потвърдят наличието на вируса в спермата, както и продължителността на екскрецията му с оглед рисковете за предаване чрез сексуален контакт.

receptor - ACE2, at the maternal-fetal border, as well as in the main organs of the fetus, raises concerns about potential vertical transmission and placental dysfunction / abortion ⁽¹⁸⁾. A number of cells in developing human embryos express SARS-CoV-2 receptors, containing the necessary mechanisms for viral internalization and replication; the fact raises similar concerns about both embryonic and fetal development ⁽¹⁹⁾. In men, ACE2 receptors are present in the testicular tissue and may be released into the semen in case being a SARS-CoV-2 carrier. This would result in sexual transmission of the virus, with an effect on early pregnancy and early fetal development.

With regard to semen, the available virus carriage data are based on case reports or studies in small groups of people. In a cohort study conducted in China, the new coronavirus was detected in semen samples from patients with COVID-19, both in the acute (most commonly identified) and in the recovery phase ⁽²⁰⁾. In contrast to that, in other studies, SARS-CoV-2 was not identified in semen 8 and 30 days after diagnosis of COVID-19 ⁽²¹⁾. Contradictory results indicate the need for more extensive studies of semen to confirm the presence of the virus therein, as well as the duration of its excretion in view of the risks of sexual transmission.

In mature egg cells, the theoretical possibility of SARS-CoV-2 presence due to mechanisms involving the co-expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) raises many questions without a definitive answer. In fact, a new study does not confirm co-expression of ACE2 and TMPRSS2 in testicular cells (including sperm), ovarian cells of non-human primates, and human cumulus cells ⁽²²⁾. However, these data do not exclude the possibility of transmission of the virus during simultaneous storage of egg cells from infected and uninfected women in the same liquid nitrogen container.

COVID-19 and pregnancy

There are currently no studies proving severe infectious or gynecological complications caused by COVID-19 during the first trimester of pregnancy and there is no information on the potential effects of the infection on pregnancy in early stages. As for other coronavirus epidemics, SARS and MERS, no correlation was found with the incidence of malformations. However, it should be taken in consideration that the clinical course of COVID-19 and the response to treatment appear to be different from those of previous epidemics with other types of coronaviruses ^(23, 24), therefore it is necessary to consider measures to control infection in cases of pregnancy. There is a need for further research to understand the pathogenesis and epidemiology of SARS-CoV-2 during pregnancy, including aspects such as maternal infection time, gestational age, the effects of concomitant factors and the frequency of adverse outcomes. At this stage, preliminary observations in pregnant women infected with SARS-

В зрели яйцеклетки, теоретичната възможност за наличие на SARS-CoV-2, дължаща се на механизми, включващи ко-експресията на ангиотензин-конвертиращия ензим 2 (ACE2) и трансмембранната серинова протеаза 2 (TMPRSS2), поставя много въпроси без дефинитивен отговор. Всъщност, ново проучване не потвърждава ко-експресия на ACE2 и TMPRSS2 в клетки на тестиса (включително сперматозоиди), в яйчникови клетки от нечовекоподобни примати и човешки кумулусни клетки⁽²²⁾. Все пак тези данни не изключват възможността за прехвърляне на вируса по време на съхраняването едновременно на яйцеклетки от заразени и неинфектирани жени в един и същ контейнер с азот.

COVID-19 и бременност

Засега няма проучвания доказващи тежки инфекциозни или гинекологични усложнения през първия триместър на бременността причинени от COVID-19 и липсва информация за потенциалните ефекти на инфекцията върху бременността през началните етапи. По отношение на други коронавирусни епидемии - SARS и MERS, не е установена корелация с честотата на малформации. Все пак трябва да се има предвид, че клиничният ход на COVID-19 и отговорът при лечението изглежда се различават от тези при предишните епидемии с други видове коронавируси^(23, 24), поради което е необходимо да бъдат съобразени мерките за контролиране на инфекцията в случаите на бременност. Съществува необходимост от допълнителни изследвания, за да се разбере патогенезата и епидемиологията на SARS-CoV-2 по време на бременност, включително аспекти като времето на инфектиране на майката, гестационната възраст, ефектите на съпътстващи фактори и честотата на неблагоприятните изходи. На този етап предварителните наблюдения върху бременни жени, инфектирани с SARS-CoV-2, предполагат оптимистична перспектива по отношение на клиничния ход при бременни.

Към неблагоприятните фактори по отношение на бременността, свързани с пандемията на COVID-19, е наличието на силен психологически стрес и безпокойство сред обществото като цяло. Проблемите при бременните жени включват:

- присъствие на членове на семейството, на които са поставени карантинни ограничения,
- потенциално излагане на SARS-CoV-2 по време на посещения при лекари,
- потенциална заплаха за преждевременно прекъсване на бременността чрез цезарово сечение;
- постоянна употреба на натриев хипохлорит и алкохол като дезинфектанти, които могат да оказват токсични ефекти,
- потенциални усложнения след раждането, например по време на кърмене или грижите за новороденото⁽²⁵⁾.

Имуносупресията и други физиологични промени по времето на бременността могат да причинят висока чувствителност към респираторни

CoV-2 suggest an optimistic outlook for the clinical course in pregnant women.

Among the adverse pregnancy factors associated with COVID-19 pandemic is the presence of severe psychological stress and anxiety in society as a whole. Problems with pregnant women include:

- presence of family members subject to quarantine restrictions,
- potential exposure to SARS-CoV-2 during visits to doctors,
- potential threat of premature termination of pregnancy by cesarean section,
- constant use of sodium hypochlorite and alcohol as disinfectants that may have toxic effects,
- potential postpartum complications, e.g. during breastfeeding or newborn care⁽²⁵⁾.

Immunosuppression and other physiological changes during pregnancy can cause high susceptibility to respiratory pathogens and severe pneumonia in pregnant women⁽²⁶⁾, followed by hospitalization for intensive care and lung ventilation. Hormone levels and immune competence vary in the course of pregnancy. Early pregnancy appears to be more at risk due to adaptive changes in the fetal antigen response. The condition stabilizes with the gradual adaptation of the mother's immune and endocrine systems, having highest stability in the late stages of pregnancy. Early pregnancy is a critical period for fetal development, and at this stage the immune system is particularly sensitive, which can affect the course of a possible infection⁽²⁷⁾. Data from previous epidemics of respiratory viruses may provide some guidance on susceptibility to COVID-19 and the extent of complications during pregnancy.

For example, the influenza A (H1N1) virus (the so called „swine flu“) can cause a respiratory illness that can develop into an acute respiratory syndrome. During the 2009 H1N1 epidemic, pregnant women were found to be at higher risk of complications, as they were four times more likely to be hospitalized than the rest of the population⁽²⁸⁾. As for other coronaviruses, the SARS epidemic in 2002/2003 resulted in 8,442 cases and 916 deaths, and studies show that clinical outcomes during this epidemic were worse in pregnant women as opposed to women, that were not pregnant. In addition, a trend of increased growth in preterm births and abortions associated with SARS-CoV infection was revealed⁽²⁹⁾. Approximately 50% of pregnant women with SARS-CoV required intensive treatment, and approximately 33% required mechanical ventilation. Mortality in pregnant women with SARS has reached 25%⁽²⁷⁾. Although there is no evidence of vertical transmission of MERS or SARS, it can be assumed that SARS-CoV and MERS-CoV infections, as well as H1N1, are associated with a higher complication rate in pregnant women⁽²⁹⁾.

Although the COVID-19 epidemic continues and data are limited, recent reports indicate that the clinical features reported in pregnant women with confirmed SARS-CoV-2 infections are similar to those in non-pregnant women with COVID-19 pneumonia and

патогени и тежки пневмонии при бременни жени⁽²⁶⁾, с последваща хоспитализация за интензивно лечение и вентилация. Хормоналните нива и имунната компетентност се движат в различни граници в хода на бременността. Ранната бременност изглежда по-податлива на риск поради адаптивните промени в отговора на феталните антигени. Състоянието се стабилизира с постепенното адаптиране на имуната и ендокринната система на майката, като се отличава с най-висока стабилност в късните етапи на бременността. Ранната бременност е критичен период за развитието на плода, като на този етап имунната система е особено чувствителна, което може да се отрази върху хода на евентуална инфекция⁽²⁷⁾. Данните от предишни епидемии с респираторни вируси могат да дадат някои насоки относно чувствителността към COVID-19 и степента на усложненията по време на бременността.

Така например, вирусът на грип А (H1N1) („свински грип“) може да причини респираторно заболяване, което може да се развие в остър респираторен синдром. По време на епидемията от H1N1 през 2009 г. е било установено, че бременните жени са изложени на по-висок риск от усложнения, тъй като е съществувала четирикратно по-голяма вероятност да бъдат хоспитализирани от останалата част от населението⁽²⁸⁾. По отношение на други коронавируси, епидемията от SARS през 2002/2003 г. е довела до 8 442 случая и 916 смъртни случая, а проучванията показват, че клиничните резултати по време на тази епидемия са по-лоши при бременни жени, отколкото при небременни жени. В допълнение е отчетена тенденция за увеличен ръст на преждевременните раждания и аборти свързани със SARS-CoV инфекция⁽²⁹⁾. Приблизително 50% от бременните жени, страдащи от SARS-CoV, са се нуждаели от интензивно лечение, а приблизително при 33% е била наложена механична вентилация. Смъртността при бременни жени, страдащи от SARS, е достигнала 25%⁽²⁷⁾. Въпреки че липсват данни за вертикално предаване на MERS или SARS, може да се приеме, че инфекциите с SARS-CoV и MERS-CoV, както дори и H1N1, са свързани с по-висок процент на усложнения при бременни жени⁽²⁹⁾.

Въпреки че епидемията от COVID-19 продължава и данните са ограничени, последните доклади показват, че клиничните характеристики, съобщени при бременни жени с потвърдени инфекции с SARS-CoV-2, са подобни на тези при небременни жени с пневмония COVID-19 и няма доказателства на вертикално предаване на SARS-CoV-2 в края на бременността. В резултат на съвместно проучване, проведено от СЗО и Китай, при което са изследвани 147 пациенти, се стига до заключението, че *бременните жени с COVID-19 не са изложени на по-висок риск от развитие на тежки симптоми*⁽³⁰⁾. Резултатите са подкрепени и от девет други по-малки проучвания с пациенти в различен триместер. Докладвани са единични случаи на новородени с налични IgM антитела

there is no evidence of vertical transmission of SARS-CoV-2 in late pregnancy. A joint study conducted by the WHO and China, which examined 147 patients, concluded *that pregnant women with COVID-19 were not at higher risk of developing severe symptoms*⁽³⁰⁾. The results are supported by nine other smaller studies with patients in different trimesters. Isolated cases of neonates with IgM antibodies to SARS-Cov-2 in the serum (non-transplacental) have been reported in 2020 by Zeng H *et al.*, suggesting possible infection in utero.

Although clinical data on COVID-19 are reassuring, adaptive physiological changes during pregnancy are generally considered to be potential factors for vulnerability to any type of infection. So as a precaution, more attention should be paid to pregnant women, that are infected, as is done for any other virus, until more reliable data are obtained. It is worth mentioning that by now there are no conclusions about the ideal gestational age or method of birth, which should be individualized on the basis of gynecological indications, at least in clinically stable women.

Is COVID-19 a threat to the male reproductive system?

It seems, that the major entry route of SARS-Cov-2 into cells appears to be via the viral protein (S), attaching to the ACE2 receptor and using the cellular transmembrane serine protease TMPRSS2⁽³¹⁾. Both ACE2 and TMPRSS2 are present in the testes, so testicular infection and subsequent sexual transmission are becoming a growing concern. Unfortunately, in previous studies to analyze SARS-CoV-2 in semen or testicular biopsies, no appropriate controls were applied, as patients suffered from mostly mild infections and were tested several weeks after the infection, which did not allow results to be interpreted unambiguously.

In a study conducted in 34 men, 25 to 75 days after a relatively mild initial infection with SARS-Cov-2, RT-PCR analysis showed the absence of the virus in semen⁽³²⁾. Although encouraging, these results cannot be summarized for men suffering from severe infections. Apart from that, there are a number of technical limitations regarding the interpretation of the PCR test such as low sensitivity of detection, lack of quantitative data on viral load, data on the presence of a functional envelope, etc. In another study with 38 men⁽¹⁸⁾, 23 of them (60.5%) were after clinical recovery, while 15 (39.5%) were in the acute stage of infection. In six patients (15.8%), semen was SARS-CoV-2 positive, which included both recovered patients and those in the acute stage of infection. In order to make more adequate conclusions, it is necessary in such studies to take into account the determination of viral load, i.e. to have a quantitative assessment.

In similar *viruses*, such as human immunodeficiency virus (HIV) and cytomegalovirus, viral secretion is possible in semen if the viral load is high due to the severity of the infection⁽³³⁾. This would be essential if

срещу SARS-CoV-2 в серума (които не минават трансплацентарно), насочващи към възможно заразяване in utero (Zeng H *et al.*, 2020).

Въпреки че клиничните данни за COVID-19 са успокояващи, адаптивните физиологични промени по време на бременността обикновено се считат за потенциални фактори на уязвимост към всякакъв вид инфекция. Така че, като предпазна мярка, трябва да се обърне повече внимание на бременните жени носещи инфекция, както това се прави за всеки друг вирус, докато не се получат по-надеждни данни. Струва си да се спомене, че към днешна дата няма заключения относно идеалната гестационна възраст или начин на раждане, които трябва да бъдат индивидуализирани въз основа на гинекологични показания, поне при клинично стабилни жени.

Заплаха ли е COVID-19 за мъжката репродуктивна система

Изглежда, че основния начин за навлизане на SARS-CoV-2 в клетките се извършва посредством вирусния протеин (S), прикрепвайки се към ACE2 рецептора и използващ клетъчната трансмембранна серинова протеаза TMPRSS2⁽³¹⁾. Както ACE2, така и TMPRSS2 присъстват и в тестисите, така че инфекция на тестисите и последващо предаване по полов път придобиват все по-голяма загриженост. За съжаление, в досегашните проучвания за анализ на SARS-CoV-2 в семенна течност или тестикуларни биопсии, не са използвани подходящи контроли, като пациентите са страдали от предимно леки инфекции и са били тествани няколко седмици след установяване на заразяването, което не позволява резултатите да се интерпретират еднозначно.

В проучване, проведено при 34 мъже 25 до 75 дни след установена сравнително лека първоначална инфекция със SARS-CoV-2, RT-PCR анализът показва липсата на вирус в спермата⁽³²⁾. Въпреки че са обнадеждаващи, тези резултати не могат да бъдат обобщени и за мъже, страдащи от тежки инфекции. Отделно от това, съществуват редица технически ограничения по отношение интерпретацията на PCR теста като ниска чувствителност на детекция, липса на количествени данни за вирусната натовареност, данни за наличие на функционална обвивка и т.н. В друго проучване с 38 мъже⁽¹⁸⁾, 23 от тях (60.5%) са били след клинично възстановяване, докато 15 (39.5%) са били в острия стадий на инфекцията. При шест пациента (15.8%), спермата е SARS-CoV-2 положителна, което включва, както възстановени, така и пациенти в остър стадий на инфекцията. За да бъдат направени по-адекватни заключения, е необходимо при подобни проучвания да се има предвид и определяне на вирусната натовареност, т.е. да има и количествена оценка.

При подобни вируси, като напр. вируса на човешка имунна недостатъчност (ХИВ) и цитомегаловирус, е възможно вирусно отделяне в спермата, ако вирусното натоварване е високо, поради тежестта

the haemato-testicular barrier was compromised by systemic local inflammation or for some other reason. In the testis, the barrier creates an immune privilege over the immunogenic germ cells and can protect them from some systemic viral infections. Mumps, HIV, human herpesvirus-8, Ebola, and Zika *viruses* have been proven to cross the blood-testis barrier and elicit an immune response in the testis⁽³³⁾. In the case of mumps, men may develop orchitis, which is associated with testicular atrophy and azoospermia⁽³⁴⁾. In fact, there are reports linking SARS infection and orchitis⁽³⁵⁾.

It is also important to study the condition of the ACE2 receptors themselves and their filtering ability against the whole virus. It seems unlikely that the entire 70-90 nm virus would break the blood-testis barrier. The mere presence of viral RNA or viral particles in a semen sample does not mean that the disease is sexually transmitted⁽³⁶⁾. SARS-CoV-2 is considered unlikely to replicate in the male reproductive tract. Therefore, no definitive conclusions can be drawn regarding the sexual transmission of SARS-CoV-2, but it makes sense to use barrier protection to minimize sexually transmitted diseases in general.

Discovering the mechanism of entry of SARS-CoV-2 into semen and testis would help in assessing the early effects on male reproductive function. On the other hand, the impact of SARS-CoV-2-related stress and tension, manifested in reduced sperm quality, cannot be underestimated. Limited small studies on seminal plasma and testicular tissue have so far been unable to provide guidance on sexual practices or reproduction. More comprehensive studies are needed, using validated diagnostic procedures at different stages of infection, the inclusion of controls, and parallel samples of the main target respiratory tissue, proven to contain viral RNA.

COVID-19 and assisted reproduction treatment

In view of the current COVID-19 pandemic and the uncertainty about the effects of SARS-CoV-2 on the mother and fetus during pregnancy, international reproductive associations have published a number of guidelines and recommendations for patients who are currently or will be treated for infertility through Assisted Reproductive Technology (ART). On 12 March 2020, the International Federation of Fertility Associations (IFFS) recommended that patients who are considering pregnancy or who are currently being treated for infertility should consult their GP about planning further steps⁽³⁷⁾. On the same day, the American Society for Reproductive Medicine (ASRM) published a newsletter recommending patients who are highly likely to have COVID-19 disease (i.e. patients who have a positive SARS-CoV-2 test or who have been exposed to a confirmed COVID-19 case within 14 days of the onset of their symptoms) to consider freezing oocytes or embryos and to avoid embryo transfer until fully recovered. The document emphasizes that the measures are not mandatory in suspected cases of COVID-19, as the symptoms of COVID-19 are very similar to those

на инфекцията ⁽³³⁾. Това би било от съществено значение, ако кръвно-тестисната бариера е компрометирана от системно локално възпаление или по друга причина. В тестисите бариерата създава имунна привилегия по отношение на имуногенните зародишни клетки и може да ги предпази от някои системни вирусни инфекции. Установено е, че паротитният вирус, ХИВ, човешки херпесвирус-8, вирусите Ебола и Зика са в състояние да преминат през кръвно-тестисната бариера и да предизвикат имуноен отговор в тестиса ⁽³³⁾. В случай на паротит, мъжете могат да развият орхит, който е свързан с атрофия на тестисите и азооспермия ⁽³⁴⁾. В действителност съществуват съобщения, които свързват SARS инфекция и орхит ⁽³⁵⁾. Важно е и изследване състоянието на самите ACE 2 рецептори и тяхната филтрираща способност по отношение на целия вирус. Изглежда малко вероятно целият вирус с размер 70–90 nm да наруши кръвно-тестисната бариера. Самото присъствие на вирусна РНК или вирусни частици в пробата от сперма не означава, че болестта се предава по полов път ⁽³⁶⁾. Счита се за малко вероятно SARS-CoV-2 да се реплицира в репродуктивния тракт на мъжете. Следователно, не могат да се направят категорични заключения относно предаването на SARS-CoV-2 по полов път, но има смисъл да се използва бариерна защита за минимизиране на половото предаване на болести като цяло.

Разкриването на механизма на навлизане на SARS-CoV-2 в спермата и тестисите би помогнало при оценката на ранното въздействие върху репродуктивната функция на мъжете. От друга страна, въздействието на свързания със SARS-CoV-2 стрес и напрежение, проявяващи се в понижено качество на спермата, не може да бъде подценявано. Ограничените малки проучвания върху семенната плазма и тестисите до този момент не са в състояние да дадат насоки относно сексуалните практики или репродукцията. Необходимо са по-обхватни проучвания, с използване на валидирани диагностични процедури в различни стадии на инфекцията, включване на контроли, както и паралелни проби от основната таргетна респираторна тъкан, доказано съдържаща вирусна РНК.

COVID-19 и лечение чрез асистирана репродукция

С оглед на настоящата пандемия на COVID-19 и несигурността по отношение на ефектите на SARS-CoV-2 върху майката и плода по време на бременност, международните асоциации по репродукция публикуват редица насоки и препоръки по отношение на пациентите, които в момента са или ще бъдат подложени на лечение на безплодие чрез асистирана репродуктивни технологии (ART).

На 12 март 2020 г. Международната федерация на асоциациите по фертилитет (IFFS) препоръчва за пациентите, които обмислят бременност или които в момента са на лечение за безплодие, да се консултират с личния си лекар за планиране

of other more common forms of respiratory disease ⁽¹⁾. On March 17, 2020, the ASRM published a new document entitled "Patient Control and Clinical Recommendations during the Coronavirus Pandemic (COVID-19)", in which the main recommendations are:

- Discontinuation of new treatment cycles, including ovulation induction, intrauterine insemination (IUI), in vitro fertilization (IVF), including embryo retrieval and freezing, and optional cryopreservation of gametes.
- Cancellation of all embryo transfers, with fresh or frozen embryos.
- Continuation of care for patients who have already started a stimulation cycle or need urgent stimulation and cryopreservation.
- Termination of planned operations and optional diagnostic procedures.
- To minimize personal interactions and increase the use of digital resources ⁽²⁾.

On 14 March 2020 the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) issued a statement specifying that only a few cases of COVID-19 have been reported during pregnancy so far, therefore the relevant data should be interpreted with caution as no information is available on the potential effects of COVID-19 infection during the early stages of pregnancy; in addition, medical treatment given in severe cases of COVID-19 may include drugs that are contraindicated during pregnancy ⁽³⁾. The same publication recommends that all patients who are considering or planning treatment, regardless of confirmation of COVID-19 infection, avoid becoming pregnant at this time and consider postponing pregnancy by freezing oocytes or embryos for embryo transfer later ⁽³⁾.

Cryopreservation in the era of SARS-CoV-2 - optimization of practices

Before restarting the procedures, each laboratory must develop its own risk mitigation strategies based on specific analyzes of the risk level. For example, it can be considered that the environment in the cryobank carries the highest risk of infection, both in cryo-containers and in the premises and equipment from an infected person, who according to the current standard operating procedures, is not obliged to wear personal protective equipment (PPE) of the anti-viral class, but only protective equipment against the harmful effects of liquid nitrogen - rubber gloves and goggles, but not masks of KN95 class, safety helmet, nitrile gloves, use of disinfectant, etc. To some extent, this also applies to supporting laboratory procedures such as labeling, container transport, nutrient medium and other consumables. Therefore, the use of PPE is recommended even for procedures in which there is no direct work (manipulation) on gametes and/ or embryos, as well as in all cases where there is a so called second witness present. Double-witnessing techniques without the presence of a second person (electronic witnessing systems) can significantly reduce this risk. When working with biological

на по-нататъшни стъпки ⁽³⁷⁾. Същия ден Американското общество за репродуктивна медицина (ASRM) публикува бюлетин, в който се препоръчва на пациентите, при които има голяма вероятност от заболяване от COVID-19 (т.е. пациенти, които са с положителен SARS-CoV-2 тест или които са били изложени на потвърден COVID-19 случай в рамките на 14 дни от появата на техните симптоми) да обмислят замразяване на ооцити или ембриони и да избягват ембриотрансфер, докато не се възстановят напълно. В документа се подчертава, че мерките не са задължителни при предполагаеми случаи на COVID-19, тъй като симптомите на COVID-19 наподобяват много тези на други по-чести форми на респираторно заболяване ⁽¹⁾. На 17 март 2020 г. ASRM публикува нов документ, озаглавен „Контрол на пациентите и клинични препоръки по време на пандемията на коронавируса (COVID-19)“, в който основните препоръки са:

- Преустановяване на започването на нови цикли на лечение, включително индукция на овулация, вътрематочна инсеминация (IUI), ин витро оплождане (IVF), включително извличане и замразяване на ембриони, както и неналожително криоконсервиране на гаметите.
- Отмяна на всички ембриотрансфери, със свежи или замразени ембриони.
- Продължаване на обслужването на пациенти, които вече са стартирали цикъл на стимулация или се нуждаят от спешна стимулация и криоконсервация.
- Преустановяване на планирани операции и неналечащи диагностични процедури.
- Минимизиране на личните взаимодействия и увеличаване на използването на дигитални ресурси ⁽²⁾.

Европейското общество за човешка репродукция и ембриология (ESHRE) публикува изявление на 14 март 2020 г., в което се уточнява, че до момента са докладвани само няколко случая на COVID-19 по време на бременност, поради което съответните данни трябва да се тълкуват с повишено внимание, тъй като няма налична информация относно потенциалните ефекти на инфекцията с COVID-19 по време на началните етапи на бременността; освен това, медицинското лечение, приложено при тежки случаи на COVID-19, може да включва лекарства, които са противопоказани по време на бременност ⁽³⁾. В същата публикация се препоръчва на всички пациенти, които обмислят или планират лечение, независимо от потвърждение или подозрение за инфекции с COVID-19, да избягват забременяване по това време и да обмислят отлагане на бременността чрез замразяване на ооцити или ембриони за ембриотрансфер по-късно ⁽³⁾.

Криоконсервация в ерата на SARS-CoV-2 – оптимизация на практиките

Преди рестартиране на процедурите, всяка лаборатория трябва да изгради свои собствени стра-

material, even in an unclassified environment, it is advisable to use disinfection and appropriate PPE (gloves, surgical masks and safety helmets).

Because SARS-CoV-2 is an enveloped RNA virus, it is thought to be able to maintain its viability even at low temperatures under liquid nitrogen, suggesting the possibility of contamination and/or cross-contamination between samples ⁽⁴⁰⁾. However, the intensive washing steps which gametes and embryos are subject to before cryopreservation, due to the small volumes used in the vitrification procedure (about 0.1 µl), suggest that the presence of a minimal viral load would not be a significant source of infection. For this reason, cryopreservation protocols for gametes and embryos are not revised at this stage, even if they involve the use of open systems and direct contact with liquid nitrogen, so as not to affect the effectiveness of the procedure.

Transported samples, cryopreserved in geographical areas with a higher prevalence of infection during an epidemiological situation remain a problem. As it was not possible to assess the risk of infection with liquid nitrogen, it is recommended to wash the cryocontainers with sterile liquid nitrogen when thawing/warming the samples ⁽⁴¹⁾, which is an option when importing gametes from other laboratories, even when the current pandemic is over ⁽⁴²⁾. In fact, the current situation generates an increased demand for imported samples and in the long run these processes must find an optimal solution.

From a practical point of view, this may have an impact on sperm cryopreservation procedures for cancer patients, underscoring the need to resume fertility services. In men with older female partners, age-dependent subfertility may become irreversible if clinics remain closed, except for emergency cancer patients. For this reason, a moderate approach is proposed to the recommencement of IVF services ⁽⁴³⁾. In the case of successful stimulation and fertilization, freezing the resulting embryos and delaying embryo transfer may also be a strategy of choice. The use of highly secure devices and segregated cryo-vessels is recommended, while taking into account the risks associated with the transportation of frozen biological material between clinics ⁽⁴²⁾.

The general problem of recruiting sperm donors, in light of the incubation period for SARS-CoV-2, also raises uncertainty. The two-week end-of-symptom abstinence currently offered to potential donors showing respiratory symptoms or those returning from high-risk areas does not appear to be based on any specific follow-up studies or latent period study for SARS-CoV-2 ⁽⁴⁴⁾. There are no data on sperm quality after SARS-CoV-2 infection, but periods of stress are likely to increase cortisol levels and decrease sperm quality, similar to the effects of febrile systemic diseases ⁽⁴⁵⁾. It is important to establish in controlled experiments whether the testis may contain SARS-CoV-2 and, if so, to determine the latency period of the virus before specific reproductive health guidelines can be drawn up ⁽⁴⁶⁾, while controlling risk for patients and staff ⁽⁴⁷⁾.

тегии за намаляване на риска, базирани на конкретни анализи за неговото ниво. Така например, може да се счита, че средата в криобанката крие най-висок риск от заразяване, както на крио-контейнерите, така и на помещението и оборудването от заразоносител, който според досегашните стандартни оперативни процедури, не е длъжен да носи лични предпазни средства (ЛПС) от анти-вирусен клас, а само такива за защита от вредното въздействие на течния азот – гумени ръкавици и очила, но не и маски от клас KN95, предпазен шлем, нитрилови ръкавици, ползване на дезинфектант и т.н. В известна степен това важи и за обслужващи лабораторни процедури като етикетирание, пренасяне на контейнери, хранителни среди и други консумативи. Ето защо, се препоръчва ползването на ЛПС дори за процедури, при които няма директна работа (манипулация) с гаметите и/или ембриони, както и във всички случаи, при които се ползва т.нар. втори свидетел (double witnessing). Методики за уитнесинг без наличието на второ лице (електронни уитнесинг системи) могат значително да редуцират този риск. При работа с биологичен материал дори в неклассифицирана среда е целесъобразно използването на дезинфекция и подходящи ЛПС (ръкавици, хирургически маски и предпазни шлемове).

Тъй като SARS-CoV-2 е РНК вирус с обвивка, се счита че може да запази своята жизнеспособност дори при ниските температури под течен азот, което предполага възможност за замърсяване и /или кръстосано замърсяване между пробите ⁽⁴⁰⁾. Обаче, стъпките на интензивно миене, на което са подложени гаметите и ембрионите преди да бъдат криоконсервирани, свързано с малките обеми, използвани в процедурата за витрификация (около 0.1 µl), предполага, че наличието на минимален вирусен товар не би представлявал съществен източник на инфекция. Поради тази причина, на този етап, не се преразглеждат протоколите за криоконсервация на гаметите и ембриони, дори ако те включват използването на отворени системи и директен контакт с течен азот, за да не се повлияе на ефективността на процедурата.

Проблем остават транспортираните проби, криоконсервирани в географски райони с по-високо разпространение на инфекции по време на извънредна епидемиологична ситуация. Тъй като е било невъзможно да се оцени рискът от инфектиране на течния азот, при размразяване /затопяне на пробите се предлага измиването на криоконтейнерите със стерилен течен азот ⁽⁴¹⁾, което е опция и при внос на гаметите от други лаборатории, дори когато настоящата пандемия приключи ⁽⁴²⁾. Всъщност, настоящата обстановка поражда повишено търсене на внесени проби и в перспектива тези процеси трябва да намерят оптимално решение.

От практическа гледна точка, това може да окаже влияние върху процедурите за криоконсервация на сперма за онкологично болни и подчертава необходимостта от възобновяване на услугите

Concluding remarks

Based on the latest epidemiological data on the course of pregnancy under COVID-19 conditions, there is no evidence to suggest an increased risk to the mother or fetus. Most likely, the course of the disease after SARS-CoV-2 infection in pregnant women does not differ from that in other young women. In addition, recent data suggest that there is no relation between vertical transmission of infection and malformations, and monitoring of pregnant patients should be individualized based on gynecological indications and maternal/ fetal health status. It is important to keep in mind that the current COVID-19 pandemic causes severe psychological stress and anxiety in pregnant women, which can have adverse effects. In this case, the recommendations for social isolation and quarantine issued by the health authorities in order to avoid further spread of SARS-CoV-2 also play an important role. Therefore, the decision to initiate/ resume or delay medically assisted reproduction (MAR) depends more on social isolation than on COVID-19 and its potential effects during pregnancy. However, given the lack of sufficient knowledge about the pathogenesis of SARS-CoV-2 related to the reproductive system and pregnancy, the current pandemic requires increased caution and human reproductive associations in most cases recommend postponing embryo transfers to current cycles and do not initiate new ones, with rare exceptions. However, it is necessary to monitor for new evidence that may change these recommendations at any time and to adjust the restrictions imposed.

The question of whether SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-2) leading to COVID-19 infection may be present in the testis and/ or semen has not yet been unambiguously answered. It is important to understand the limitations of tests using both antibodies and real-time PCR in interpreting SARS-CoV-2 data when analyzing semen and/or testicular tissue in the absence of appropriate controls. The limitations of diagnostic tests, including sampling methodologies and their validation, are key in interpreting data and developing guidelines for reproductive medicine.

по фертилитет. При мъжете с по-възрастни жени - партньори, зависимият от възрастта субфертилитет може да стане необратим, ако клиниките останат затворени, с изключение на спешните онкологични пациенти. Поради тази причина се предлага умерен подход за възобновяване на IVF услугите ⁽⁴³⁾. В случай на успешна стимулация и оплождане, замразяването на получените ембриони и забавянето на ембриотрансфера може да бъде и стратегия на избор. Препоръчва се използването на силно защитени устройства и сегрегирани криосъдове, като същевременно трябва да се отчитат рисковете, свързани с транспортирането на замразения биологичен материал между клиниките ⁽⁴²⁾.

Общият проблем с набирането на донори на сперма, в светлината на инкубационния период за SARS-CoV-2, също поражда несигурност. Двуседмичното въздържане от края на симптомите, което понастоящем се предлага за потенциалните донори, показващи респираторни симптоми или тези, които са се завърнали от високорискови зони, изглежда не се основава на никакви конкретни последващи проучвания или изследван латентен период за SARS-CoV-2 ⁽⁴⁴⁾. Няма данни за качеството на спермата след инфекция със SARS-CoV-2, но е вероятно периодът на стрес да увеличи концентрациите на кортизол и да понижи качеството на спермата, подобно на ефектите при фебрилни системни заболявания ⁽⁴⁵⁾. Важно е да се установи в контролирани експерименти дали тестисите могат да съдържат SARS-CoV-2 и ако е така, да се определи латентния период на вируса, преди да могат да бъдат изготвени конкретни насоки за репродуктивното здраве ⁽⁴⁶⁾, като същевременно се контролира риска за пациентите и персонала ⁽⁴⁷⁾.

Заклучителни бележки

Въз основа на най-новите епидемиологични данни за протичането на бременност в условията на COVID-19, не съществуват доказателства, които да предполагат повишен риск за майката или плода. Най-вероятно ходът на заболяването след инфекция с SARS-CoV-2 при бременни жени не се различава от този при други млади жени. Освен това, последните данни показват, че няма връзка между вертикално предаване на инфекцията и малформации и контролирането на бременните пациенти трябва да бъде индивидуализирано въз основа на гинекологични показания и здравния статус на майката / плода. Важно е да се има предвид, че настоящата пандемия на COVID-19 причинява силен психологически стрес и безпокойство при бременни жени, което може да оказва неблагоприятни ефекти. В случая важна роля играят и препоръките за социална изолация и карантина, издадени от здравните органи, за да се избягва по-нататъшното разпространение на SARS-CoV-2. Следователно, решението между започване / възобновяване или отлагане на ме-

дицински асистирана репродукция (МАР), зависи по-силно от социалната изолация, отколкото от COVID-19 и неговите потенциални ефекти по време на бременност.

Въпреки това, като се има предвид липсата на достатъчно знания относно патогенезата на SARS-CoV-2 свързана с репродуктивната система и бременността, настоящата пандемия изисква повишено внимание и асоциациите по човешка репродукция в повечето случаи препоръчват отлагане на ембриотрансферите на текущи цикли и не инициират нови цикли, с редки изключения. При все това е необходимо да се следи за нови доказателства, които могат да променят тези препоръки по всяко време и да се коригират наложените ограничения.

Въпросът дали SARS-CoV-2 (тежък остър респираторен синдром-свързан коронавирус-2) водещ до COVID-19 инфекция може да се съдържа в тестисите и / или спермата понастоящем не е получил еднозначен отговор. Важно е да се разберат ограниченията на тестовете използващи както антитела, така и PCR в реално време при интерпретиране на данните за SARS-CoV-2, когато се анализира сперма и/или тестикуларна тъкан в отсъствие на подходящи контроли. Ограниченията на диагностичните тестове, включително методологиите за вземане на проби и тяхното валидиране, са от ключово значение при интерпретиране на данните и изготвянето на насоки за репродуктивната медицина.

Литература / References

1. ASRM - American Society for Reproductive Medicine COVID-19: Suggestions On Managing Patients Who Are Undergoing Infertility Therapy Or Desiring Pregnancy. 2020a. Available at: <https://www.asrm.org/news-and-publications/news-and-research/press-releases-and-bulletins/covid-19-suggestions-on-managing-patients-who-are-undergoing-infertility-therapy-or-desiring-pregnancy/>
2. ASRM - American Society for Reproductive Medicine Patient Management and Clinical Recommendations During the Coronavirus (COVID-19) Pandemic. 2020b. Available at: <https://www.asrm.org/news-and-publications/covid-19/statements/patient-management-and-clinical-recommendations-during-the-coronavirus-covid-19-pandemic/>
3. ESHRE - European Society for Human Reproduction and Embryology Coronavirus Covid-19: ESHRE statement on pregnancy and conception. 2020. Available at: <https://www.eshre.eu/Press-Room/ESHRE-News>.
4. IFFS statements on COVID-19 and reproduction. 2020. <https://www.iffsreproduction.org/page/COVIDStatements>.
5. Bedford J, Enria D *et al.*, COVID-19: towards controlling of a pandemic, 2020, *Lancet*, 395: 1015-1018
6. Smith A, Gromski P *et al.* Population implications of cessation of IVF during the COVID-19 pandemic. 2020, *RBMO*, 41⁽³⁾: 428-430
7. RED LARA- Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. SBRA Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida Reprodução Assistida e Covid-19 [nota conjunta SBRA e REDLARA. 2020. Available at: <https://sbra.com.br/noticias/reproducao-assistida-e-covid-19-nota-conjun-ta-sbra-e-redlara/>

8. Van Soom A, Wrathall AE, Herrler A, Nauwynck HJ. Is the zona pellucida an efficient barrier to viral infection? 2010, *Reproduction, Fertility and Development*, 22⁽¹⁾:21-31
9. Drosten C, Günther S *et al.*, Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. 2003, *N Engl J Med*, 348⁽²⁰⁾:1967-76.
10. Ksiazek TG, Erdman D *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. 2003, *N Engl J Med*, 348⁽²⁰⁾:1953-66
11. Zaki AM, Van Boheemen S *et al.* Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. 2012, *N Engl J Med*, 367⁽¹⁹⁾:1814-20
12. Pengfei S, Qie S, Liu Z *et al.*, Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection: A single arm meta-analysis. 2020, *J Med Vir*, 92⁽⁶⁾: 612-17.
13. Lu R, Zhao X *et al.*, Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding, 2020, *Lancet*, 10224(395): 565-574.
14. Zhu N, Zhang D *et al.*, A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. 2020, *N Engl J Med*, 382:727-733
15. Ou, X., Liu, Y., Lei, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. 2020, *Nat Commun* 11, 1620
16. Zhao Y, Zhao Z *et al.*, Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. 2020, *Am J Resp Crit Care Med*, 202(5).
17. Wang W, Xu Y *et al.*, Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens, 2020, *JAMA*, 323⁽¹⁹⁾:1843-1844
18. Li M, Chen L, Zhang J, Xiong C, Li X. The SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression of maternal-fetal interface and fetal organs by single-cell transcriptome study. 2020, *PLoS ONE* 15(4): e0230295
19. Colaco S, Chhabria K *et al.*, A single-cell RNA expression map of coronavirus receptors and associated factors in developing human embryos. 2020, <https://arxiv.org/abs/2004.04935>
20. Diangeng Li, Meiling J *et al.*, Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019. 2020, *JAMA Netw Open*, 3(5): e208292.
21. Holtmann N, Edimiris Ph *et al.*, Assessment of SARS-CoV-2 in human semen—a cohort study. 2020, *Fertil Steril*, 114⁽²⁾: 233-238.
22. Stanley KE, Thomas E, Leaver M, Wells D, Coronavirus disease-19 and fertility: viral host entry protein expression in male and female reproductive tissues. 2020, *Fertil Steril*, 114⁽¹⁾:33-43.
23. Chen D, Yang H *et al.* Expert consensus for managing pregnant women and neonates born to mothers with suspected or confirmed novel coronavirus (COVID-19) infection. 2020, *Int J Gynaecol Obstet*.
24. Liang H, Acharya G. Novel corona virus disease (COVID-19) in pregnancy: What clinical recommendations to follow? 2020, *Acta Obstet Gynecol Scand*, 99: 439-442.
25. Rashidi Fakari F, Simbar M. Coronavirus Pandemic and Worries during Pregnancy; a Letter to Editor. 2020, *Arch Acad Emerg Med*, 8:e21
26. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. 2006, *Emerg Infect Dis*;12:1638-1643.
27. Wong SF, Chow KM *et al.* Pregnancy and perinatal outcomes of women with severe acute respiratory syndrome. 2004, *Am J Obstet Gynecol*, 191:292-297.
28. Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA *et al.* Novel Influenza A (H1N1) Pregnancy Working Group. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA. 2009, *Lancet*; 374:451-458.
29. Schwartz DA, Graham AL. Potential Maternal and Infant Outcomes from (Wuhan) Coronavirus 2019-nCoV Infecting Pregnant Women: Lessons from SARS, MERS, and Other Human Coronavirus Infections. 2020, *Viruses*; 12⁽²⁾: E194.
30. WHO - World Health Organization Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) 2020d. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>
31. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S *et al.* SARSCoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. 2020, *Cell*, 181.
32. Pan F, Xiao X, Guo J *et al.* No evidence of SARS-CoV-2 in semen of males recovering from COVID-19. 2020, *Fertil Steril*, 113⁽⁶⁾: 1135-1139.
33. Salam AP, Horby PW. The Breadth of *Viruses* in Human Semen. 2017, *Emerg Infect Dis*, 23: 1922-1924.
34. Philip J, Selvan D, Desmond AD. Mumpsorchitis in the non-immune post-pubertal male: a resurgent threat to male fertility? 2006, *BJU Int*; 97: 138-141
35. Xu J, Qi L, Chi X *et al.* Orchitis: A complication of severe acute respiratory syndrome (SARS). 2006, *Biol Reprod*, 74: 410-416.
36. Feldmann H. Virus in Semen and the Risk of Sexual Transmission. 2018, *N Engl J Med*; 378: 1440-1441
37. IFFS - International Federation for Fertility Societies. Updates and Resources Related to the Coronavirus Pandemic and COVID-19. 2020, <https://www.iffsreproduction.org/general/custom.asp?page=COVID-19>
38. Cimadomo D, Capalbo A, Ubaldi FM, *et al.* The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Research International*, 2016:7193075. DOI: 10.1155/2016/7193075.
39. Rienzi L, Bariani F, Dalla Zorza M. *et al.* Comprehensive protocol of traceability during IVF: the result of a multicentre failure mode and effect analysis. *Hum. Reprod.* 2017; 32: 1612-1620
40. Bielanski A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. 2012, *Theriogenology*, 77: 467-482
41. Parmegiani L, Accorsi A, Bernardi S *et al.* A reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). 2012, *Fertil Steril*; 98: 870-875
42. Yakass MB, Woodward B. COVID-19: should we continue to cryopreserve sperm during the pandemic. 2020, *RBM Online*.
43. HFEA 2020, Coronavirus (COVID-19) guidance for professionals; <https://www.hfea.gov.uk/treatments/covid-19-and-fertility-treatment/coronavirus-covid-19-guidance-for-professionals/>
44. La Marca A, Niederberger C *et al.* COVID-19: lessons from the Italian reproductive medical experience. 2020, *Fertil Steril*, 113(5): 920-922.
45. Chan JC, Morgan CP, Leu AN *et al.* Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment. 2020, *Nat Commun*; 11: 1499.
46. Cardona Maya WD, Du Plessis SS, Velilla PA. SARS-CoV-2 and the Testis: similarity to other *viruses* and routes of infection. 2020, *RBM Online*, 40⁽⁶⁾: 763-764.
44. Anifandis G, Messini CI, Daponte A, Messinis IE. COVID-19 and fertility: A virtual reality. 2020, *RBM Online*; 41⁽²⁾: 157-159.

БЪЛГАРИЯ - ПЪЛНОПРАВЕН ПАРТНЬОР В ЕВРОПЕЙСКАТА МРЕЖА НА БИОМЕДИЦИНСКИ НАУЧНИ ИНФРАСТРУКТУРИ

BULGARIA - FULL MEMBER OF THE EUROPEAN NETWORK OF RESEARCH INFRASTRUCTURES IN BIOMEDICINE

От 2019 година България официално се присъедини със статут на пълноправна държава-членка към Европейския консорциум за транслационна медицина EATRIS - ERIC (<https://eatris.eu/>). Участието на България е част от държавните политики в областта на науката и иновациите с принципал Министерство на Образованието и Науката. Членството в EATRIS - ERIC, както и членството на България в други два международни консорциума: BBMRI - Изследователска инфраструктура за биобанкиране и биомолекулярни ресурси (<http://www.bbMRI-eric.eu/>) и EuroBioImaging - Европейската научноизследователска инфраструктура за технологии за наблюдения в биологичните и биомедицинските науки (<https://www.eurobioimaging.eu/>) отбелязват важни стъпки към разгръщането на национална мрежа от публично и смесено финансирани институции с активна дейност в биомедицинския сектор за устойчиво развитие на компетенции и човешки потенциал.

EATRIS - ERIC е паневропейски консорциум към ЕС създаден за ускоряване на процеса на транслиране на изследователски открития в иновативни стратегии и подходи за медицинска превенция, диагностика и лечение. EATRIS помага на академичните среди и индустрията да намалят риска при разработване на нови лекарства, ваксини или диагностични програми за развитие и да увеличат потенциала си за достигане до пациенти. EATRIS осигурява бърз и адаптиран достъп до авангардни технологии и опит в транслационните изследвания, включително пандемии като COVID -19 като се фокусира върху предклиничното и ранното клинично разработване на обещаващи медикаменти, ваксини и диагностика. Потребителите от държавите -членки могат да получат достъп до огромния спектър от клинични познания и съоръжения от висок клас, които са на разположение в рамките на 105 академични центрове на най-високо ниво в 13 страни от Европа. Предлагат се решения в областта на лекарствените продукти за модерна терапия, биомаркерите, образната диагностика и проследяването, малките молекули и ваксините. Статутът на България осигурява на държавно ниво право на глас при определяне на стратегиите и политиките в управителните органи на EATRIS-ERIC. Българската научна общност получава възможност за пълен достъп до продуктите платформи, научна и технологична експертиза и услуги, участие в пан-европейски проекти и публично-частни партньорства и др.

През 2020 година с участието на екипи от Софийски Университет и БАН стартира изпълнението на проекта **EATRIS-PLUS** - водещ проект на EATRIS - ERIC за устойчиво развитие в областта на персо-

nalized medicine. Since 2019, Bulgaria has officially joined the European Consortium for Translational Medicine EATRIS - ERIC (<https://eatris.eu/>) with the status of a full member state. Bulgaria's participation is part of the state policies in the field of science and innovation implemented by the principal - the Ministry of Education and Science. Bulgaria's membership in EATRIS - ERIC, as well as in two other international consortia: BBMRI - Biobanking and BioMolecular Resources Research Infrastructure (<http://www.bbMRI-eric.eu/>) and EuroBioImaging - European Research Infrastructure for Imaging Technologies in Biological and Biomedical Sciences (<https://www.eurobioimaging.eu/>) marks important steps towards the development of a national network of publicly and mixed-funded institutions active in the biomedical sector for the sustainable development of competencies and human potential.

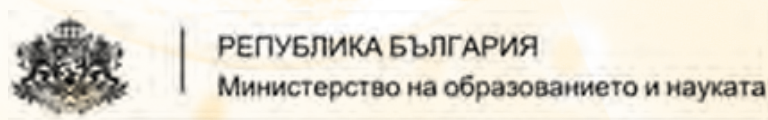
EATRIS - ERIC is a pan-European consortium of EU established to accelerate the process of translating research findings into innovative strategies and approaches for medical prevention, diagnostics, and treatment. EATRIS helps academia and industry de-risk the development of new drugs, vaccines or diagnostic programs and increase their potential to reach patients. EATRIS provides fast and tailored access to cutting-edge technologies and experience in translational research, including in time of pandemics such as COVID-19, focusing on preclinical and early clinical development of promising drugs, vaccines, and diagnostics. Member States' users can access the huge range of high-class clinical knowledge and facilities available within 105 top-level academic centers in 13 European countries. Solutions are offered in the field of advanced therapy medicinal products, biomarkers, imaging and monitoring, small molecules and vaccines. The national status of Bulgaria provides the right to vote in determining the strategies and policies of the governing bodies of EATRIS-ERIC. The Bulgarian scientific community may benefit from full access to product platforms, scientific and technological expertise and services, participation in pan-European projects and public-private partnerships and others.

In 2020, with the participation of teams from Sofia University and BAS, the implementation of the **EATRIS-PLUS** project - a key project of EATRIS - ERIC for sustainable development in the field of personalized medicine, funded by the European Commission under H2020-INFRADEV-3 call. Through EATRIS-PLUS Bulgaria will receive comprehensive expertise for long-term development of the scientific and scientific-applied infrastructure

нализираната медицина, финансиран от Европейската комисия в конкурса H2020-INFRADEV-3. Чрез EATRIS-PLUS България ще получи обхватна експертиза за дългосрочно развитие на научната и научно-приложна инфраструктура в областта на персонализираната медицина. Проектът предвижда целева подкрепа за изграждане на капацитети за транслационна медицина в България чрез обмяна и обучение, разработване и внедряване на добри практики при интегрирано използване на молекулярни омикс технологии за персонализирана превенция, диагностика и лечение, оптимизиране на експериментални и аналитични стратегии, стимулиране на експертните умения на млади учени към профилирането на биомаркери за изследвания при хората.

Създаването на партньорска национална биомедицинска общност от заинтересовани институции EATRIS-България стартира през 2019 година и има за цел активно сътрудничество и обмен в развитието на транслационната медицина в България. Чрез националното представителство ще бъде осигурен централизиран достъп до високо технологична експертиза за разработването на иновационни биотехнологични продукти с приложение в медицината, до европейска правна, етична и законова информация, до международна експертиза при изготвяне на анализи и дизайн на преклинични и клинични проучвания, бизнес планове и планове за реализация на инфраструктурни проекти, бърз и сигурен обмен на партньорства за проектно участие в Хоризонт Европа и др.

С подкрепата на проект EATRIS-Plus, H2020 GA 871096



Република България е представена в EATRIS-ERIC чрез Министерство на Образованието и Науката

Национални представители

в Борда на Управителите на EATRIS-ERIC:

Г-жа Янита Жеркова, Началник на отдел „Национални научни инициативи“, Дирекция „Наука“
Милена Главчева, Главен експерт, Дирекция „Наука“
Министерство на Образованието и Науката

Национални представители на научната общност в EATRIS-ERIC:

Проф. дбн Росица Конакчиева,
Национален Директор
Чл.-кор. проф. дбн Румен Панков,
Научен Експерт
Софийски Университет „Св. Климент Охридски“

EATRIS-БЪЛГАРИЯ

Национално представителство на EATRIS-ERIC
Биологически Факултет, СУ „Св. Климент Охридски“
1164 София, Бул. Драган Цанков 8

in the field of personalized medicine. The project provides targeted support for capacity building for translational medicine in Bulgaria through exchange and training, development and implementation of good practices in integrated use of molecular omix technologies for personalized prevention, diagnostics and treatment, optimization of experimental and analytical strategies, enhancement of expert skills of young scientists in the profiling of biomarkers for human research.

The establishment of a partner national biomedical community of interested institutions EATRIS-Bulgaria started in 2019 and aims at active cooperation and exchange in the development of translational medicine in Bulgaria. The national node will provide centralized access to high-tech expertise for the development of innovative biotechnological products with medical applications, to European ethical and legal information, to international expertise in the preparation and analysis of preclinical and clinical studies, business plans and plans for implementation of infrastructure projects, fast and secure exchange of partnerships for project participation in Horizon Europe, etc.

Support under Grant EATRIS-Plus, H2020 GA 871096



Republic of Bulgaria is represented in EATRIS-ERIC by the Ministry of Education and Science

National Representatives in EATRIS-ERIC Board of Governors (BoG)

Mrs Yanita Zherkova,
Chief Expert National Initiatives, Science Directorate
Mrs Milena Glavcheva, Expert, Science Directorate
Ministry of Education and Science

National Representatives in EATRIS-ERIC Board of National Directors (BoND)

Prof. Dr. Habil. Rossitza Konakchieva,
National Director
Prof. Dr. Habil. Roumen Pankov, Member
Sofia University, Faculty of Biology

EATRIS-BULGARIA

National Node of EATRIS-ERIC
Faculty of Biology, Sofia University “St Kl Ohridski”
8, Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia Bulgaria

РЕПРОДУКТИВНАТА ИМУНОЛОГИЯ – ВСЕ ОЩЕ ВЛИЯТЕЛНА НАУЧНА ОБЩНОСТ И ОБЛАСТ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Тодорова К.^{1,2}, Хайрабедян С.^{1,2}

¹ Лаборатория по репродуктивни ОМИКС технологии, Институт по биология
и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН

² Международна координационна комисия по имунология на репродукцията

REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY – A STILL IMPACTFUL SCIENTIFIC COMMUNITY AND FIELD OF RESEARCH

K. Todorova^{1,2}, S. Hayrabyan^{1,2}

¹ Laboratory of Reproductive OMICs Technologies, Institute of Biology and Immunology of
Reproduction “Acad. Kiril Bratanov”, Bulgarian Academy of Sciences

² International Coordination Committee for Immunology of Reproduction

Както изтъква първият главен редактор на списание Репродуктивна имунология (1972), откритията на **Илия Мечников** (1845 – 1916), които му донасят Нобелова награда и по-късно на **Карл Ландщайнер** (1868 – 1943) за фагоцитозата и аглутинините/резус фактора поставят основата на вероятно най-важния принос на репродуктивната имунология към клиничната практика – установяването на резус несъвместимостта при хемолитичната болест на фетуса и новороденото и нейното лечение чрез имунизация с анти-D антитела.⁽¹⁾

Имуногенността на сперматозоидите е открита от Мечников през 1899 г.⁽²⁾ Нейното значение при репродуктивни неуспехи е установено 50 години по-късно от Братанов и сътр. (1949), който първи доказва връзката между антиспермалните антитела и инфертилитета при домашни животни (юници).⁽³⁾ Скоро след това **Гай-Андре Воазен** (1920 – 2020) показва наличието на сперматозоидни автоантигени при морски свинчета. **Ф. Румке** демонстрира подобен феномен при мъже (1959) и свързва присъствието на антиспермалните антитела с клиничната проява на инфертилитет⁽¹⁾. Ключови в областта са проучванията на **Шинзо Изоджима** и сътр. (1968), които идентифицират същинската молекулярна структура на повърхностните спермални антигени и тяхната конкретна роля като причина за безплодие, като при мъже, така и при жени.⁽⁴⁾

Фактичката повратна точка и възникването на репродуктивната имунология първо като изследователско направление без определено име и после като нова научна област е лекцията на **Питър Медауор** пред Британското дружество по експериментална биология (1953), на която той идентифицира действително парадоксалната същност на имунологичното взаимодействие между бременната жена и антигенно чуждия фетус.⁽⁵⁾ По-късно той получава Нобелова награ-

As it is emphasized by the first ever Editor-in-chief of the Journal of Reproductive Immunology (1972), the Nobel prized findings of **Ilya Mechnikov** (1845–1916) and later **Karl Landsteiner** (1868–1943) of phagocytosis and agglutinins / rhesus factor have let the foundation for arguably the most important clinical contribution that reproductive immunology has ever made, the recognition of rhesus haemolytic disease of the foetus and newborn and its treatment by injection of anti-D antibody.⁽¹⁾

Spermatozoal immunogenicity was discovered by Mechnikov in 1899.⁽²⁾ The actual implication for reproductive failure was found 50 years later by Bratanov *et al.* (1949) who is first to establish the relationship between antisperm antibodies and infertility in domestic animals (heifers).⁽³⁾ Soon after **Guy-Andre Voisin** (1920 - 2020) demonstrated the existence of spermatozoal autoantigens in guinea pigs. **Ph. Rumke** have demonstrated similar phenomenon in human males (1959) with the existence of anti-spermatozoa antibodies related to clinical infertility.⁽¹⁾ Pivotal were the studies of **Shinzo Isojima et al.** (1968) who identified the actual molecular structures of sperm surface antigens and their precise role in the induction of infertility in both males and females.⁽⁴⁾

The actual turning point and the inception of Reproductive Immunology first as a research trend without a name and later a new scientific field was the invited lecture of **Peter Medawar** to the British Society for Experimental Biology (1953), where he identifies the truly paradoxical nature of the immunological relationship between the pregnant mother and her antigenically foreign foetus.⁽⁵⁾ He was awarded Nobel Prize later for his establishing the transplantation immunology field. His postdoctoral fellow, **Rupert Billingham** further develops the concept of the role of transplantation immunity and the maternal-foetal relationship (1964), recognizing the uterus as an immunologically privileged site. Later (1971), together with **Alan Beer**, they further

да за утвърждаването на трансплантационната имунология. Неговият докторант, *Рупърт Билингам* развива по-нататък идеята за значението на трансплантационния имунитет и връзката майка – фетус (1964), идентифицирайки матката като имунологично специфично място. През 1971 г. заедно с *Алън Бийр* допълнително разширяват тази концепция чрез свързани изследвания на фетуса и плацентата като транспланти.⁽¹⁾

Откритията и идеите, които се стремят да ги обяснят се натрупват в продължение на дълъг период от време, но действителното научно направление се установява след като вдъхновяваща и силна инерция се набира не другаде, а тук във Варна, България. През септември 1967 г., *Кирил Братанов* (1911 – 1986) и неговите сътрудници след активна кореспонденция с други учени в областта на репродуктивната имунология свикват **Първи симпозиум по имунология на сперматозоидите и оплождането във Варна, България**. Присъстват участници от повече от 20 страни от целия свят, както и представители на Световната здравна организация (СЗО) и Организацията на ООН по прехрана и земеделие (ФАО). По време на **Симпозиума се създава Международният координационен комитет по имунология на репродукцията (МККИР)**. Негова основна цел е да съгласува научно-изследователската дейност в областта на репродуктивната имунология в различните държави и да организира симпозиуми във Варна на всеки 3 години.^(6,7)

През 1969 г. МККИР провежда среща на тема „Имунология на репродукцията“ в главната квартира на СЗО в Женева и избира Управителен съвет, в който влизат: президент – К. Братанов, вицепрезидент – С. Шулман, генерален секретар – Р. Едуардс, секретар – И. Соколовская, ковчезник –

expand the concept in tier studies of the foetus and placenta as transplants.⁽¹⁾

The findings and concepts trying to explain them have been gathered together over long period of time, but the actual trend have emerged after an enthusiastic and energetic momentum has formed nowhere else, but here in Varna, Bulgaria. In September 1967, *Kiril Bratanov* (1911 - 1986) and his collaborators, after intensive correspondence with other researchers in reproductive immunology convened **the First Symposium on Immunology of Spermatozoa and Fertilization in Varna, Bulgaria**. Participants from more than 20 countries all over the world as well as the representatives from World Health Organization (WHO) and the Food and Agricultural Organization (FAO) attended the Symposium. During the Symposium, **the International Coordination Committee for Immunology of Reproduction (ICCIR)** was founded. The main aim of the ICCIR was to coordinate research work on reproductive immunology between different countries and every 3 years to organize symposia in Varna.^(6,7)

In 1969 the ICCIR held a meeting on “Immunology and Reproduction” at WHO headquarters in Geneva and elected the ICCIR Steering Committee as follows: President – *K. Bratanov*, Vice-President – *S. Shulman*, Secretary General – *R. Edwards*, secretary - *I. Sokolovskaya*, Treasurer – *A. Eyquem*. It was registered in Paris and in Sofia and its offices were in Sofia and Cambridge.⁽⁶⁾ These two events gave impetus to serious and profound research work in the field of reproductive immunology in many countries. In 1975 at the 3rd Symposium in Varna **the International Society of Immunology for Reproduction (ISIR)**, was founded by proposal of Kiril Bratanov who was later elected as its first president, when the Society was registered in France.^(6,7)

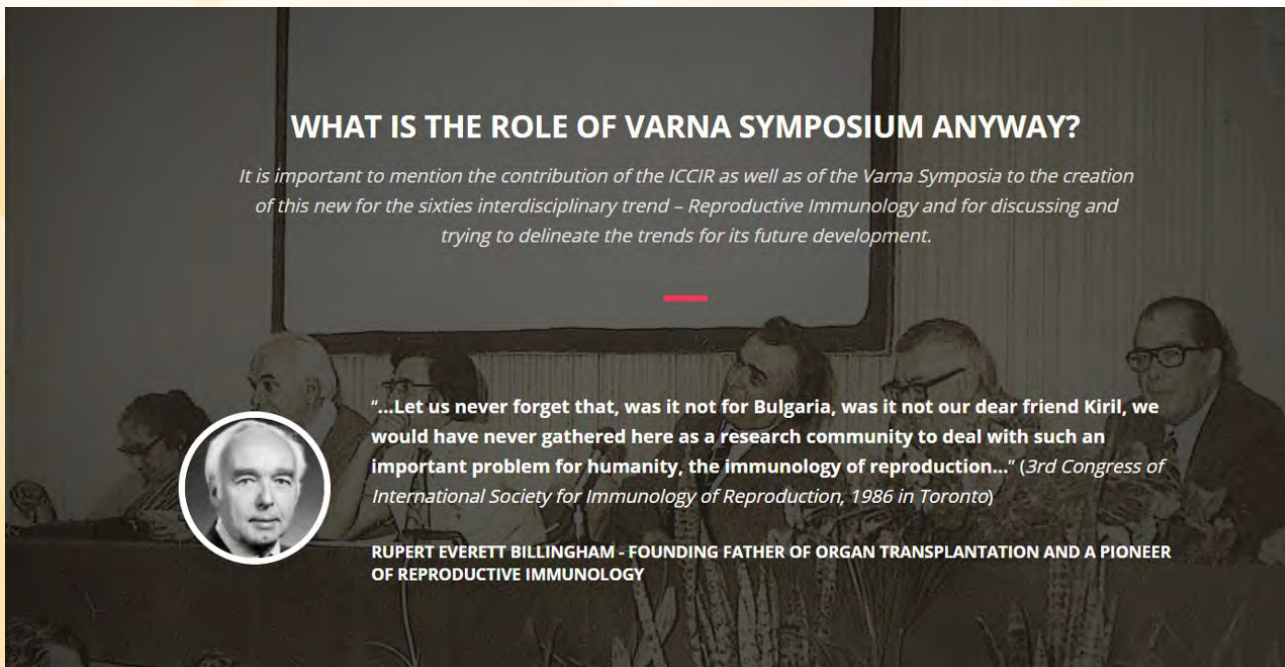


Fig.1. The background photography shows Shulman talking on the First Symposium on Immunology of Spermatozoa and Fertilization in Varna, Bulgaria, in 1967. Robert Edwards is the third chairman from left.

А. Айкуем. Регистриран е в Париж и София и има офиси в София и Кейбридж.⁽⁶⁾ Тези две събития дават тласък за развитието на задълбочена и солидна научно-изследователска работа в областта на репродуктивната имунология в много страни. През 1975 г. по време на третия Симпозиум във Варна е сформирано Международното дружество по имунология на репродукцията (МДИР) по предложение на Кирил Братанов, който когато по-късно то е регистрирано във Франция е избран за негов първи президент.^(6,7) Симпозиумите на МККИР във Варна се състоят до кончината на Кирил Братанов. По-късно Райна Георгиева възстановява тяхното провеждане с 9. МККИР Симпозиум през 1997 г. и остава президент на Координационния комитет до 2019 г.

Какво всъщност е значението на Варненските Симпозиуми? Важно е да се отбележи приноса на МККИР и Симпозиумите във Варна за създаването на това ново за 60^{-те} години интердисциплинарно направление – репродуктивната имунология и за подлагането на дискусия и очертаването на насоките за бъдещо развитие в областта. Периодът от време след първия Симпозиум е достатъчно дълъг, за да се състоят редица значителни събития – фундаментални и клинични постижения в репродуктивната имунология, основаването на МДИР, на Европейското дружество по репродуктивна имунология (ЕДРИ) и много национални такива. Понастоящем, огромна армия от млади, интелигентни и амбициозни учени по целия свят изследват фундаменталните и клинични аспекти на репродуктивната имунология.⁽⁶⁾

Като обобщение е най-добре да се цитира **Рупърт Еверет Билингам** – основоположника на органната трансплантация и пионер в репродуктивната имунология, който на 3. Конгрес на МДИР през 1986 г. в Торонто, казва: „...Нека никога не забравяме, че ако не беше България и нашият скъп приятел Кирил, никога нямаше да се съберем тук като научна общност да разглеждаме такъв важен проблем за човечеството, имунологията на репродукцията....“.⁽⁶⁾

Един от незабравимите моменти на първия Симпозиум във Варна и неговото влияние в областта всъщност е запечатан в речта по приемането на Нобеловата награда, изнесена от името на проф. **Робърт Едуардс**, където текстове и снимки под негово ръководство са прочетени и показвани. Речта на **Едуардс** през 1967 г. пред аудитория от повече от 150 учени от 20 държави е представена заедно с вградена снимка на **Кирил Братанов**.⁽⁸⁾

Ковчезникът на ЕДРИ, проф. **Удо Йешке** дефинира репродуктивната имунология в 21. век като наука, която изследва проблем известен от десетилетия – фетусът като семи алографт и неговият отговор на майчината имунна система. Следователно, има остра нужда да се изяснят

The ICCIR symposia held in Varna were governed until the passing away of Kiril Bratanov, and they were later re-established by Rayna Georgieva at the 9th ICCIR Symposium held in 1997. She has been an ICCIR President until 2019.

What is the role of Varna symposium anyway? It is important to mention the contribution of the ICCIR as well as of the Varna Symposia to the creation of this new for the sixties interdisciplinary trend – Reproductive Immunology and for discussing and trying to delineate the trends for its future development. The period since the 1st Symposium was long enough to be marked by a number of significant events: fundamental and clinical achievements in reproductive immunology, foundation of the International Society for Immunology of Reproduction (ISIR), the European Society for Reproductive Immunology (ESRI) and many national societies of reproductive immunology. Today, a huge army of young, intelligent and ambitious researchers all over the world investigate basic and clinical aspects of reproductive immunology.⁽⁶⁾

To summarize it is better to quote **Rupert Everett Billingham** – the founding father of organ transplantation and a pioneer of Reproductive Immunology who said on the 3rd Congress of International Society for Immunology of Reproduction, 1986 in Toronto “...Let us never forget that, was it not for Bulgaria, was it not our dear friend Kiril, we would have never gathered here as a research community to deal with such an important problem for humanity, the immunology of reproduction...“.⁽⁶⁾

One of the everlasting moments of the first Varna Symposium and its impact on the field is actually imprinted in the Nobel Prize speech that was given on behalf of Prof. **Robert Edwards**, where writings and photos under his direction were read and shown. The 1967 speech of **Edwards** in front of the audience of more than 150 scientists from 20 countries is presented together with inline photo of **Kiril Bratanov**.⁽⁸⁾

As defined by ESRI treasurer, Prof. **Udo Jeschke**, Reproductive Immunology in the 21st century deals still with a problem known for decades – the foetus as semi allograft and its response to the maternal immune system. Therefore, there is a strong need to solve problems like spontaneous and recurrent miscarriages and in addition repeated implantation failure. In addition, socio-economical changes in an aging society are an additional challenge especially for the reproductive medicine specialist. Although highly developed in vitro fertilization techniques are available, many couples still face the problem of childlessness. A quite new player in the field is the microbiome of the reproductive tract. For decades it was believed that the uterus is sterile but an up to date analyses revealed that we not only have a vaginal microbiome but also a cervical, uterine, male and even a placental microbiome.⁽⁹⁾

въпроси като спонтанните и повтарящи се аборти и в допълнение многократни неуспешни имплантации. Същевременно, социалните и икономически промени в застаряващото население са още едно предизвикателство за специалистите по репродуктивна медицина. Независимо, че са разработени много усъвършенствани техники за ин витро оплождане, значителен брой двойки се изправят пред проблема с безплодието. Нов играч на полето е микробиомът на репродуктивния тракт. В продължение на десетилетия се считаше, че матката е стерилна, но съвременните анализи показват, че освен вагиналния, съществуват и цервикален, маточен, мъжки и дори плацентарен микробиоми.⁽⁹⁾

Дали това направление е дало всичко от себе си? Аз искрено вярвам, че ще има още развитие, т.к. много от фундаменталните въпроси, касаещи репродуктивния процес все още търсят отговор. Въпреки всичко, имунната система играе роля на двойно-заточено острие – да защитава от организми имащи чужд геном, но също така да ни предпазва от смущения в нашия собствен. В този аспект тя е връзката между феномена на (епо)геномната стабилност и ранното ембрионално развитие с взаимодействието майка - хазяин, но също така и със собствения отговор на фетуса на по-късен етап в развитието му.

Литература / References

1. Billington, W.D., Origins and evolution of reproductive immunology: a personal perspective. *J. Reprod. Immunol.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2014.10.003>
2. Mechnikov, I., 1899. Etudes sur la resorption des cellules. *Ann. Inst. Pasteur* 13, 737–769.
3. Bratanov, K., et al., 1949. Sur la formation des spermoanticorps dans l'organisme des animaux domestiques. *Ann. Acad. Rurale "G. Dimitrov," Fal. Med. Vet.* 26, 321–334 (Bulg. Res. Fr.).
4. Isojima, S., et al., 1968. Immunologic analysis of sperm-immobilizing factor found in sera of women with unexplained sterility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 101, 677–683.
5. Medawar, P.B., 1953. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7, 320–338.
6. International Coordination Committee for Immunology of Reproduction – <http://www.iccir1967.com/history.php>
7. Shinzo Isojima. The 25 years history of JAPAN SOCIETY for IMMUNOLOGY of REPRODUCTION (JSIR). *Reproductive Immunology and Biology.* 2010 Volume 25 Issue 2 Pages 93-122. <https://doi.org/10.3192/jsirib.25.93> https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsirib/25/2/25_2_93/_article
8. Robert Edwards, Nobel Lecture/Nobel Prize Symposium in Honour of Robert G. Edwards, December 7, 2010 - <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2010/edwards/lecture/>
9. Special Issue "Reproductive Immunology: Cellular and Molecular Biology", International Journal of Molecular Sciences (ISSN 1422-0067). Special Issue Editors: Prof. Dr. Udo Jeschke, Prof. Dr. Antonis Makrigiannakis - https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/reprod_immunol

Has this trend shown its best yet? I truly believe there is more to come, as many of the fundamental questions concerning the reproductive process are still to be answered. Nonetheless, immune system has dual sword role – to protect from live forms bearing foreign genomes, but also to protect us from perturbances in our own genome. In this regard the immune system is the bridge that connects the phenomenon of (epi)genome stability and early embryo development with the mother – host interaction, but also with foetus own body response later in live.

Адрес за кореспонденция:

Сорен Хайрабебян
ИБИР-БАН
София, 1113, бул. „Цариградско шосе“ №73
e-mail: shayrabydyan@ibir.bas.bg

Corresponding address:

Soren Hayrabydyan
IBIR-BAS
73 "Tzarigradsko shosse" blvd., 1113, Sofia, Bulgaria
e-mail: shayrabydyan@ibir.bas.bg

С677Т ПОЛИМОРФИЗМА НА ГЕНА НА МЕТИЛЕНТЕТРАГИДРОФОЛАТ РЕДУКТАЗАТА (MTHFR) И НЕГОВАТА РОЛЯ В ЧОВЕШКАТА РЕПРОДУКЦИЯ

Механджиев Ц.

АГ Инвитро Медицински център „Димитров“

METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) C677T POLYMORPHISM AND ITS IMPACT ON HUMAN REPRODUCTION.

Tzv. Mehandjiev

ObGyn invitro medical center "Dimitrov"

Резюме: Макар полиморфизма С677Т в гена за метилентетрахидрофолат редуктазата (МТХФР) да е известен и изучаван от над 30 години, последните открития на ДНК метилирането като основен изключващ механизъм в транскрипцията на гените, както и ролята на МТХФР като скоростопределящ ензим в реметилирането на хомоцистеина до метионин са особено обещаващи за бъдещето изясняване на подлежащите механизми на вече известната роля на МТХФР С677Т полиморфизма в репродукцията на човека. Ние обобщихме в това мини-ревью тези ефекти, започвайки с генетиката и биологията на полиморфизма и завършвайки с ефекта му за загубите на бременността, дефектите на невралната тръба, ефекта му върху плодовете със синдром на Даун и прееклампсията и хипертонията.

Изминали са 32 години откакто през 1998 г. Канг и сътр. за пръв път описват ролята на С677Т полиморфизма на гена на метилентетрахидрофолат редуктазата (MTHFR) в етиопатогенезата на коронарната болест на сърцето⁽¹⁾. Впоследствие проучванията на генния вариант значително се разрастват и понастоящем са налице повече от 3000 научни статии по темата от почти всички области на медицината. Независимо от това, откриването на ДНК метилирането като основен начин за деактивиране на транскрипцията на гени и по-специално състоянието на тотално ДНК деметилиране на човешките ооцити^(3,4) поставят много неизяснени въпроси за ролята на MTHFR С677Т полиморфизма на майката и новосформираната зигота при запазването на виталитета на ембрионите, тяхното развитие и възможността да се роди здраво бебе. Целта на това кратко ревю по въпроса е да внесе разбиране на някои вече известни факти за ефекта на MTHFR С677Т полиморфизма върху интраутеринното развитие на ембриона и фетуса, започвайки от влиянието му върху биохимичните процеси в клетката.

Ген, структура и биология:

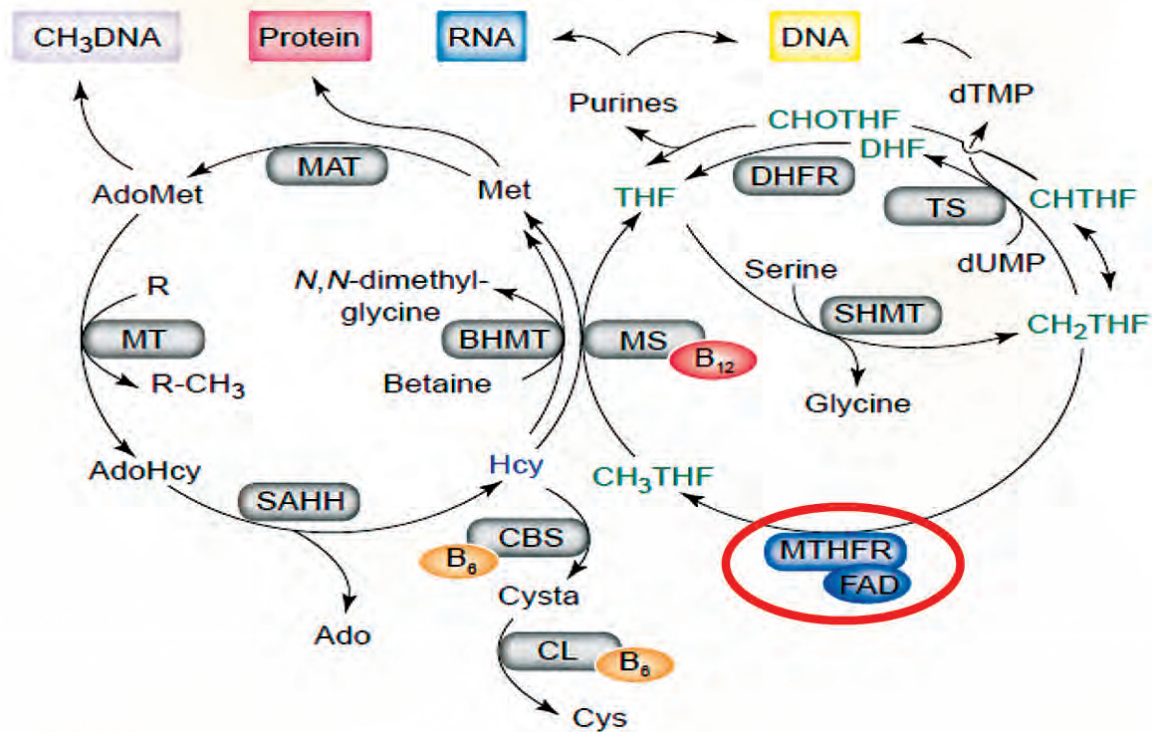
MTHFR С677Т полиморфизма е промяна на единичен нуклеотид (single nucleotide polymorphism – SNP), при който нуклеотида цитозин (С) на 677 позиция в гена на MTHFR е заменен с тимидин (Т). Генът за MTHFR се намира в 1р36.3 локуса на късото рамо на хромозома 1. Точковата мутация на С677Т в екзон 4 на MTHFR е отговорна за смяната на аминокиселината аланин (Ala) на 222 позиция в полипептидната

Abstract: Although methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism has been known and studied for more than 30 years recent discovery of DNA methylation as the main pathway for switching off of gene transcription and the role of MTHFR as speed limiting step in the homocystein remethylation to methionine are very promising for the future elucidation of all already known effects the mother's and foetal genotype for MTHFR C677T polymorphism have on human reproduction. In this mini-review we summarized those effects starting with polymorphism genetics, biology and further continuing with its role on pregnancy loss, neural tube defects, its effect in Down syndrome fetuses and preeclampsia and hypertension.

There have been more than thirty years since methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and its role in the etiopathology of coronary artery disease have been first described by Kang and co-workers in 1988.⁽¹⁾ Since then tremendous research on this polymorphism have been done with currently more than 3000 articles on the topic available in virtually any field of medicine. Yet the epigenetic discoveries of DNA methylation as the main pathway of gene switch off for gene transcription⁽²⁾ and especially the discovery of global DNA demethylation stage of human oocytes^(3,4) leave many unanswered questions about the role of MTHFR C677T polymorphism genotype of mother and especially the newly formed zygote on early embryo survival, development and potential for live birth. In this short review we are aiming to bring some light on some already known facts about the effect of MTHFR C677T polymorphism on the intrauterine development of embryo and foetus, starting with its impact on biochemistry of the cell.

Gene, structure and biology:

MTHFR C677T polymorphism is a single nucleotide polymorphism (SNP) in which cytosine (C) on 677 position of the MTHFR gene is substituted for thymidine (T). The MTHFR gene is located in the 1p36.3 region on the short arm of the first chromosome. The C677T SNP in exon 4 of the MTHFR gene is responsible for an exchange of alanine amino acid (Ala) on 222 position of the coded protein for valine (Val). This leads to thermolability of the protein and decreased enzyme activity, due to decreased affinity of the enzyme for its flavin adenine dinucleotide



Фиг. 1: Биохимична функция на MTHFR ензима. AdoHcy - S-аденозилхомоцистеин; Met - метионин; MS - метионин синтаза; CH₃THF - 5-метилтетрахидрофолат; Hcy - хомоцистеин; Ado - аденозин; AdoMet - S-аденозилметионин; BHMT - бетаинхомоцистеин S-метилтрансфераза; CBS - цистатионин бета-синтаза; CH₂THF - 5,10-метилентетрахидрофолат; CH₃DNA - метилирана ДНК; CHOTHF - формилтетрахидрофолат; CHTHF - метенилтетрахидрофолат; CL - цистатионин лиаза; Cys - цистеин; Cysta - цистатионин; DHF - дихидрофолат; DHFR - дихидрофолат редуктаза; dTMP - деокситимидин 5'-монофосфат; dUMP - деоксиуридин 5'-монофосфат; MAT - метионин аденозилтрансфераза; MT - метилтрансфераза; SAHH - S-аденозилхомоцистеин хидролаза; SHMT - серин хидроксиметилтрансфераза; THF - тетраhydroфолат; TS - тимидилат синтаза;⁽⁶⁾

Fig.1 Biochemical function of the MTHFR enzyme. AdoHcy - S-adenosylhomocysteine; Met - methionine; MS - methionine synthase; CH₃THF - 5-methyltetrahydrofolate; Hcy - homocysteine; Ado - adenosine; AdoMet - S-adenosylmethionine; BHMT - betainhomocysteine S-methyltransferase; CBS - cystathionine beta-synthase; CH₂THF - 5,10-methylenetetrahydrofolate; CH₃DNA - methylated DNA; CHOTHF - formyltetrahydrofolate; CHTHF - methenyltetrahydrofolate; CL - cystathionine lyase; Cys - cysteine; Cysta - cystathionine; DHF - dihydrofolate; DHFR - dihydrofolate reductase; dTMP - deoxythymidine 5'-monophosphate; dUMP - deoxyuridine 5'-monophosphate; MAT - methionine adenosyltransferase; MT - methyltransferase; SAHH - S-adenosylhomocysteine hydrolase; SHMT - serine hydroxymethyltransferase; THF - tetrahydrofolate; TS - thymidylate synthase;⁽⁶⁾

верига с валин (Val). Това води до увеличаване на термолабилността на протеина и понижаване на ензимната му активност, поради намаляване на афинитета на ензима към кофактора му флавин аденин динуклеотид (ФАД). При хетерозиготен генотип (CT), ензимната му активност е около 70%, докато при случаите на TT тя е само 30% от тази на индивиди с CC алели⁽⁵⁾. Биологичното действие на MTHFR ензима е превръщането на 5,10-метилентетрахидрофолата в 5-метилтетрахидрофолат, като това е и реакцията която лимитира скоростта на реметилирането на хомоцистеина в метионин и следователно определя съдържанието на свободни метилови групи необходими за всички клетъчни процеси. Най-добре това може да се визуализира на фиг. 1. С много малки изключения, TT генотипа съставлява около 13-14% от всички човешки популации, а CT - 42-47%^(7,8,9), което свидетелства за сравнително добрата преживяемост, като на хетерозиготните, така и на TT индивидите.

Значение на MTHFR C677T полиморфизма за чо-

(FAD) cofactor. Enzyme activity in heterozygotes (CT) is about 70% of the enzyme's activity in CC genotype individuals. However enzyme's activity of the TT cases is only 30% of the enzyme's activity of CC genotype individuals.⁽⁵⁾ MTHFR enzyme's biologic action is to turn 5,10-methylenetetrahydrofolate into 5-methyltetrahydrofolate and is the speed limiting step in the process of homocysteine remethylation to methionine, thus determining the supply of methyl groups for all the processes of the living cell. The biologic action of the MTHFR enzyme is best depicted on fig.1. With few exceptions TT genotype is 13-14% of all human populations and CT genotype is 42-47% worldwide^(7,8,9), showing overall good survival both for heterozygous as well as TT genotype individuals.

Impact of the MTHFR C677T polymorphism on the human reproduction:

1. Pregnancy loss

In a metaanalysis on 27 studies with 2427 patients

вешката репродукция:

1. Загуба на бременност

Метаанализ проведен от Ву и сътр., включващ 27 проучвания с 2427 пациенти с повтарящи се спонтанни аборти (ПСА) и 3118 контроли, намира статистически значима връзка на *MTHFR 677 TT* генотипа, както и изолираното наличие само на Т алел и ПСА, независимо че механизмът в основата на тази асоциация е неясен⁽¹⁰⁾. В наше проучване, ние успяхме да покажем, че загубата на бременност свързана с Т алела или *TT* генотипа се дължи на тежка децидуална и интервилозна тромбоза, в резултат на локално увеличение нивото на хомоцистеина заради повишената необходимост от метилиране идваща от бързо нарастващите ембрион и трофобласт⁽¹¹⁾.

2. Дефекти на невралната тръба

Установено е, че *TT* генотипа се асоциира с поне двойно повишен риск от възникване на дефекти на невралната тръба във фетуса^(12,13). В свое изследване Ян и сътр. дори откриват 4,1 пъти увеличение на вероятността за развитие на спина бифида, ако майката е *TT*, а фетуса *CT* генотип и 6,1 пъти ако и двамата са *TT*⁽¹²⁾. Важно е да се отбележи, че рискът от дефекти на невралната тръба е петкратно по-висок при случаите с *MTHFR 677 TT* генотип и мутация в гена за цистатион бета синтетазата (CBS), в сравнение със случаите, когато мутациите се срещат отделно^(12,13). Все още обаче, причината за връзката между *MTHFR 677 TT* генотипа и дефектите на невралната тръба не е изяснена. Някои автори обвиняват за това добре известната хиперхомоцистеинемия в тези случаи, а други обясняват тази връзка с нарушения в процеса на ДНК реметилирането във фетуса.

3. Синдром на Даун и други хромозомни аномалии

През последните 20 години са публикувани множество статии, които показват връзка между *MTHFR C677T* полиморфизма при майката и тризомията на 21 хромозома^(14,15,16,17). Коста-Лима и сътр. дори успяват да покажат стратифициране на риска в субтропичните райони между 23,5° и 40° северна и южна ширина, спекулирайки че това се дължи на увеличената субдермална фотолиза на фолиевата киселина⁽¹⁵⁾. Все още обаче, основният механизъм за тази асоциация остава недоуточнен, като през последните години са се наложили две хипотези:

- Неразделяне на двете 21^{-ви} хромозоми в процеса на мейоза в резултат на ДНК хипометилиране на центромерите⁽¹⁶⁾;
- Понижената ензимна активност на *MTHFR* при наличие на Т алел компенсират повишената експресия на гена за цистатион бета синтетазата (ЦБС), локализиран на 21 хромозома. Поради тризомията при синдрома на Даун присъстват 3 копия във фетуса, което води до повишена загуба на метилови групи с урината и намалена преживяемост на *MTHFR 677 CC* генотипа⁽¹⁷⁾.

Нашите изследвания (непубликувани данни), както и трудностите в други проучвания, да се установи

included with repeated pregnancy loss (RPL) and 3118 controls Wu and co-workers found significant association for the *MTHFR 677 TT* genotype, as well as T allele with RPL, although the underlying mechanism is not completely clear.⁽¹⁰⁾ In a recent study we have succeeded to demonstrate that pregnancy loss associated with T allele and *TT* genotype is due to severe decidual and intervillous thrombosis, caused by local increase of the homocysteine levels from increased needs for methylation from rapidly growing embryo and trophoblast.⁽¹¹⁾

2. Neural tube defects

It had been established that *TT* genotype is associated with at least a doubled risk for a neural tube defect of the foetus.^(12,13) In their study Yan and co-workers even found 4.1 fold increased risk for spina bifida if mother is *TT* genotype with *CT* genotype foetus and 6.1 fold increased, if both mother and foetus are *TT* genotype.⁽¹²⁾ It is worthy to mention that the risk for neural tube defects is increased fivefold in cases with both *MTHFR 677 TT* genotype and cystation beta synthetase (CBS) gene mutation, compared to cases having any of the two mutations separately.^(12,13) Still the reason for the association of *MTHFR 677 TT* genotype with neural tube defects has been unknown yet. Some authors blame for it the well-known hyperhomocysteinemia in those cases, while others explain it with impaired process of foetal DNA remethylation.

3. Down syndrome and other chromosomal abnormalities

There have been plenty of articles from the last two decades which associate *MTHFR C677T* polymorphism of the mother with trisomy 21.⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ Costa-Lima and co-workers even managed to stratify the risk to subtropical regions between 23.5° and 40° North and South latitude, speculating that it is due to increased subdermal folate photolysis.⁽¹⁵⁾ Yet the underlying mechanism for this association is still unclear. Two hypotheses for it have emerged in the recent years:

- Chromosomal nondisjunction in the process of meiosis, caused from DNA hypomethylation of the centromeres⁽¹⁶⁾
- T allele associated *MTHFR* decreased enzyme activity combats cystation beta synthetase (CBS) gene overexpression in Down syndrome, as CBS gene is localised on chromosome 21 and Down syndrome fetuses have three copies of it, thus having enhanced methyl group excretion, leading to decreased survival of fetuses with *MTHFR 677 CC* genotype.⁽¹⁷⁾

Our research (unpublished data), as well as relatively few articles for association of other chromosomal abnormalities with mother's *MTHFR C677T* T allele support the second hypothesis.

4. Preeclampsia and hypertension

There is abundance of studies that associate the *MTHFR TT* genotype with increased risk for

връзка на други хромозомни аномалии освен синдрома на Даун с *MTHFR C677T* T алел в майчиния геном, подкрепят втората хипотеза.

4. Преeklampсия и хипертензия

Съществува изобилие от научни изследвания, които показват връзката между *MTHFR TT* генотипа и повишения риск от преeklampсия^(18,19). Подобна асоциация не е изненадваща, предвид факта, че свързаността на *MTHFR C677T* полиморфизма и хипертензията е добре установена. Хориган и сътр. откриват дори, че за да се нормализира кръвното налягане при пациенти с *MTHFR 677 TT* генотип, е необходима дневна доза от 1,6 мг рибофлавин⁽²⁰⁾. Това не е неочаквано, т.к. рибофлавина е прекурсор на ФАД, а ФАД е кофактор на *MTHFR* ензима, към който той има намален афинитет при пациентите хомозиготни по T алела и хетерозиготите и съответно те имат нужда от по-висока концентрация на ФАД, за да я компенсират.

Независимо от множеството задълбочени проучвания през последните 32 години върху *MTHFR C677T* полиморфизма, все още съществуват редица неизяснени въпроси. Не е установено дали субдермалната фотолиза на фолиевата киселина може да има роля и при други патологични състояния, както е при синдрома на Даун⁽¹⁵⁾. Терапията и профилактиката на TT и CT генотиповете също остава предизвикателство. Въпреки че е доказано, че *MTHFR* ензима може лесно да се заобиколи с приемането на достъпните в търговската мрежа таблетки с 5-метилтетрахидрофолат, все още има широко поле за проучвания върху оптималната им доза при различните състояния и случаи. Необходими са и изследвания на възможността други витамини от група В като В2, В6, В12 също да имат положителен ефект върху пациентите с *MTHFR 677 TT* и CT генотип.

preeclampsia.^(18,19) Such an association could not come as surprise, as the link between *MTHFR C677T* polymorphism and hypertension has been long and well established. Even it was found by Horigan and co-workers that to normalize blood pressure in *MTHFR 677 TT* genotype patients daily 1.6 mg riboflavin intervention was needed⁽²⁰⁾, which is not unexpected as FAD is a necessary cofactor of the *MTHFR* enzyme for which TT genotype and T allele patients' enzymes has reduced affinity, hence they need increased FAD concentration to compensate.

Although it has been an area of extensive research in the last 32 years *MTHFR C677T* polymorphism still possess some open questions. It is still unclear if subdermal folate photolysis could play same role in other pathological conditions, as it has been shown to play in the association with Down syndrome.⁽¹⁵⁾ Therapy and prophylaxis of TT and CT genotypes also still remains a challenge. Although it is clear that *MTHFR* enzyme could be easily bypassed with commercially available 5-methyltetrahydrofolate tablets, the optimal dose in different cases and disorders still has plenty of room for research. Research is also needed for the possibility that other group B vitamins as B2, B6, B12 also should have beneficial effect in *MTHFR 677 TT* and CT genotype patients.

Литература / References

1. Kang SS, Wong PW, Zhou JM, *et al.* Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism*. 1988;37(7):611-613. doi:10.1016/0026-0495(88)90076-5
2. Surani, A. (2012). *Epigenomics: From Chromatin Biology to Therapeutics* (K. Appasani, Ed.). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511777271
3. Guo F, Yan L, Guo H, *et al.* The Transcriptome and DNA Methylation Landscapes of Human Primordial Germ Cells. *Cell*. 2015;161(6):1437-1452. doi:10.1016/j.cell.2015.05.015
4. Eckersley-Maslin MA, Alda-Catalinas C, Reik W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(7):436-450. doi:10.1038/s41580-018-0008-z
5. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998;64(3):169-172. doi:10.1006/mgme.1998.2714
6. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):195-201. doi:10.1016/s0165-6147(00)01675-8
7. Agodi A, Barchitta M, Valenti G, Marzagalli R, Frontini V, Marchese AE. Increase in the prevalence of the MTHFR 677 TT polymorphism in women born since 1959: potential implications for folate requirements. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(12):1302-1308. doi:10.1038/ejcn.2011.125
8. Kimura H, Gejyo F, Suzuki S, Takeda T, Miyazaki R, Yoshida H. A C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene modifies serum cysteine in dialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(5):925-933. doi:10.1053/ajkd.2000.19085
9. Moriyama Y, Okamura T, Kajinami K, *et al.* Effects of serum B vitamins on elevated plasma homocysteine levels associated with the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese. *Atherosclerosis*. 2002;164(2):321-328. doi:10.1016/s0021-9150(02)00105-3
10. Wu X, Zhao L, Zhu H, He D, Tang W, Luo Y. Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(7):806-811. doi:10.1089/gtmb.2011.0318
11. Mehandjiev TR, Tenno NM, Nakura Y, *et al.* Impact of maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on intervillous and decidual pathology with pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(1):78-85. doi:10.1111/jog.13798
12. Yan L, Zhao L, Long Y, *et al.* Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offspring: evidence from 25 case-control studies. *PLoS One*. 2012;7(10):e41689. doi:10.1371/journal.pone.0041689
13. van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(4):243-270. doi:10.1177/153537020122600402
14. Wu X, Wang X, Chan Y, Jia S, Luo Y, Tang W. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for Down syndrome offspring: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;167(2):154-159. doi:10.1016/j.ejogrb.2012.11.022
15. Costa-Lima MA, Amorim MR, Orioli IM. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C > T polymorphism and Down syndrome. *Mol Biol Rep*. 2013;40(3):2115-2125. doi:10.1007/s11033-012-2270-z
16. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, *et al.* Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*. 1999;70(4):495-501. doi:10.1093/ajcn/70.4.495
17. Hobbs CA, Cleves MA, Lauer RM, Burns TL, James SJ. Preferential transmission of the MTHFR 677 T allele to infants with Down syndrome: implications for a survival advantage. *Am J Med Genet*. 2002;113(1):9-14. doi:10.1002/ajmg.10704
18. Qian X, Lu Z, Tan M, Liu H, Lu D. A meta-analysis of association between C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and hypertension. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(12):1239-1245. doi:10.1038/sj.ejhg.5201914
19. Wu X, Yang K, Tang X, *et al.* Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for preeclampsia: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(5):797-805. doi:10.1007/s10815-014-0408-8
20. Horigan G, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Purvis J, Scott JM. Riboflavin lowers blood pressure in cardiovascular disease patients homozygous for the 677C->T polymorphism in MTHFR. *J Hypertens*. 2010;28(3):478-486. doi:10.1097/HJH.0b013e328334c126

БЪДЕЩЕТО НА ЧОВЕЧЕСТВОТО ЗАВИСИ ОТ РЕПРОДУКЦИЯТА В КОСМИЧЕСКИ УСЛОВИЯ

Ефтимов П., Стефанова Н.

СУ „Св. Климент Охридски“, бул. „Драган Цанков“ № 8, София, България

THE FUTURE OF THE HUMAN SPECIES DEPENDS ON REPRODUCTION IN SPACE

P. Eftimov, N. Stefanova

Sofia University St Kliment Ohridski, Faculty of Biology, 8 Dragan Tzankov Str., Sofia, Bulgaria

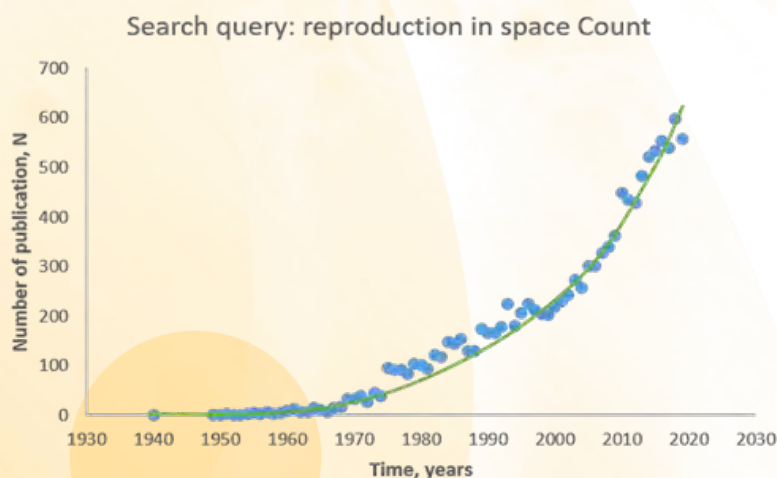
Научният консенсус за космологичното бъдеще на нашата планета предполага, че след по-малко от 1 милиард години целият многоклетъчен живот ще изчезне, поради редица астрономически, геологични и биологични събития.⁽¹⁻⁴⁾ Дори и разполагайки с превъзходната си способност да адаптираме средата според нашите изисквания, в крайна сметка ще бъдем принудени да търсим нов дом. Въпреки че има множество варианти относно кога и как да тръгнем, едно е сигурно: в един момент ще трябва да можем да се възпроизведеме в космоса. Ще се опитаме да обобщим последното десетилетие на изследванията на размножаването на бозайници в Космоса, в опит да покажем нарастващото значение на тази тема за нашето бъдеще като вид. Към момента на написване на тази публикация търсене с ключови думи „възпроизвеждане в космоса“ в Pubmed, дава 11 316 резултата с годишна прогресия, която може да се опише като степенна функция (fig.1). Въпреки че това може да изглежда много, тези публикации представляват само 0,84% от изумителните 1,347,044 публикации за репродукцията като цяло.

Тези данни могат да бъдат обяснени не само с относително новото поле на изследвания, каквато сее явява областта на космическата медицина и астробиологията, но и с недооценяването на значението на разпространението ни като вид

The scientific consensus on the cosmological future of our planet suggests that in less than 1 billion years all multicellular life will go extinct, due to a series of astronomical, geological and biological events.⁽¹⁻⁴⁾ Even with our superior capability of adapting environment according to our requirements, eventually, we will be forced to seek a new home. Although there is a great controversy about when and how do we leave, one certain fact is that at some point, we will have to be able to reproduce in space. We will try to summarize the last decade investigations on mammalian reproduction in space, in an effort to demonstrate the rising importance of this subject for our future as a species.

Up to this year, “reproduction in space” query in Pubmed, returns 11,316 results with yearly progression distributed according to power law (fig.1). Although that may seem a lot, these publications represent only 0.84% of the astonishing 1,347,044 publications about reproduction in general. This figure can be explained not only by the relative novelty of space exploration and astrobiology, but also by underestimating the importance of disseminating human species beyond the familiar Earth biosphere.

The scientific effort of solving the reproductive conundrum encompasses three main categories: (i) physiological effects of space on the male and female reproductive system, (ii) assessment and possible solutions for the unfavorable effects of space on



Фиг. 1. Брой статии, свързани с търсенето „възпроизвеждане в космоса“ в базата данни Pubmed (дата на изтегляне: 28.07.2020).

Fig. 1. Number of articles associated with reproduction in space query in Pubmed database (date of retrieval: 28.07.2020).

Физически параметър Physical parameter	Експерименти на ниска земна орбита (НЗО) Low Earth orbit (LEO) experiments	Базирани на Земята експерименти Earth based experiments	Възможно решение Possible solution
Радиация Radiation	Под поясите на Ван Алън (не възпроизвеждат условията на дълбокия космос) Below Van Allen's inner belt (not relevant deep space travel)	Под атмосферата (не възпроизвеждат космически условия) Below atmosphere (not relevant for space travel)	Може да бъде възпроизведено с ускорители на частици на Земята Can be reproduced with particle accelerators on Earth
Гравитация Gravity	≈1g, но поради орбиталната скорост се наблюдава безтегловност. Преходни периоди на хипергравитация по време на изстрелване и повторно влизане в космическите кораби. ≈1g, but due to the orbital velocity weightlessness is experienced. Transient periods of hypergravity during launch and re-entry of the spacecrafts.	1g	Може да се симуира за по-кратки и по-дълги периоди от време на Земята Can be reproduced for short and long periods on Earth
Промени в циркадните ритми Circadian rhythm alterations	Изследванията до голяма степен зависят от орбиталния период на космическата станция (ISS) - 92.68 минути ⁽⁸⁾ Studies vastly depend on orbital period of the space station (ISS) - 92.68 minutes ⁽⁸⁾	Нормални Normal	Може да бъде възпроизведено с адаптивно осветление в земни условия Can be reproduced with adaptive lighting on Earth
Цена на експеримента Cost of experiment	6000-16500 \$ / kg орбитален трансфер на МКС ⁽⁹⁾ NB! Комплексни ембриологични експерименти могат да се извършват само от обучени специалисти 6000-16500\$/kg orbital transfer to ISS ⁽⁹⁾ NB! Highly complex embryological experiments can be performed only by trained professionals	-	Намаляване на разходите за трансфер до НЗО; Извършване на експерименти на Земята Reducing the cost of transfer to LEOs;

отвъд условията на планетата към която сме се адаптирали. Научното усилие за разрешаване на репродуктивната загадка обхваща три основни категории: (i) ефект на космическото пространство върху физиологичните функции на мъжката и женската репродуктивна система, (ii) оценка и възможни решения за неблагоприятното въздействие на космоса върху способността за възпроизвеждане и (iii) запазване и жизнеспособност на мъжките и женските гамети в космоса. По-значимите предимства и недостатъци проведени или в космоса, или в симулирани условия на Земята, заедно с техните плюсове и минуси са обобщени в табл 1.

Ефектите от радиационното облъчване на Земята и Космоса се различават както в количествен, така и в качествен аспект. Линеиният трансфер на енергия (ЛЕТ), т.е. енергията на рентгенови лъчи, фотони и γ -лъчи, която обикновено засяга хората, е по-малка от 10 keV/ μ m, докато извън пояса на Van Allen присъствието на протони (водородни ядра), неутрони, алфа-частици (хелиеви ядра) и тежки ядра предопределят енергии много над тази стойност ⁽⁵⁾. При стойност от 3% за риска от смърт, причинена от експозиция, приета като допустима от НАСА през 1988 г. и потвърдена през 2015 г. ⁽⁶⁾ и прогнози за значително по-високи нива на галактическите космически лъчи (ГКЛ) в следващия слънчев цикъл ⁽⁷⁾, е трудно да се оцени точ-

the ability of reproduction and (iii) conservation and viability of male and female gametes in space. Experiments have been conducted either in space, or in simulated conditions, which pros and contras are summarized in Table 1.

Effects of radiation exposure on Earth and in Space differ both in quantitative and qualitative aspect. Linear energy transfer (LET) i.e. energy of X-rays, photons and γ -rays, that usually affects humans is less than 10 keV/ μ m, while outside of Van Allen belt the presence of protons (hydrogen nuclei), neutrons, alpha particles (helium nuclei) and heavy nuclei precludes energies well above that value ⁽⁵⁾. With the values of 3% Risk of Exposure-Induced Death (REID), accepted as NASA guidelines in 1988 and confirmed in 2015⁽⁶⁾ and projections of substantially higher levels of Galactic Cosmic Rays (GCR) in the next solar cycle⁽⁷⁾, it is hard to evaluate exact impact on reproductive system during deep space missions, but a 20% decrease of the time of exposure is suggested to stay below the safe limits. A certain limitation in predicting the space radiation health risk is that the results are obtained by observing the effect of simulated solar particle events or GSR on model animals. On the other hand, circadian rhythm alterations are well studied and as light is the most significant zeitgeber (external time-giving cue)⁽⁸⁾, those experiments are easy to perform and reproduce. We will focus on the effects of the microgravity, as

ното въздействие върху репродуктивната система по време на космически мисии, но се препоръчва намаляване с 20% на времето на излагане, за да остане под безопасните граници. Известно ограничение при прогнозиране на риска за здравето на космическото лъчение е, че резултатите се получават чрез наблюдение на ефекта от симулирани събития на слънчеви частици или GSR върху моделни животни. От друга страна, циркадните изменения на ритъма са добре проучени и тъй като светлината е най-значимият zeitgeber (еднозначен времеопределящ механизъм)⁽⁸⁾, тези експерименти са лесни за изпълнение и възпроизвеждане. Ще се съсредоточим върху ефектите на микрогравитацията, тъй като циркадните промени и ефектите на космическото излъчване могат да бъдат в известна степен неутрализирани или управлявани. Единственият контролиран експеримент по време на мисията Gemini 11 дава само около 0,00015g, в резултат на което обектите се придвижват към едната страна на полетния модул, но ефектът е твърде незначителен, за да бъде почувстван от астронавтите. Изкуствената гравитация е постигната за няколко минути на Gemini 8, но поради неизправност, причиняваща непрекъсната работа на един от тръстърите. Това води до голямо акселерационно натоварване на екипажа (до 4 g), което налага преждевременно и спешно прекратяване на мисията⁽⁹⁾. Някои обнадеждаващи резултати са получени от експерименти с безгръбначни животни, земноводни и риби, изложени на всички опасности на НЗО и произвеждащи здрави и способно за възпроизводство потомство. И все пак, тези експерименти, независимо от краткият си период на провеждане (нико един експеримент в орбита не е продължил повече от 15 дни), разкриват някои фини аномалии, като намалено освобождаване на кортикални гранули и фузия по време на оплождането при морски таралежи (*Lytechinus slikus*) и увеличена дебелина на покрива на бластоцела при жаби (*Xenopus laevis*)⁽¹⁰⁾. Японски оризии (*Oryzias latipes*) са използвани като модел за възпроизводство на гръбначни по време на 15-дневна мисия на НЗО и са успели да се чифтосат, произвеждайки 43 яйца, от които 8 излюпени в космоса и още 30 излюпени след приземяването⁽¹¹⁾. Излюпените в космоса ембриони показват нормален брой гамети и ненарушена способност за възпроизводство. Все пак малкият размер на извадката и уникалната среда правят подобни експерименти трудни за възпроизвеждане.

Експериментите на орбита с бозайници, доколкото знаят авторите, са оскъдни и неубедителни - само четири експеримента (COSMOS-1129, COSMOS-1541, NIH.R1, NIH.R2⁽¹²⁻¹⁶⁾) са били проведени на НЗО, докато експериментите с микрогравитация, проведени на Земята, обикновено се извършват по метода на имобилизация на задните крайници⁽¹⁷⁾, който е възприет за симулация на микрогравитация, но не включва промяна на

circadian alterations and cosmic radiation effects can be counteracted or managed, while gravity at that point is hard to be manipulated. The only controlled experiment during the Gemini 11 mission produced only about 0.00015g, which resulted in objects, moving toward one side of the flight module, but wasn't felt by the astronauts. Artificial gravity was achieved for Gemini 8 for several minutes, but due to malfunction causing continuous firing of one thruster. It resulted in high acceleration forces upon the crew (up to 4 g), which led to the premature and urgent termination of the mission⁽⁹⁾. Some encouraging results came from experiments with invertebrates, amphibians and fish, exposed to all the hazards of LEO, and producing healthy and capable of reproduction offspring. Still, these experiments, as short as they were (no on-orbit experiment lasted for more than 15 days) revealed some subtle abnormalities, such as decreased cortical granule discharge and fusion during fertilization in sea urchins (*Lytechinus pictus*) and increased thickness of the blastocoel roof in frogs (*Xenopus laevis*)⁽¹⁰⁾. Medaka fish (*Oryzias latipes*) were used as a vertebrate model of reproduction on 15 days LEO mission and were capable to successfully mate on board of the Space Shuttle, producing 43 eggs, from which 8 hatched in space and another 30 hatched after landing⁽¹¹⁾. The embryos hatched in space showed normal number of gametes and unaltered ability to reproduce. Still, the small sample size and the unique environment make such experiments hard to reproduce.

On-orbit experiments with mammals, to the best knowledge of the authors, are scarce and inconclusive - only four experiments (COSMOS-1129, COSMOS-1541, NIH.R1, NIH.R2⁽¹²⁻¹⁶⁾) were conducted on LEOs, while the microgravity experiments held on Earth, usually are performed following a hind limb suspension protocol (HLS)⁽¹⁷⁾, which is accepted as a plausible method of simulation of microgravity, but doesn't involve the change of actual acceleration of the object, nor randomizing the vector of the g-force. Instead, the animals are suspended at 30° angle to the surface, which limits their ability to move and to exercise. The published experiments concerning microgravity conditions are summarized in Table 2 (modified from Mishra *et al.*⁽¹⁸⁾). Hypergravity experiments with 2,3g to 3g were performed in order to investigate the effect of launch and re-entry, as well as possible decelerating maneuvers and the results revealed higher neonatal mortality in animals exposed to 2g^(19,20). Experiments with hypergravity, using a centrifugal force as an analogue of linear acceleration force have to be accessed with caution, because of the angular component of the rotational force. This component may interact with the natural mechanisms of anterior-posterior axis formation in vertebrate animals, vastly used as models in developmental biology, such as *G.galus*^(21,22).

One continuous effort of our group is to implement and to propagate the use of 3-D clinostat: device, capable of simulating microgravity, by randomizing

Мисия Study	Моделно животно Model animal	Бременност и раждане Gestation	Хормони Hormones	Хистологично изследване Histological findings
Експерименти на ниска земна орбита (НЗО) Experiments conducted on low Earth orbit (LEO)				
COSMOS-1129	Мъжки и женски плъхове, оставени да се чифтосват по време на полет; женските, изследвани след полета за признаци на бременност Male and female rats allowed to mate during flight; females examined after flight for signs of pregnancy	2 от 5 женски показват признаци на ранна бременност с последваща загуба на плода 2 of 5 females showed signs of early gestation with subsequent pregnancy loss	НД* ND*	НД ND
COSMOS-1541	Бременни плъхове на ГД 13-18, някои евтаназиранни при кацане, някои оставени да раждат; вивариумни и синхронни контроли Pregnant rats flown on GD 13-18, some euthanized on landing, some allowed to give birth; vivarium and synchronous controls	Намалено тегло на плацентите и удължено раждане в полетната група. НС брой на потомството на GD 18 или при раждане; НС фетално тегло GD 18; ↓ тегло при раждане; ↑ перинатална смъртност Decreased placental weights and lengthened labor in flight group. NS litter size on GD 18 or at birth; NS fetal weight GD 18; ↓ birth weight; ↑ perinatal mortality	НД ND	НД ND
NIH.R1	Бременни плъхове, ГД 9-20 в космоса, хеми-хистеректомия, след това раждане след завръщане на Земята; синхронни и вивариумни контроли Pregnant rats, GD 9-20 in space, hemi-hysterectomy then parturition after return to Earth; synchronous and vivarium controls	НС промени в продължителността на бременността, увеличаване на теглото на майката, продължителността на раждането; ↑ лордозни контракции, но не и вертикални контракции по време на раждането; НС промени в размера на потомството; ↑ тегло при раждане; ↑ перинатална смъртност NS changes in gestation length, maternal weight gain, duration of parturition; ↑ lordosis contractions, but not vertical contractions during labor; NS changes in litter size; ↓ birth weight; ↑ perinatal mortality	↑ FSH; питуитарен LH; НС промени в LH, P4, питуитарен FSH ↑ FSH; pituitary LH; NS changes in LH, P4, pituitary FSH	НС промени в теглото на яйчниците и хипофизата, брой на антралните фоликули и жълтите тела NS changes in ovarian and pituitary weights, number of antral follicles and corpora lutea
NIH.R2	Бременни плъхове, ГД 11-20 в космоса, раждане след завръщане на Земята; синхронни и вивариумни контроли Pregnant rats, GD 11-20 in space, parturition after return to Earth; synchronous and vivarium controls	НС промени в дъжината на бременността, теглото на майката, продължителността на раждането, масата на плода на ГД 20; ↑ лордозни контракции, но не и вертикални контракции по време на раждането; ↓ тегло при раждане NS changes in gestation length, maternal weight gain, duration of parturition, fetal mass at GD 20; ↑ lordosis contractions, but not vertical contractions during labor; ↓ Birth weight	↓ миометриален конексин-43 ↓ Myometrial connexin-43 at term;	Едем на миометриума на ГД 20, ↓ обем на миометриума между ГД 20 и след раждане само при групата на летелите. Oedematous myometrium on GD 20, ↓ myometrial volume between GD 20 and postpartum in flight rats only.
Експерименти за симулиране на микрогравитация, чрез окачване на тазовите крайници Experiments conducted with simulated microgravity by HLS				
Tou et al., 2004	Плъхове, окачени за 38-42 дни, евтаназиранни по време на еструс Rats, HLS for 38-42 days, euthanized on oestrus	НД ND	↓ E2; НС промяна в P4, LH, FSH; ↑ дължина на цикъла ↓ еструс; ↑ диеструс ↓ E2; NS change in P4, LH, FSH; ↑ Cycle length; ↓ oestrus; ↑ dioestrous	НД ND

*НД – няма данни, НС – не сигнификантни, ГД – гестационен ден
* ND - no data, NS - not significant, GD - gestational day

действителното гравитационно ускорение на обекта, нито рандомизиране на вектора на g-силата. Вместо това животните биват окачени под ъгъл 30° спрямо повърхността, което ограничава способността им да се движат. Публикуваните експерименти относно условията на микрогравитация са обобщени в таблица 2 (модифицирана от Mishra *et al.* ⁽¹⁸⁾). Извършени са експерименти с хипергравитация с 2,3 g до 3 g, за да се изследва ефекта от изстрелването и повторното влизане, както и възможните маневри за забавяне и резултатите разкриват по-висока неонатална смъртност при животни, изложени на 2g ^(19,20). Експериментите с хипергравитация, използващи центробежна сила като аналог на силата на линейно ускорение, трябва да бъдат разглеждани с повишено внимание, поради ъгловия компонент на въртящата сила. Този компонент може да взаимодейства с естествените механизми на образуване на предната и задната ос при гръбначни животни, широко използвани като модели в биологията на развитието, като напр. *G.galus*^(21,22).

Стремещт на нашата група е да прилага и разпространява използването на 3-D клиностаг: устройство, способно да симулира микрогравитация, чрез рандомизиране на вектора на гравитационната сила, не само в експерименти с клетъчни култури, но и с органоиди и ембриони.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предстоящото изследване на космическото пространство и проектите за експлоатацията му имат многобройни последици за почти всеки аспект от съвременните научни проекти и културното възприятие на човечеството.

Космическите станции, от монолитни като Салют, Алмаз и Skylab, до модулни като Мир, ISS и бъдещата Lunar Gateway, предоставят сложен набор от фактори, характерни за космическата среда, но повечето от тези фактори могат да бъдат възпроизведени на Земята. Изграждането на устойчиви и всеобхватни космически модели, базирани на Земята, е и ще бъде една от най-трудните и важни задачи, изискваща съвместните усилия на квалифицирани интердисциплинарни научни колективи.

the vector of the g-force, not only in cell culture experiments, but with organoids and embryos^(23,24). Compared with LEO experiments, the use of clinostat for achieving microgravity is non-expensive and the experiments, performed with this equipment are much easier to reproduce.

CONCLUSIONS

The problem of space exploration itself has numerous implications on almost every aspect of human scientific output and cultural perception.

Space stations, from monolithic as Salyut, Almaz, and Skylab, to modular as Mir, ISS and the future Lunar Gateway provide complex range of factors characteristic for the space environment, but most of these factors can be reproduced on Earth. Building sustainable and comprehensive Earth based, space-like models is, and will be one of the toughest and most important tasks, demanding the joint effort of skilled interdisciplinary scientific collectives.

Адрес за кореспонденция:

Петър Ефтимов
СУ „Св. Климент Охридски“,
бул. „Драган Цанков“ № 8, София, България
e-mail: peftimov@uni-sofia.bg

Corresponding address:

Petar Eftimov
Sofia University St Kliment Ohridski,
Faculty of Biology
8 Dragan Tzankov Str., Sofia, Bulgaria
e-mail: peftimov@uni-sofia.bg

Литература / References

1. O'Malley-James, J.T., *et al.*, Swansong biospheres II: the final signs of life on terrestrial planets near the end of their habitable lifetimes. *International Journal of Astrobiology*, 2014. 13⁽³⁾: p. 229-243.
2. O'Malley-James, J.T., *et al.*, Swansong biospheres: refuges for life and novel microbial biospheres on terrestrial planets near the end of their habitable lifetimes. *International Journal of Astrobiology*, 2012. 12⁽²⁾: p. 99-112.
3. Heath, M.J. and L.R. Doyle. *Circumstellar Habitable Zones to Ecodynamic Domains: A Preliminary Review and Suggested Future Directions*. 2009.
4. Franck, S., *et al.*, Reduction of biosphere life span as a consequence of geodynamics. *Tellus Series B Chemical and Physical Meteorology B*, 2000. 52: p. 94.
5. Dietze, G., *et al.*, ICRP, 123. Assessment of radiation exposure of astronauts in space. *ICRP Publication 123. Ann ICRP*, 2013. 42⁽⁴⁾: p. 1-339.
6. Dauer, L.T., *et al.*, Guidance on radiation dose limits for the lens of the eye: overview of the recommendations in NCRP Commentary No. 26. *International Journal of Radiation Biology*, 2017. 93⁽¹⁰⁾: p. 1015-1023.
7. Schwadron, N.A., *et al.*, Does the worsening galactic cosmic radiation environment observed by CRaTER preclude future manned deep space exploration? *Space Weather*, 2014. 12⁽¹¹⁾: p. 622-632.
8. Kolla, B.P. and R.R. Auger, Jet lag and shift work sleep disorders: How to help reset the internal clock. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2011. 78⁽¹⁰⁾: p. 675-684.
9. Gatland, K., *Manned Spacecraft*. 1976: Macmillan Publishing Co., New York. 304.
10. Souza, K.A., S.D. Black, and R.J. Wassersug, Amphibian development in the virtual absence of gravity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. 92⁽⁶⁾: p. 1975-1978.
11. Ijiri, K., Development of space-fertilized eggs and formation of primordial germ cells in the embryos of medaka fish. *Advances in Space Research*, 1998. 21⁽⁸⁾: p. 1155-1158.
12. Serova, L.V., Denisova, L.A., Makeeva, V.F., Chelnaya, N.A., and Pustynnikova, A.M., The effect of microgravity on the prenatal development of mammals. *The Physiologist*, 1984. 27: p. 107-110.
13. Serova, L.V. and L.A. Denisova, The effect of weightlessness on the reproductive function of mammals. *Physiologist*, 1982. 25⁽⁶⁾: p. 59-12.
14. Burden, H.W., *et al.*, Effects of space flight on ovarian-hypophyseal function in postpartum rats. 1997. 109⁽²⁾: p. 193.
15. Burden, H.W., J. Zary, and J.R. Alberts, Effects of space flight on the immunohistochemical demonstration of connexin 26 and connexin 43 in the postpartum uterus of rats. *J Reprod Fertil*, 1999. 116⁽²⁾: p. 229-34.
16. Wong, A.M. and M. De Santis, Rat gestation during space flight: Outcomes for dams and their offspring born after return to earth. *Integrative Physiological and Behavioral Science*, 1997. 32⁽⁴⁾: p. 322-342.
17. Tou, J.C.L., R.E. Grindeland, and C.E. Wade, Effects of diet and exposure to hindlimb suspension on estrous cycling in Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2004. 286⁽⁹⁾: p. E425-E433.
18. Mishra, B. and U. Luderer, Reproductive hazards of space travel in women and men. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019. 15(12): p. 713-730.
19. Lintault, L.M., *et al.*, In a hypergravity environment neonatal survival is adversely affected by alterations in dam tissue metabolism rather than reduced food intake. *Journal of Applied Physiology*, 2007. 102⁽⁶⁾: p. 2186-2193.
20. Ronca, A.E., *et al.*, Maternal reproductive experience enhances early postnatal outcome following gestation and birth of rats in hypergravity. *Biol Reprod*, 2001. 65⁽⁹⁾: p. 805-13.
21. Kochav, S. and H. Eyal-Giladi, Bilateral symmetry in chick embryo determination by gravity. *Science*, 1971. 171(3975): p. 1027-9.
22. Marc, C., F. Harrisson, and H. Bortier, Effect of Gravity on the Interaction between the Avian Germ and Neighbouring Ooplasm in Inverted Egg Yolk Balls. *European Journal of Morphology*, 2001. 39: p. 27-38.
23. Й. Найденов, Н.С., Т. Иванова Научна апаратура за клетъчно култивирание в условия на индуцирана микрогравитация и експериментални резултати. *ЕЕЕР* 2013. 3⁽⁴⁾: p. 83-88.
24. N. Stefanova, R.S., B. Arabadzhiev, Evaluation of the Proliferative Properties of Fibroblasts in the Simulated Microgravity Conditions. *Science & Technologies*, 2011. III⁽⁴⁾: p. 265-268.

ОВАРИАЛНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ – РАЗВИТИЕ В ИЗСЛЕДВАНИЯТА ПРЕЗ ПОСЛЕДНИТЕ 15 ГОДИНИ И ПЕРСПЕКТИВИ ЗА РЕПРОДУКТИВНАТА МЕДИЦИНА

Христова Е.¹, Петрушко М.²

¹ Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ – БАН

² Институт по проблемите на криобиологията и криомедицината, г. Харков, Украйна

OVARIAN STEM CELLS – DEVELOPMENTS IN THE LAST 15 YEARS AND FUTURE PERSPECTIVES FOR REPRODUCTIVE MEDICINE

E. Hristova¹, M. Petrushko²

¹ Institute of Biology and Immunology of Reproduction – Bulgarian Academy of Science

² Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkov, Ukraine

Резюме: Субфертилитета е важен социален и икономически проблем в развитите страни, който привлича все повече внимание през последните десетилетия. Етиологията му при жените може да се дължи на редица причини – увеличаване на възрастта за зачеване, повтарящи се спонтанни аборти, тубарен фактор и др. Много от тях се асоциират с различни видове овариална дисфункция. Едно проучване на Джонсън и сътр. през 2004 г.⁽¹⁾, което показва наличието на стволови клетки в яйчници на възрастни мишки, провокира интереса на учените в областта на репродуктивната медицина, поради потенциала им за разработване на различни клетъчни терапии. Независимо от значението им за физиологията на яйчника, петнадесет години по-късно, все още съществуват някои противоречия относно изолирането на стволови клетки в овариума.

Въведение:

Общоприетата идея във физиологията, че женските индивиди се раждат с определен брой прогенитори на яйцеклетки и с времето тяхното изчерпване води до настъпване на менопаузата е предложена от Зукерман през 1951 г.⁽²⁾. Неговите заключения остават валидни до проучванията на Джонсън и сътр. през 2004 г.⁽¹⁾, които установяват, че атретичните фоликули възникват с такава честота, че в яйчника няма да останат ооцити много по-рано, отколкото се наблюдава в действителност. Учените предполагат, че съществува популация от митотично активни клетки, които имат способността да поддържат формирането на яйцеклетки и фоликули в постнаталния период. Откриването на овариалните (или както също са известни оогонални) стволови клетки (ОСК) отново разпали дебатите в областта. Независимо, че все още има скептицизъм между изследователите относно съществуването им, различни научни групи докладват изолирането на ОСК от мишки⁽³⁾, плъхове⁽⁴⁾, примати⁽⁵⁾, свине⁽⁶⁾, човек⁽⁷⁾ и др.

Изолиране и биологични характеристики на ОСК:

По време на своето пилотно изследване Джонсън и сътр.⁽¹⁾ идентифицират популация от клетки в яйчник от мишка, които експресират протеина DEAD-box polypeptide-4 (Ddx-4), който представлява РНК

Abstract: Subfertility is a significant social and economic issue in developed countries, which has gained increasing attention over the past decades. In female patients, its origins are of various nature – advancing age to conceive, recurring miscarriages, tubular factor and others. Many of the causes are associated with different types of ovarian dysfunction. A research by Johnson et al. in 2004⁽¹⁾ showing the occurrence of stem cells in adult mouse ovaries, has drawn the attention of scientists in the field of reproductive medicine for the potential to develop treatments for those conditions. Fifteen years afterwards, however, regardless their physiological significance the controversy surrounding the stem cells in the ovary is still ongoing.

Introduction:

The concept in mammalian physiology that the female animals are born with a finite number of oocyte progenitors and their exhaustion with age leads to menopause is proposed by Zuckerman in 1951⁽²⁾. Those conclusions remained unquestioned until the findings of Johnson et al. in 2004⁽¹⁾, that follicles are undergoing atresia at such a rate that the ovaries would have been depleted of oocytes far earlier than it is actually found in vivo. The group suggested the existence of a population of mitotically active cells, which are able to maintain oocyte and follicle production in post-natal life. The discovery of the ovarian (or, as they are also known oogonial) stem cells (OSCs) has reignited the debate in the field and during the following decade, although the skepticism about their existence was still expressed by some scientists, different research groups have reported the isolation of OSCs from mice⁽³⁾, rats⁽⁴⁾, non-human primates⁽⁵⁾, pigs⁽⁶⁾, humans⁽⁷⁾ and others.

Isolation and biological characteristics of OSCs:

In their pioneering research Johnson et al.⁽¹⁾ identified a population of cells in the mouse ovary, expressing the vasa homologue DEAD-box polypeptide-4 (Ddx-4), a germline RNA helicase. The protein takes part in the regulation of some important cellular processes like the initiation of translation, assembly of ribosomes and the formation of the secondary RNA structure. It is expressed in spermatogonial and oogonial germ cells and is involved in their lineage

хеликаза, специфична за клетки на зародишната линия. Белтъкът участва в регулацията на някои важни клетъчни процеси като инициация на трансляцията, асемблирането на рибозомните субединици и формирането на вторичната структура на РНК-ите. Експресира се в сперматогониите и оогониите и е свързан с развитието на тяхната клетъчна линия ⁽⁸⁾. Освен това, изолираните клетки са били способни да инкорпорират 5-бромодеооксиуридин в тяхната ДНК-молекула, което е индикация, че активно пролиферират. ОСК също така експресират специфичния за мейотични клетки синептонемален комплекс протеин 3 (SYCP3). Впоследствие, няколко лаборатории правят опити да изолират и култивират ОСК, но резултатите само още повече задълбочават противоречията между учените. През 2009 г. Зоу и сътр. успяват да получат ОСК от мишки, чрез ензимно третиране на овариалния кортекс и имуномагнитно сортиране по експресията на Ddx-4 ⁽⁹⁾. Изолираните клетки са позитивни за маркери, характерни за стволови клетки и такива на зародишната линия - Oct-4, DAZL, FRAGILIS и STELLA, но не и за специфичния за ооцити протеин 3 на зона пелуцида. В допълнение, авторите постигат насочена диференциация на ОСК в яйцеклетки и да получават живо потомство след инжектирането им в яйчници на инфертилни мишки. Подобни изследвания са проведени и при човек от Уайт и сътр. ⁽¹⁰⁾, при които *in vitro* култивирани Ddx-4 позитивни клетки са индуцирани в

development ⁽⁸⁾. In addition, the isolated cells were able to incorporate 5-bromodeoxyuridine in their DNA molecule, an indication that they are actively proliferating. They also expressed the meiosis-specific polypeptide synaptonemal complex protein 3 (SYCP3). Since then, several attempts have been made to isolate and culture OSCs, but the results only deepened the ongoing controversy. In 2009, Zou et al. were able to purify OSCs from mice by enzymatic digestion of the ovarian cortex and immunomagnetic sorting for the expression of Ddx-4 ⁽⁹⁾. The isolated cells were also positive for the germline and stemness markers Oct-4, DAZL, FRAGILIS and STELLA, but not for the oocyte-specific marker zona pellucida 3 protein. Furthermore, the authors were able to differentiate the cells into oocytes and obtain a viable offspring when injected into the ovaries of infertile mice. In humans, similar investigations were performed by White et al. ⁽¹⁰⁾, in whose experiments the oocytes generated from cultured Ddx-4 positive OSCs have been shown to express terminal differentiation markers like zona pellucida proteins, SYCP3 and growth differentiation factor 9 (GDF9). In the same study, green fluorescence protein (GFP) transfected OSCs were injected into human ovarian fragments and transplanted into NOD-SCID mice. After two weeks, the formation of follicles containing GFP-positive oocytes has been observed. In addition, other studies showed the expression of different

Marker	Oogonial Stem Cells	Mature Oocytes
Ddx4	membrane and cytoplasm	cytoplasm
SSEA4	membrane and cytoplasm	cytoplasm
DAZL	nucleus and cytoplasm	cytoplasm
OCT4A	nucleus	-
OCT4B	cytoplasm	cytoplasm
c-kit	cytoplasm	cytoplasm
Fragilis	membrane and cytoplasm	-
Stella	nucleus and cytoplasm	-
CD133	membrane	-
SOX-2	nucleus	-
Nanog	nucleus	-
Blimp-1	nucleus	-
SYCP-3	-	cytoplasm
GDF-9	-	cytoplasm
ZP proteins	-	membrane
NOBOX	-	nucleus

Табл. 1: Експресия и локализация на различни молекулни маркери от ОСК и зрели ооцити.⁽¹¹⁾
Table 1: Expression and localization of different molecular markers on OSCs and mature oocytes.⁽¹¹⁾

ооцити и са били способни да експресират маркери, характерни за терминален стадий на диференциация - протеини от зона пелуцида, SYCP3 и растежен и диференциращ фактор 9 (GDF9). В същото проучване, ОСК трансфектирани с зелен флуоресцентен протеин (GFP) са инжектирани в човешки овариални фрагменти и трансплантирани на NOD-SCID мишки. Две седмици по-късно е наблюдавано формирането на фоликули, съдържащи GFP-позитивни яйцеклетки. Освен това, други изследвания показват експресията на различни маркери от ОСК, характерни както за зрели ооцити, така и на стволови клетки (Табл. 1).

markers, characteristic for both mature oocytes and stem cells (Table 1.).

The extensive research carried out in the field after the discovery of the OSCs has led to the identification of two distinct stem cell types in the post-natal ovary. This heterogeneity consists from a population of quiescent smaller cells with pluripotent characteristics, called very-small embryonic-like cells (VSELS) and the OSCs, which are characterized with a slightly larger diameter and active proliferation. VSELS are located in the ovarian surface epithelium, have the ability to undergo asymmetric cell division

Широките проучвания, проведени след откриването на ОСК водят до идентифицирането на два отделни вида стволови клетки в постнатална яйчникова тъкан. Тази хетерогенност се състои от една популация от неактивни прогенитори с по-малки размери, които имат характеристики на плурипотентни клетки, наречени малки ембрионално-подобни (VSELs) и ОСК, които се отличават с по-голям диаметър и активна пролиферация. VSELs са локализирани в повърхностния епител на яйчника, имат способността да се делят асиметрично и експресират Oct4. И двата типа клетки екстернализират рецептори за фоликуло-стимулиращия хормон (ФСХ) на клетъчната си мембрана ⁽¹²⁾.

ОСК и потенциални стратегии за запазване на фертилитета:

Криопрезервацията на ооцити и ембриони вече е широко застъпен метод за запазване на фертилитета при пациенти, страдащи от ракови заболявания. За съжаление, обаче, той не може да бъде приложен в някои случаи като жени в подрастваща възраст и такива с преждевременно изчерпване на яйчниковия резерв. С идентифицирането на ОСК, значително се разшириха и възможностите пред учените и клиницистите за разработване на нови подходи за лечение на тези състояния.

In vitro фоликулогенезата е една от потенциалните стратегии за формулирането на обещаващи подходи за лечение в репродуктивната медицина. Първоначалната експериментална работа в областта е проведена върху ембрионални и индуцирани плурипотентни стволови клетки (иПСК). Възникват определени проблеми обаче, във връзка с факта, че получените клетки, които наподобяват тези от зародишната линия трябва да влязат в контакт с фетална гонадална тъкан, за да образуват зрели ооцити, както и това, че иПСК преминават през генно репрограмане. Подобни усложнения могат да бъдат преодолени, ако се използват ОСК при фоликулогенезата. Освен това, способността им да генерират активни ооцити вече е проучена ⁽¹⁰⁾, но съществуват въпроси, които остават нерешени. Изследвания върху експериментални модели показват, че ОСК трябва да бъдат ко-култивирани с гранулозни клетки в ранни степени на диференциация, за да могат да се формират витални примордиални фоликули. Все още обаче, учените не са достигнали до консенсус относно положителната идентификация и методи за изолиране на тези гранулозни клетки от овариална тъкан на възрастен организъм ⁽¹³⁾. В интересно изследване Парвари и сътр. ⁽¹⁴⁾ докладват успешна диференциация на миши ОСК в ооцито-подобни клетки чрез ко-култивиране първоначално с фидерен слой от ембрионални фибробласти и след това с инактивирани гранулозни клетки. Получените култури експресират Ddx-4, DAZL и маркерите за плурипотентност Oct4 и SSEA1. Други автори докладват успешно индуциране на ооцито-подобни клетки с постоянно нарастващ диаметър и положителни за маркери за пълно диференцирани яйцеклетки

and express Oct4. Both cell types externalize receptors for the follicle stimulating hormone (FSH) on their cell surface membrane ⁽¹²⁾.

OSCs and fertility preservation:

Oocyte and embryo cryopreservation is already a well-established and widely used technique to sustain the fertility of female cancer patients. In some cases, however, it is not an applicable method, for example in adolescent girls and patients with premature ovarian failure. With the discovery of OSCs, the opportunities to develop new approaches to treat these conditions have significantly expanded. *In vitro* folliculogenesis is one of the possible concepts for the development of promising techniques in reproductive medicine. The first experimental work in the field was performed on mouse embryonic and induced pluripotent stem cells (iPSCs). Some limitations have arisen, nevertheless, like the fact that the generated primordial germ-cell like stem cells need to come into contact with foetal gonadal tissue to be able to mature into oocytes and the nuclear reprogramming in iPSCs. Such complications will be overcome when using OSCs for folliculogenesis. Moreover their capability to generate competent oocytes has already been reported ⁽¹⁰⁾, but there are still issues remaining to be solved. Experimental models show that the OSCs need to be cultured together with granulosa cells at early stages of differentiation to be able to produce viable primordial follicles. Still, a consensus among scientists has not been reached about the identification and isolation of primitive granulosa cells from adult ovarian tissue ⁽¹³⁾. An interesting study design by Parvari et al. ⁽¹⁴⁾ shows successful differentiation of mouse OSCs into oocyte-like cells by culture on feeder-layer of embryonic fibroblasts and subsequently on inactivated granulosa cells. The obtained oocyte-like cells were expressing Ddx4, DAZL and the pluripotency markers Oct4 and SSEA1. Other authors have reported the generation of oocyte-like cells, which progressively increased in diameter and expressed terminal differentiation markers like zona pellucida glycoproteins, growth and differentiation factor 9 (GDF-9), SYCP3 (synaptonemal protein complex 3) and showed molecular characteristics of haploid karyotype ⁽¹⁵⁾.

A promising approach to reconstitute the ovarian function after cancer treatment is the re-implantation of OSCs in the ovarian tissue with the hope to re-establish its function. Encouraging results have been gained in mouse studies, where OSCs have been injected into mice after chemotherapy and viable offspring was obtained ⁽⁹⁾. Despite the recent advances in the field, a number of unresolved issues still have to be clarified. For example, how and to what extent the microenvironment in the ovary after anti-cancer treatment is altered and would it be possible for it to favour the re-establishment of folliculogenesis.

Another possible strategy for the regeneration of the ovarian function is also the re-activation of the

– гликопротеина от зона пелуцида, GDF-9, SYCP3 и имат молекулярни характеристики на клетки с х-плоиден кариотип ⁽¹⁵⁾.

Обещаващ подход за възстановяване на овариалната функция след лечение на ракови заболявания е реимплантацията на ОСК в яйчниковата тъкан, с цел да се възобнови нейната функция. Окуражаващи резултати са получени при проучвания върху мишки, в които ОСК са инжектирани в овариуми след химиотерапия и е родено живо потомство ⁽⁹⁾. Несъмнено през последните години има развитие в изследванията в тази област, но все още има редица въпроси, които трябва да бъдат изяснени. Например, по какъв начин и до каква степен се променя микросредата в яйчниковата тъкан сред прилагането на анти-туморни агенти и доколко ще може да спомогне за възстановяването на фоликулогенезата.

Друга възможна стратегия за възобновяване на овариалната функция е реактивирането на локалната популация на ОСК след завършване на лечението с цитотоксични медикаменти. За съжаление, идентифицирането и успешното прилагане на растежни и паракринни фактори и други биологично активни молекули, които имат отношение към диференциацията на ооцитите и развитието на фоликулите остава неразрешен въпрос. Окуражаващи резултати са докладвани от Силвестрис и съгр. ⁽¹⁶⁾, които успяват да получат ооцити от ОСК в клетъчни култури. Предизвикателство остава да се анализира ефекта от анти-туморните препарати във всеки отделен случай (лъчетерапията и алкилиращите агенти увреждат популациите от стволови клетки) и дали ОСК са подложени на увреждане на молекулно ниво.

Криобанкирането на овариални кортикални фрагменти с последваща трансплантация също е проучено като възможност за запазване на фертилитета при пациенти с ракови заболявания, като броя на родените деца след използването му достига до 25% от всички видове останали процедури ⁽¹⁷⁾. Допълнителни изследвания са необходими, за да се установи риска от предаване на ракови клетки след ремисията. За преодоляване на тези пречки, кортикални фрагменти, съдържащи ОСК, могат да бъдат използвани за размножаване на стволовите клетки и диференциацията им в ооцити, които могат да бъдат замразени. Проучванията в областта, обаче, все още са на твърде ранен лабораторен етап и твърде далеч от въвеждане в практиката.

Сравнително нова технология – автоложен митохондриален трансфер от клетки на зародишната линия (AUGMENT) е предложена като метод за лечение при пациенти с преждевременно изчерпан яйчников резерв, с понижен отговор на хормоналната стимулация и такива с предишни неуспешни процедури по асистирана репродукция. Методиката се базира на подмяна на митохондриите в яйцеклетката с такива от ОСК по време на ИКСИ. Независимо че, все още клиничните проучвания на метода са

resident population of OSCs after the course of cytotoxic medications is completed. However, the identification and successful delivery of growth and paracrine factors and the other biologically-active molecules, responsible for oocyte differentiation and follicle development is still an issue. A promising results have been reported by Silvestris et al. ⁽¹⁶⁾, who achieved the generation of oocytes from OSCs in cell culture. A challenge still remains to analyze the effect of anti-cancer treatment employed in each case (radiotherapy and alkylating agents may destroy the stem cells populations) and whether the OSCs can survive it without any damage at molecular level. Cryobanking of ovarian cortical fragments with subsequent transplantation has also been investigated for fertility preservation of cancer patients, with the number of life births reaching up to 25% from all the other procedures ⁽¹⁷⁾. Additional studies are needed, however, to establish the risk of transferring cancer stem cells after remission. To overcome those limitations, cortical fragments, containing OSCs may be used for *in vitro* expansion of the stem cells and their differentiation to oocytes, which can be cryopreserved, but the investigations in the field are still in a very early laboratory phase and far away from application in clinical practice.

A newly-proposed technique – autologous germline mitochondrial energy transfer (AUGMENT) is emerging for the treatment of infertility patients with premature ovarian aging, poor responders and with previous assisted reproductive failures related to ovarian function. The method is based on the replacement of oocyte mitochondria with autologous ones, isolated from OSCs during the time of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Although, the trials conducted so far are few, they demonstrate conflicting results ^(18,19). Moreover a triple-blind, randomized controlled study conducted in Spain, showed no improved cumulative birth rates for patients with poor embryo quality and was discontinued ⁽²⁰⁾.

Concluding remarks:

After the discovery of OSCs a lot of research was focused on developing promising strategies for the treatment of infertility patients. Despite the fact, that certain advances have been already made in the field, particularly in *in vitro* folliculogenesis and the generation of oocyte-like cells in human and mouse models, extensive studies are needed to clarify the process of female gametogenesis and thus to allow the translation of the emerging OSCs-based technologies into clinical practice.

малко, те показват противоречиви резултати ^(18,19). Освентова, тройно-сляпо, рандомизирано изследване проведено в Испания, демонстрира че няма повишаване на кумулативния брой раждания при пациенти с понижено качество на ембрионите и е преустановено ⁽²⁰⁾.

Заклучение:

След откриването на ОСК, множество проучвания са фокусирани върху разработването на стратегии за лечение на инфертилитета. Независимо, че има определен напредък в областта и по-специално в *in vitro* фоликулогенезата и диференциацията на ооцитоподобни клетки при миши и човешки модели, интензивни изследвания са необходими, за да се получат детайлни сведения за процеса на овогенеза и въвеждането на тези ОСК-базирани подходи в клиничната практика.

Литература/References

1. Johnson J., Canning J., Kaneko T. et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428:145-50
2. Zuckerman, S. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 1951, 6; 63-108
3. Pacchiarotti J., Maki C., Ramos T. et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation* 2010; 79:159-70
4. Zhou L., Wang L., Kang J.X. et al. Production of fat-1 transgenic rats using a postnatal female germline stem cell line. *Mol Hum Reprod* 2014; 20:271-81
5. Woods D.C. and Tilly J.L. Reply to adult human and mouse ovaries lack Ddx4-expressing functional oogonial stem cells. *Nat Med* 2015; 21:1118-21
6. Tsai T.S., Johnson J., White Y. et al. The molecular characterization of porcine egg precursor cells. *Oncotarget* 2017; 8:63484-505
7. White Y., Woods D.C., Takai Y. et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 2012; 18:413-21
8. Castrillon D.H., Quade B.J., Wang T.Y. et al. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 9585-90
9. Zou K., Yuan Z., Yang Z. et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11:631-36
10. White Y., Woods D.C., Takai Y. et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 2012; 18:413-21
11. Silvestris E., Cafforio P., Felici C. et al. Ddx-4 oogonial stem cells in postmenopausal women's ovaries: a controversial, unidentified role. *Cells* 2019; 8(650); doi:10.3390/cells8070650
12. Bhartiya D. and Sharma D. Ovary does harbor stem cells – size of the cells matter! *J Ovar Res* 2020; 13:39; doi.org/10.1186/s13048-020-00647-2
13. Akahori T., Woods D.C., Tilly J.L. Female fertility preservation through stem cell-based ovarian tissue reconstitution *in vitro* and ovarian regeneration *in vivo*. *Clin Med Insights: Reprod Health* 2019; 13:1-10
14. Parvari S., Yazdekhesti H., Rajabi Z. et al. Differentiation of mouse ovarian stem cells toward oocyte-like structure by co-culture with granulosa cells. *Cell Reprog* 2016; 18(6):419-28
15. Zhang P.Y., Fan Y., Tan T. et al. Generation of artificial gamete and embryo from stem cells in reproductive medicine. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8:781; doi:10.3389/fbioe.2020.00781 20
16. Silvestris E., Cafforio P., D'Oronzo S. et al. *In vitro* differentiation of human oocyte-like cells from oogonial stem cells: single-cell isolation and molecular characterization. *Hum Reprod* 2018; 33(3):464-73
17. Silvestris E., De Palma G., Canosa S. et al. Human ovarian cortex biobanking: a fascinating resource for fertility preservation in cancer. *Int J Mol Sci* 2020; 21:3245; doi:10.3390/ijms21093245
18. Tilly J.L. and Woods D.C. The obligate need for accuracy in reporting preclinical studies relevant to clinical trials: autologous germline mitochondrial supplementation for assisted human reproduction as a case study. *Ther Adv Reprod Health* 2020; 14:1-10
19. Lorzadeh N. and Kazemirad N. Application of stem cells to infertility treatment with emphasis of mesenchymal stem cells and ovarian stem cells. *Am J Perinatol* 2018; doi.org/10.1055/s-0038-1646948
20. Labarta E., de los Santos M.J., Herraiz S. et al. Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing *in vitro* fertilization – a randomized pilot study. *Fertil Steril* 2019; 111(1):86-96

Адрес за кореспонденция:

Елена Христова, дб

ИБИР-БАН

София, 1113, бул. „Цариградско шосе“ №73

e-mail: hristova.elena@gmail.com

Corresponding address:

Elena Hristova, PhD

IBIR-BAS

73 "Tzarigradsko shosse" blvd., 1113, Sofia, Bulgaria

e-mail: hristova.elena@gmail.com

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@gmail.com

Тел.: 088 870 3786 (д-р Г. Николов), 088 821 7095 (П. Тодоров)

GUIDELINES FOR AUTHORS:

“Embryology” is a specialized scientific journal issued by the Bulgarian Association for Reproductive Human Embryology (BARHE). Its scope covers original research articles and reviews in the fields of experimental and clinical embryology and assisted reproduction. The brief communications, published by “Embryology”, may be later included in full-length papers featured in other scientific journals.

The publishing materials should be presented exclusively in electronic form. It is recommended that the texts should not exceed 6 A4 pages, font size 12 and single line spacing. The figures should be not more than 4, inline with the text, with maximum possible resolution and in .tiff or .eps format.

The articles should be presented both in Bulgarian and English language. The main text has to be structured appropriately and divided into the following sections: introduction; materials and methods; results and discussion; conclusions; references; acknowledgements and corresponding authors address. The references list style should be in standard form: authors; title of the article; year; journal volume; journal issue; pages. The list should include no more than 20 references, ordered as cited in the text.

All the submitted materials are a subject of peer-review from the editorial board and may be returned for revision or rejected for publication.

The materials published are personal opinions of the authors and the journal “Embryology” bears no responsibility for the content of the articles.

For more information and submission of manuscripts:

Bulgarian Association for Reproductive Human Embryology (BARHE)

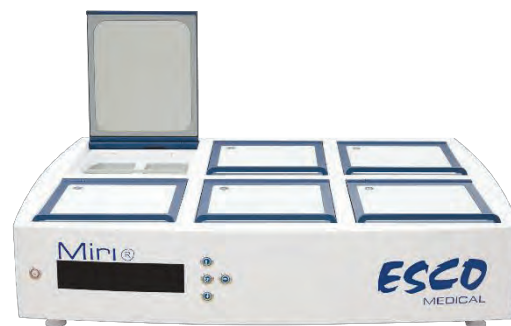
17, “Konstantin Irechek” str., 1606 Sofia, Bulgaria

E-mail: gnikolov@yahoo.com, plamen.ivf@gmail.com

Mobile: +359 88 870 3786 (G. Nikolov, PhD), +359 88 821 7095 (P. Todorov, DSc)

биосистеми

- » Time Lapse и бенчтоп инкубатори
Esco Miri / Miri TL
- » Висок клас CO₂ инкубатори
Eppendorf CellExpert
- » Стъкленни пипети за денудирание
и трансфер Synga
- » ICSI, холдинг, биопсични, хечинг пипети
Microtech IVF
- » Специализиран пластмасов консуматив



eppendorf

 **SYNGA**
Touching life gently

 **Microtech**[®]

ESCO **Life has begun**
MEDICAL 

Биосистеми ООД

бул. "Ботевградско шосе" №247, Сграда 1, София

тел.: 0884 163 814

office@biosystems.bg

www.biosystems.bg

Meriofert®

Високопречистен Менотропин

Човешки фоликулостимулиращ хормон (ФСХ) и човешки лутеинизиращ хормон (ЛХ). Човешкият хорионгонадотропин (ЧХГ), естествено съществуващ хормон в урината на бременни жени, се добавя с цел да се допринесе към цялостната активност на ЛХ.

Fostimon®

Високопречистен Урофолитропин (Urofollitropin) (фоликулостимулиращ хормон – ФСХ)

Choriomon®

Хорионгонадотропин (Gonadotrophin, chorionic)

