

# ЕМБРИОЛОГИЯ

Embryology



ISSN 1312-7349



Настоящият брой се издава с финансовата подкрепа на МОН и Споразумение ДО1-308/20.12.2021 за Научна Инфраструктура по Клетъчни Технологии в Биомедицината от НПКНИ 2020-2027



НАЦИОНАЛНА ПЪТНА КАРТА  
ЗА НАУЧНА ИНФРАСТРУКТУРА  
(2020-2027)

This issue has been published with the kind support of the Ministry of Education and Science under Grant ДО1-308/20.12.2021 for the Research Infrastructure "Cell Technologies in Biomedicine" of the NRRI 2020-2027

ИЗДАВА БЪЛГАРСКА АСОЦИАЦИЯ  
ПО РЕПРОДУКТИВНА ЧОВЕШКА ЕМБРИОЛОГИЯ

ТОМ 11 КНИЖКА 1  
2021

PIONEERING DIAGNOSTICS



# VIDAS<sup>®</sup> РЕШЕНИЯ ЗА ЖЕНСКО ЗДРАВЕ



HIV  
**Prolactin**  
Hepatitis  
TSH  
**AMH**  
LH  
Estradiol  
HCG  
FSH  
Progesterone  
Toxoplasmosis  
Testosterone  
Rubella  
**Vitamin D**

София 1517, ул. Бесарабия 108В, ет. 1  
Тел.: 02/ 452 2930; Факс: 02/ 451 8887  
Е-мейл: [office@mediclim.bg](mailto:office@mediclim.bg)  
[www.mediclim.bg](http://www.mediclim.bg)



MEDICLIM

## СЪДЪРЖАНИЕ:

<b>Увод</b>	<b>2</b>
<i>Г. Николов</i>	
<b>Мелатонин и значението му като хронобиологичен фактор за репродукцията при хората</b>	<b>4</b>
<i>Р. Конакчиева, Г. Николаев</i>	
<b>Морфологична и генетична оценка на човешки бластоцисти</b>	<b>15</b>
<i>Й. Хасанова, Д. Гуленова, Е. Маринова и Г. Николов</i>	

## CONTENTS:

<b>Introduction</b>	<b>3</b>
<i>G. Nikolov</i>	
<b>Chronobiology aspects of the role of melatonin in human reproduction</b>	<b>4</b>
<i>R. Konakchieva, G. Nikolaev</i>	
<b>Morphological and genetic assessment of human blastocyst</b>	<b>15</b>
<i>J. Hasanova, D. Gulenova, E. Marinova, G. Nikolov</i>	

### Редакционна Колегия

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

### Членове:

*Акад. Румен Панков, дбн*  
*Проф. Росица Конакчиева, дбн*      *Димитър Баров*  
*Доц. д-р Иван Николов, дм*      *Десислава Тачева, дб*  
*Доц. Янчо Тодоров, дб*      *Диана Гуленова, дб*  
*Елена Христова, дб*      *д-р Георги Вакрилов*

*Ембриология Том 11 Книжка 1*

### Предпечатна подготовка и печат

*"Л и Д Тера" ООД*  
*office@ldtera.eu*

### Чуждестранни членове:

*проф. Владимир Исаченко - Германия*  
*проф. Кристина Магли - Италия*  
*проф. Анна Вейга - Испания*  
*проф. Миодраг Стойкович - Сърбия*

Уважаеми колеги, скъпи приятели,

Преди повече от 2,500 г. на Конфуций се приписват думите: „Проклятие е да живееш в интересни времена“.

Времената, в които живеем, безспорно са интересни, но също така трудни, смущаващи, опасни. Пандемията от COVID-19 закономерно бе последвана от икономическа рецесия. И точно когато изглеждаше, че щамът Omicron ще ‚ваксинира‘ и защити по естествен начин големи групи от хора, включително негативно настроените към съществуващите ваксини, избухна война.

Война, на територията на съвременна Европа, която бе убедена, че вече е обединена и че мирът и просперитетът ще траят дълго. Война между два генетично близки народа, между две съседни държави... Ясни са причините, агресорът и жертвата. Разрушения и смърт, невинни жертви. *A la guerre comme a la guerre*. Не може да бъде приемливо да бъдат бомбардирани жилищни сгради, училища, театри. Но е непостижимо да се взривяват болници, родилки да умират от травмите си, а криобанките с безценните сперматозоиди, яйцеклетки и ембриони на стотици хора да бъдат критици в бомбоубежища или да бъдат евакуирани по всякакви нетрадиционни способности към съседни държави.

От дистанцията и спокойствието на нашата България е лесно да наблюдаваме случващото се като зрелище, подобно на футболен мач, в който отново сме разделени на две агитки. Само че забравяме да погледнем в себе си, в собствената си неразбория. Политическа криза, институционална криза, финансова криза, енергийна криза, здравна криза... поредна криза. Нищо хубаво не се случва. Нищо лошо не се променя. Година и половина работим без разписани правила (заради отменената Наредба 28 и медицински стандарт „асистирана репродукция“). Нови правителства, но със стари порядки.

И въпреки всичко нашата гилдия продължава да се труди на висотата на съвременните световни стандарти по асистирана репродукция, да въвежда нови методики, да реализира научни разработки. И да създава децата на България, онези, които не биха били родени, ако нас ни нямаше.

За всички колеги и приятели, пред вас, макар и със закъснение, е новият брой на списание Ембриология. Броят за 2021 година. В него, надявам се, ще може да прочетете интересни статии и новини, а редакционната колегия е решена до края на 2022 г. да издаде още един брой.

Д-р Георги Николов,  
Главен редактор

Dear colleagues and friends,

More than 2000 years ago Confucius allegedly said: "Living in interesting times is a curse!"

The times that we live in are undoubtedly interesting, but also difficult, intimidating and dangerous. The COVID-19 pandemic has been followed quite predictably by an economic recession. And when it seemed that the Omicron variant would 'vaccinate' and protect in a natural way huge groups of people, including those who were against all existing vaccines, a war erupted.

A war in modern Europe, regarding itself united and expecting that peace and prosperity would last for quite a long time. A war between two genetically close nations, two neighboring countries... The reasons are clear, as well as who the aggressor and the victims are. Destruction and death, innocent casualties. *A la guerre comme a la guerre*. However, bombardment of residential buildings, schools and theatres cannot be justified. It is unforgivable to blow up hospitals, young childbearing mothers to be dying from their wounds, and the cryo-banks with precious frozen sperm, oocytes and embryos to have to be evacuated by all sorts of unconventional means to neighboring countries.

From the distance and peace in Bulgaria it is quite easy to be merely spectators of the developing drama, divided just like fans at a football match. But we tend to forget to look inside ourselves, at our own chaos. Political crisis, energy crisis, health crisis... next crisis. Nothing good happens, nothing bad changes. It has been more than 18 months without written rules (the relevant legislation being suspended). New governments with old habits.

Nevertheless, our society of embryologists continues its activities at the levels of the modern-day ART standards, introducing new methods, developing scientific projects and creating the children of Bulgaria, those who wouldn't have been born if we hadn't been there.

For all colleagues and friends, although with some delay, we offer the new edition of Embryology journal. The edition that should have been published in 2021. We hope you find it interesting and we promise that a new edition would be drafted until the end of 2022.

*Dr Gueorgui Nikolov, MD, PhD,  
Editor in chief*

# МЕЛАТОНИН И ЗНАЧЕНИЕТО МУ КАТО ХРОНОБИОЛОГИЧЕН ФАКТОР ЗА РЕПРОДУКЦИЯТА ПРИ ХОРАТА

Конакчиева Р., Николаев Г.

Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“, бул. Драган Цанков 8, 1164 София;

## CHRONOBIOLOGY ASPECTS OF THE ROLE OF MELATONIN IN HUMAN REPRODUCTION

R. Konakchieva, G. Nikolaev

Faculty of Biology, Sofia University "St. Kliment Ohridski", 8 "Dragan Tzankov" Blvd., Sofia 1164;

### Резюме

Мелатонинът (N-ацетил-5-метокситриптамин), продукт на епифизната жлеза, има съществена роля в редица биологични процеси и участва в контролирането на сезонната репродуктивна активност при бозайниците. Установено е, че хормонът има пряко въздействие върху овариалната функция при жената, като се предполага неговото участие в патофизиологията на различни репродуктивни проблеми като ендометриоза, синдрома на поликистозни яйчници (PCOS) и преждевременната яйчникова недостатъчност (POF). Мелатонинът и/или метаболитите му са силни антиоксиданти - действието му като широкоспектърен антиоксидант е неговата основна рецептор-независима функция. За осъществяване на специфични клетъчни функции е необходимо свързването на хормона с високо-афинитетни мембранни рецептори. Въпреки че рецепторите за мелатонин са клонирани при редица видове и тяхното разпределение и характеристики интензивно се проучват, все още не са изяснени клетъчните мишени за хормона, както и физиологичното значение на рецептор-активираниите сигнални пътища в контекста на репродуктивната функция при човека.

### Abstract

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a product of the pineal gland, plays an essential role in a number of biological processes and is involved in controlling seasonal reproductive activity in mammals. The hormone has been shown to have a direct effect on a woman's ovarian function and has been suggested as a factor in the pathophysiology of various reproductive problems such as endometriosis, polycystic ovary syndrome (PCOS) and premature ovarian failure (POF). Melatonin and/or its metabolites are potent antioxidants - its action as a broad-spectrum antioxidant is its main receptor-independent function. To perform its specific cellular functions, the hormone must bind to high-affinity membrane receptors. Although melatonin receptors have been cloned in a number of species and their distribution and characteristics have been extensively studied, cellular targets for the hormone and the physiological significance of receptor-activated signaling pathways in the context of human reproductive function have not been elucidated.

### Денонощна ритмичност на физиологичните функции

Концепцията за хомеостазата като поддържане на постоянна вътрешна среда е основен принцип във физиологичната наука и това постоянство се поддържа много динамично. Общ феномен е, че поведенческите функции, както при хората така и при другите бозайници, се проявяват с изразена цикличност, с регулярни вариации през деня (цикъл активност/покой), седмици (еструс/менструален цикъл) или месеци (хибернация, миграция). Стабилността на тези ритми у индивидите след отстраняване на външните сигнали за време се възприема като доказателство за наличието на спонтанни, вътрешни, измерващи времето механизми, или „биологични часовници“. Счита се, че появата на тези ритми в еволюцията е свързана с необходимостта от синхронизиране и адаптиране на организма към характерната за него външна среда, която може да се променя с времето значително, но въпреки това предсказуемо. Проявлението на ритмите може да бъде възприемано като

### Circadian rhythm of physiological functions

The concept of homeostasis as a constant internal environment is a basic principle in physiological science and this constancy is maintained very dynamically. A common phenomenon is that behavioral functions, both in humans and other mammals, are cyclical, with regular variations during the day (activity/rest cycle), weeks (estrus/menstrual cycle) or months (hibernation, migration). The stability of these rhythms in individuals after the removal of external time signals is perceived as evidence of the presence of spontaneous, internal, time-measuring mechanisms, or „biological clocks“. It is believed that the emergence of these rhythms in evolution is associated with the need to synchronize and adapt the organism to its characteristic external environment, which can change significantly over time, but still predictable. The manifestation of rhythms can be perceived as an inner sense of time, which gives the individual the opportunity to be in

вътрешно чувство за време, което дава на индивида възможност да е в синхрон с външните условия и по този начин му позволява да оптимизира адаптацията си. Съвременните аналитични и молекулярно-биологични техники позволиха да бъде демонстрирано, че проявата на големите поведенчески ритми всъщност представлява синтез от наслаждането на направлявани от часовника физиологични състояния на вътрешната среда.

Циркадната организация е фундаментална характеристика на секрецията на много хормони. Тя се проявява или чрез прогресивна промяна в честотата на епизодичното им освобождаване, или чрез остри промени в активирането на ендокринната тъкан от нервната система. Манифестираните различия в профилите на циркадна активност при нормални условия, и в условията на експериментални манипулации, дават основание да се предполага съществуването на различни часовникови механизми, от които най-добре проучен е този ситуиран в супрахиазматичните ядра (SCN) на хипоталамуса. Тези часовникови структури са в състояние да генерират самостоятелно циркаден сигнал, който се доставя до тъканите по различни невроендокринни пътища. Въпреки че анатомичната база на часовника е разкрита, все още не са известни невротомичните механизми, участващи в мощния организмиращ ефект на светлината и на другите предполагаеми синхронизатори. Ефективната адаптация към промените в цикъла светло/тъмно изисква поддържането на прецизен времеви порядък на невроендокринната активност и поведение. Това се постига чрез взаимодействието на процеси с различен циркаден профил, както невротомични, така и ендокринни. Така например, за някои хормони (глюкокортикостероиди) е доказано физиологичното значение на циркадния ритъм на активност, което се определя от специфичен набор прицелни тъкани и механизми на действие. Съвременното виждане в хронобиологичната наука е, че циркадният профил на секреция е от критично значение за времевата организация на функциите в организма, както в случая с епифизния хормон мелатонин това се отнася до циркадната и фотопериодичната организация на ендокринни, поведенчески и метаболитни процеси. По този начин, някои ендокринни секрети, по-конкретно на глюкокортикоидите и мелатонина могат да имат действието на вътрешни синхронизатори (Zeitgebers), отговорни за поддържане на времевата подреденост на физиологичните процеси.

### **Мелатонинът - физиологичен сигнал за тъмната фаза на денонощието**

При всички бозайници, циркадният ендокринен ритъм с най-висока стабилност и изразителност е този на хормона мелатонин от епифизната жлеза.

sync with external conditions and thus allowing him to optimize his adaptation. Modern analytical and molecular-biological techniques have made it possible to demonstrate that the manifestation of large behavioral rhythms is in fact a synthesis of the superimposition of clock-directed physiological states of the internal environment.

Circadian pattern of secretion is a fundamental characteristic of many hormones. It is manifested either by a progressive change in the frequency of their regular release, or by sharp changes in the activation of endocrine tissues by the nervous system. The differences in the profiles of circadian activity under normal conditions, and in the conditions of experimental manipulations, give ground to assume the existence of different clock mechanisms, of which the one situated in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus is best studied. These clock structures are able to generate a circadian signal on their own, which is delivered to the tissues via various neuroendocrine pathways. Although the anatomical basis of the clock has been revealed, the neurochemical mechanisms involved in the powerful organizing effect of light and other putative synchronizers are not yet known. Effective adaptation to changes in the light/dark cycle requires the maintenance of a precise timeline of neuroendocrine activity and behavior. This is achieved through the interaction of processes with different circadian profiles, both neurobiological and endocrine. For example, for some hormones (glucocorticoids) the physiological significance of the circadian rhythm of activity has been proven and is determined by a specific set of target tissues and mechanisms of action. The current view in chronobiology science is that the circadian profile of secretion is critical for the temporal organization of functions in the body, as in the case of the pineal hormone melatonin, this applies to the circadian and photoperiodic organization of endocrine, behavioral and metabolic processes. Thus, some endocrine secretions, in particular glucocorticoids and melatonin, may have the effect of internal synchronizers (Zeitgebers), responsible for maintaining the temporal order of physiological processes.

### **Melatonin - a physiological signal for the dark phase of the diurnal cycle**

In all mammals, the circadian endocrine rhythm with the highest stability and expressiveness is that of the hormone melatonin of the pineal gland. Serum hormone levels are very low during the day and increase several times during

Серумните нива на хормона са много ниски през деня и нарастват неколкостранно през нощта. Промените в активността на стъпало-определящия ензим N-ацетил трансфераза (NAT), които настъпват при залез и изгрев са много резки, което определя и сигнал с правоъгълна характеристика. Противоположно на него например, изразената циркадна динамика в освобождаването на адренокортикотропния хормон (АСТН) и кортикостероидите се генерира чрез модулация на епизодичната секреция, което има за резултат по-синусоидална по вид крива, описваща хормоналната секреция, в сравнение с тази за мелатонина. Циркулиращите нива на кортикостероидите са най-високи преди събуждане и се понижават прогресивно с приближаване на фазата на покой, в синхрон с понижението в нивото на пулсациите на кортикотропин-освобождаващия (CRH) и адренокортикотропния хормон (АСТН). При нощно-активните гризачи, пикът настъпва в началото на активната фаза и намалява през нощта. Въпреки това, и при двата вида (дневно-/нощно-активни) пикът на мелатонина е изключително през тъмната част от денонощието. Като следствие от това, циркадният ритъм на мелатонин при хората е в антифаза с този на кортикостероидите (Tomova et al., 2008), докато при нощно-активните гризачи (плъх) двата пика са успоредни (Konakchieva et al., 1998; 2000). Тези обстоятелства означават, че съотношението на фазите е важен критерий за адаптивните различия между видовете, като най-вероятно за различните ритми съществуват различни контролни механизми.

Съществуват убедителни доказателства, че при човека хроничното излагане на изкуствена светлина по време на тъмната фаза от денонощието има неблагоприятно физиологично въздействие, вследствие промяна на денонощния профил на ендогенната мелатонинова секреция и води до нарушения в метаболитната и поведенческа циркадна активност. Тъй като се контролира пряко от светлината попадаща в ретината, основната роля на секрецията на мелатонин при бозайниците е да отчита промяната в осветлението през различните сезони и да доставя този сигнал на клетъчно ниво. Десинхронизацията на циркадните ритми настъпваща при хроничен неблагоприятен светлинен режим и променен мелатонинов ритъм вероятно е важна причина за установени смущения на надбъбречната ос и адаптацията към стрес (Konakchieva et al., 1997, 1998) промени в имунната реактивност (Taushanova et al., 2007; Konakchieva et al., 2008) хиперинсулинемия и инсулинова резистентност (Avtanski et al., 2006; Seto-Young, Avtanski, Parikh, et al., 2011), свързани с репродуктивни нарушения и при двата пола.

Промените, настъпващи в хронобиологичните характеристики на ритъма на секреция на мела-

the night. The changes in the activity of the step-determining enzyme N-acetyl transferase (NAT), which occur at sunset and sunrise, are very sharp, which determines a signal with a rectangular characteristic. In contrast, for example, the pronounced circadian dynamics in the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosteroids is generated by modulation of episodic secretion, resulting in a more sinusoidal curve of hormonal secretion than that of melatonin. Circulating corticosteroid levels are highest before waking and progressively decrease as the resting phase approaches, in line with the decrease in corticotropin-releasing (CRH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) pulsations. In nocturnal rodents, the peak occurs at the beginning of the active phase and decreases at night. However, in both types (day-/night-active) the peak of melatonin is exclusively during the dark part of the day. As a consequence, the circadian rhythm of melatonin in humans is in antiphase with that of corticosteroids (Tomova et al., 2008), while in nocturnal rodents (rats) the two peaks are parallel (Konakchieva et al. 1998; 2000). These circumstances mean that the phase ratio is an important criterion for adaptive differences between species, with different control mechanisms likely to exist for different rhythms.

There is convincing evidence that in humans, chronic exposure to artificial light during the dark phase of the day has adverse physiological effects due to changes in the circadian profile of endogenous melatonin secretion, leading to disturbances in metabolic and behavioral circadian activity. Because it is controlled directly by light entering the retina, the main role of melatonin secretion in mammals is to detect changes in lighting during different seasons and to deliver this signal at the cellular level. Desynchronization of circadian rhythms occurring in chronic unfavorable light regime and altered melatonin rhythm is probably an important reason for established disorders of the adrenal axis and adaptation to stress (Konakchieva et al., 1997, 1998), changes in the immune reactivity (Taushanova et al. Konakchieva et al., 2008), hyperinsulinemia and insulin resistance (Avtanski et al., 2006, Seto-Young, Avtanski, Parikh, et al., 2011), associated with reproductive disorders in both sexes.

Changes in the chronobiological patterns of the rhythm of melatonin secretion around puberty and those observed in a number of endocrine disorders indicate that the hormone is closely related to the physiological functioning of body systems and its endogenous secretion can even

тонина около пубертета и тези, наблюдавани при редица ендокринни смущения свидетелстват, че хормонът е тясно свързан с физиологичното функциониране на организмовите системи и неговата ендогенна секреция може дори да бъде цитирана като маркер за биологично здраве. Етиологията на голяма част от репродуктивните смущения при жената е неясна, но все по-голямо значение в нея се отдава на хронични възпалителни, биохимични и ендокринни разстройства, които поради взаимна системна обвързаност водят до дерегулиране на фертилната стероидогенна функция. Редица метаболитни и про-инфламаторни смущения, между които синдромът на поликистозните яйчници (СПЯ), метаболитният синдром (МС), наличието на репродуктивни автоантитела (имунологично безплодие) и др., са често срещани при жени в репродуктивна възраст и са основна причина за субфертилитет и стерилитет. Тези заболявания имат значими социално-психологически аспекти, тъй като преодоляването им не винаги е успешно и по принцип е свързано със значителни разходи и необходимост от асистирана репродукция. За общия невроимунологичен дисбаланс при пациентите със СПЯ например говори фактът, че при тях се наблюдава по-висок риск от ендометриални карциноми, захарен диабет и хиперлипидемия. Всъщност, моделите на епидемиология и преобладаване на СПЯ са значително подобни на тези при метаболитен синдром и диабет тип 2, което извежда на преден план в предразположеността към тези заболявания фактори, свързани с околната среда, продължителен дискомфорт и стрес.

#### **Биологични свойства и физиологични функции**

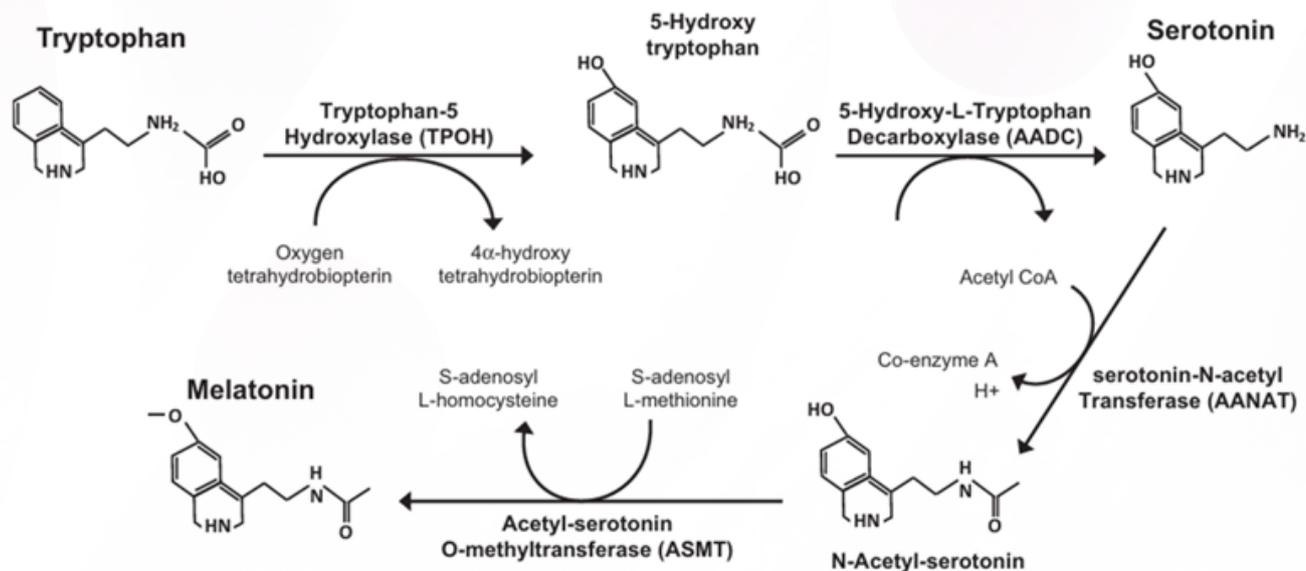
Мелатонинът е малка молекула (Mw 232.27), чийто прекурсор е аминокиселината триптофан. Триптофанът се преобразува в серотонин (5-хидрокси-триптамин) трансформирайки се първо в съединението 5-хидрокси-триптофан посредством ензима триптофан-хидроксилаза и декарбоксилаза. Нивата на серотонина в епифизата са изключително високи през светлата фаза на денонощието и чувствително намаляват в началото на тъмната фаза, когато се активират и различни пътища използващи серотонина като субстрат. Важен за отбелязване е пътя, по който се синтезира мелатонина (фиг. 1).

Използвайки ацетил-коензим А като кофактор, ензимът арилалкиламин-N-ацетилтрансфераза (aaNAT) катализира образуването на N-ацетилсеротонин - непосредствен прекурсор на мелатонина. При повечето видове активността на aaNAT нараства значително през нощта при отсъствието на светлина и се инхибира на светло. N-ацетилсеротонинът бързо се преобразува в мелатонин под действието на ензима хидроксииндол-O-метил-

be cited as a marker of biological health. The etiology of many reproductive disorders in women is unclear, but increasing importance is given to chronic inflammatory, biochemical and endocrine disorders, which due to systemic interrelationship lead to deregulation of fertile steroidogenic function. A number of metabolic and pro-inflammatory disorders, including polycystic ovary syndrome (PCOS), metabolic syndrome (MS), reproductive autoantibodies (immunological infertility), etc., are common in women of reproductive age and are a major cause of subfertility and infertility. These diseases have significant socio-psychological aspects, as their overcoming is not always successful and is generally associated with significant costs and the need for assisted reproduction. The general neuroimmunological imbalance in patients with PCOS, for example, is indicated by the fact that they have a higher risk of endometrial carcinomas, diabetes mellitus and hyperlipidemia. In fact, the patterns of epidemiology and prevalence of PCOS are significantly similar to those of metabolic syndrome and type 2 diabetes, which highlights environmental factors, prolonged discomfort, and stress in susceptibility to these diseases.

#### **Biological properties and physiological functions**

Melatonin is a small molecule (Mw 232.27) whose precursor is the amino acid tryptophan. Tryptophan is converted to serotonin (5-hydroxy-tryptamine) by first transforming it into 5-hydroxytryptophan by the enzymes tryptophan hydroxylase and decarboxylase. Serotonin levels in the pineal gland are extremely high during the light phase of the day and decrease significantly at the beginning of the dark phase, when various pathways using serotonin as a substrate are activated. The way in which melatonin is synthesized is worth mentioning (Fig. 1). Using acetyl-coenzyme A as a cofactor, the arylalkylamine-N-acetyltransferase (aaNAT) enzyme catalyzes the formation of N-acetylserotonin, a direct precursor of melatonin. In most species, aaNAT activity increases significantly at night in the absence of light and is inhibited by light. N-acetylserotonin is rapidly converted to melatonin by the enzyme hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT), aka acetyl-serotonin O-methyl transferase (ASMT), as a result of which melatonin levels rise sharply after the onset of the thin phase. It is thought that due to its small molecule, both lipophilic and hydrophilic in nature, melatonin can cross membranes by simple diffusion (Arendt, 1995). Melatonin is transported in the blood in albumin-bound form and is rapidly



Фиг.1. Биосинтеза на мелатонина.  
Fig.1. Melatonin biosynthesis

трансфераза (HIOMT), известен още като ацетил-серотонин О-метил трансфераза (ASMT), вследствие на което нивата на мелатонина стръмно се покачват след началото на тъмната фаза. Счита се, че поради малката си молекула, както с липофилна, така и с хидрофилна природа, мелатонинът може да преминава през мембраните чрез проста дифузия (Arendt, 1995). Мелатонинът се транспортира в кръвта в свързана с албумин форма и се отстранява бързо, главно чрез чернодробния метаболизъм (преобразува се в 6-хидроксимелатонин, който се свързва като сулфат или глюкуронат).

Мелатонинът се открива в повечето телесни течности като концентрациите му са по-високи през нощта отколкото през деня. Това е резултат от нощната синтеза на хормона под действието на стимулаторни сигнали. При гръбначните тези сигнали се генерират чрез симпатikusови нервни влакна, които доставят информация от супрахиазматичното ядро главно чрез освобождаването на невротрансмитера норадреналин (Korf, 1994).

За откривател на мелатонина се счита Аарон Лернер, който изолира хормона от говежди епифизи (Lerner *et al.*, 1958). Тривиалното му наименование произхожда от способността на веществото да предизвиква агрегация и преразпределение на меланиновите гранули в меланофори на жаба. Въпреки че не е установена особена биологична активност относно процесите, протичащи в кожата на бозайници, първоначално се обръща голямо внимание върху ролята на мелатонина за придвижването на пигментите, особено по отношение дневните вариации в пигментацията при риби и земноводни.

Пионерните изследвания в редица лаборатории (Reiter, 1980; 1988; Turek, 1985; Tamarkin, Baird &

eliminated, mainly by hepatic metabolism (converted to 6-hydroxymelatonin, which binds as sulphate or glucuronate).

Melatonin is found in most body fluids and its concentrations are higher at night than during the day. This is a result of nocturnal hormone synthesis under the action of stimulatory signals. In vertebrates, these signals are generated by sympathetic nerve fibers, which deliver information from the suprachiasmatic nucleus mainly through the release of the neurotransmitter norepinephrine (Korf, 1994).

Aaron Lerner has been considered as the discoverer of melatonin, who isolated the hormone from bovine pineal glands (Lerner *et al.*, 1958). Its trivial name comes from the ability of the substance to cause aggregation and redistribution of melanin granules in frog melanophores. Although no significant biological activity has been identified in mammalian skin processes, much attention has initially been paid to the role of melatonin in the movement of pigments, especially with regard to diurnal variations in pigmentation in fish and amphibians.

Pioneering research in several laboratories (Reiter, 1980; 1988; Turek, 1985; Tamarkin, Baird & Almeida, 1985) has gradually clarified that melatonin is fundamentally linked to reproductive cyclicity, although this significant finding has been limited for many years by simplified interpretation that the hormone is „antigonadotrophic.“ As demonstrated in numerous experiments in a sheep model ((Arendt *A et al.*, 1983; Britzman *EL et al.*, 1983), the hormone

Almeida, 1985) и други постепенно изясняват, че мелатонинът е фундаментално свързан с репродуктивната цикличност, въпреки че това значимо откритие бива ограничавано дълги години от опростената интерпретация, че хормонът е „антигонадотропен“. Както е демонстрирано при множество експерименти на модел овце (Arendt A *et al.*, 1983; Brittman EL *et al.*, 1983), хормонът може да бъде считан и за „прогонадотропен“. По този начин, изследователите се принуждават да разширят изследванията върху функциите на мелатонина, имащи отношение към контрола на времевата организация на физиологичните функции, дирижирана от т.нар. „биологичен часовник“. Установява се, че съществува строг ритъм в синтеза на мелатонин, което представлява важно ранно доказателство за уникалната роля на молекулата във функционирането на биологичните ритми. Окончателно е доказано, че супрахиазматичните ядра на хипоталамуса са „главния осцилатор“, отговорен за генерирането на 24-часов ритъм на редица биологични функции, включително и биосинтеза на мелатонин (Benarroch E, 2008).

#### **Плейотропно действие**

Мелатонинът може да се възприема като сигнална молекула, секретирана с циркаден ритъм, с доказано уникално значение за контрола на циркадната и сезонна физиология, включително репродуктивното поведение (Vanecsek, 1998). Функционалната активност на хормона има широк спектър на действие, като някои от функциите му все още се проучват. По-важни открития за биологичното значение на мелатонина при бозайниците се отнасят до контрол върху функциите на ретината, контрол върху репродуктивните цикли при сезонно размножаващи се животни и влияние върху фазите на 24-часовите поведенчески ритми (например цикъла сън-бодърстване), участие в контрола на терморегулацията и съня. Счита се, че тези функции се опосредстват от специфични мелатонинови рецептори, чиято документирана локализация в ретината, предния дял на хипофизата и супрахиазматичните ядра на хипоталамуса подкрепя респективно тези твърдения (Reppert *et al.*, 1988, 1994, 1996; Konakchieva *et al.*, 2000; Konakchieva, 2009). За мелатонина са установени със сигурност два високо-афинитетни G-протеин свързани рецептори, активирани от лиганда, които се обозначават MT1 и MT2; кодиращите ги гени се обозначават съответно MTRN1A и MTRN1B. Посредством тяхното активиране в различни таргетни тъкани се регулира циркадния ритъм, мозъчни, съдови, репродуктивни, ендокринни и имунни функции (Dubocovich *et al.*, 2003).

#### **Хронобиологично значение за човешката репродукция**

Дългосрочните механизми, които позволяват на живите организми да синхронизират репродук-

can also be considered „progonadotrophic“. Thus, researchers were forced to expand research on the functions of melatonin, relevant to the control of the temporal organization of physiological functions, conducted by the so-called „biological clock“. It has been found that there is a strict rhythm in the synthesis of melatonin, which is important early evidence of the unique role of the molecule in the functioning of biological rhythms. The suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus have finally been shown to be the „main oscillator“ responsible for generating the 24-hour rhythm of a number of biological functions, including melatonin biosynthesis (Benarroch E, 2008).

#### **Pleiotropic action of melatonin on body physiology**

Melatonin can be perceived as a signaling molecule secreted in a circadian rhythm, with proven unique value for the control of circadian and seasonal physiology, including reproductive behavior (Vanecsek, 1998). The functional activity of the hormone has a wide range of action, and some of its functions are still being studied. More important findings on the biological significance of melatonin in mammals include control of retinal function, control of reproductive cycles in seasonally breeding animals, and influence on phases of 24-hour behavioral rhythms (e.g., sleep-wake cycle), participation in control of thermoregulation and sleep. These functions are thought to be mediated by specific melatonin receptors, whose documented localization in the retina, anterior pituitary, and suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus supports these claims, respectively (Reppert *et al.* 1988; 1994; 1996; Konakchieva *et al.* 2000, Konakchieva 2009). For melatonin, two high-affinity ligand-activated receptors have been identified with certainty, which are designated as MT1 and MT2, and the coding genes - as MTRN1A and MTRN1B, respectively. By activating them in various target tissues, circadian rhythm, brain, vascular, reproductive, endocrine and immune functions are regulated (Dubocovich *et al.*, 2003).

#### **Chronobiological significance for human reproduction**

Long-term mechanisms that allow organisms to synchronize their reproductive activity with changes in the environment are widespread in nature. They optimize the ability of survival of the species, as well as their reproductive success. In seasonally breeding mammals, melatonin regulates the processes of dynamic adaptation in physiology that occur in response to changes in the duration of light exposure. Cyclical gonadal function, dietary intake, changes in body weight, and hibernation are characteristic

тивната си активност с промените в околната среда са широко разпространени в природата. Те оптимизират възможността за оцеляване на съответния вид, а също и неговия репродуктивен успех. При сезонно размножаващите се бозайници мелатонинът регулира процесите на динамична адаптация във физиологията, които настъпват в отговор на промените в продължителността на светлинната експозиция. Цикличността на гонадната функция, хранителния прием, промените в телесното тегло и хибернацията са характерни годишни промени за много бозайници (Lincoln *et al.*, 2003).

Значимостта на консервативните регулаторни механизми, използващи епифизната жлеза и в частност мелатонина, по отношение на репродукцията при хората, са неизяснени. Съобщенията за директно въздействие на мелатонина върху овариалната стероидогенеза, високите нива на хормона в човешка фоликуларна течност и наличието на високо-афинитетни мелатонинови рецептори в яйчника свидетелстват за участие на мелатонина като модулятор на овариалната функция (Georgiev *et al.*, 2019). Счита се за доказано, че репродуктивните ефекти на хормона са медиирани чрез въздействие върху освобождаването на гонадотропини на ниво хипоталамус и вероятно чрез cAMP и Ca<sup>++</sup>-зависими вътреклетъчни механизми на ниво хипофиза (Vanecek, 1995). Съществуват и доказателства за пряко участие върху функциите на яйчника. Високи нива мелатонин, подложени на сезонни вариации се откриват в човешка преовулаторна фоликуларна течност (Brzezinski, 1997). При човека, рецептори за мелатонин са описани върху гранулоза-лутеинни клетки и вероятно са свързани с директен ефект върху стероидогенезата (Niles *et al.*, 1999, Georgiev *et al.*, 2019). Вече е добре установен факт, че мелатонинът модулира секрецията на хипофизните гонадотропини, лутеинизиращ (LH) и фоликулостимулиращ (FSH) хормон, чрез инициране на промени в чувствителността на централни регулаторни звена (пулсовия генератор за GnRH в хипоталамуса). Чрез рецептор-медиирани процеси двата гонадотропина играят централна роля в контрола на овариалната функция, но отношението на мелатонина към промените в чувствителността на яйчника и стероидната секреция се считат за неизяснени.

Интерпретирането на универсално значение на мелатонина в репродуктивната система се затруднява допълнително от наблюденията за влияние върху стероидогенезата през различни етапи от фоликуларната матурация. Според някои съобщения мелатонинът повишава продукцията на прогестерон и андростендион (Adriaens *et al.*, 2006), без да изменя нивата на естрадиол (Tanavde & Maitra, 2003), съответно инхибира експресията на CYP 11A и CYP 17, но не и тази на CYP 19.

annual changes in many mammals (Lincoln *et al.*, 2003).

The importance of the conservative regulatory mechanisms using the pineal gland, and in particular melatonin, in terms of reproduction in humans is unclear. Reports of direct effect of melatonin on ovarian steroidogenesis, high hormone levels in human follicular fluid and the presence of high-affinity melatonin receptors in the ovary indicate the involvement of melatonin as a modulator of ovarian function (Georgiev *et al.*, 2019). The reproductive effects of the hormone are thought to be mediated by its effects on gonadotropin release at the hypothalamic level and possibly by cAMP and Ca<sup>++</sup> - dependent intracellular mechanisms at the pituitary level (Vanecek, 1995). There is also evidence of direct involvement in ovarian function. High levels of melatonin subjected to seasonal variations are found in human preovulatory follicular fluid (Brzezinski, 1997). In humans, melatonin receptors have been described on granulosa-lutein cells and are likely to be associated with direct effect on steroidogenesis (Niles *et al.*, 1999, Georgiev *et al.*, 2019). It is already well established that melatonin modulates the secretion of pituitary gonadotropins, luteinizing (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), by initiating changes in the sensitivity of central regulatory units (the pulse generator for GnRH in the hypothalamus). Through receptor-mediated processes, both gonadotropins play a central role in the control of ovarian function, but the relationship of melatonin to changes in ovarian sensitivity and steroid secretion is considered unclear.

The interpretation of the universal significance of melatonin in the reproductive system is further complicated by observations of the effect on steroidogenesis during different stages of follicular maturation. According to some reports, it increases the production of progesterone and androstenedione (Adriaens *et al.*, 2006) without altering estradiol levels (Tanavde & Maitra, 2003), respectively inhibits the expression of CYP11A and CYP17, but not that of CYP19.

Obviously, the role of melatonin in follicular steroidogenesis is complex and different depending on cell type (theca or granulosa cells), pre-hormonal background, duration of treatment, experimental model (cell culture or follicle culture), and animal species and dose administered (Nakamura *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2001). In the early stages of steroidogenesis, melatonin is thought to have an inhibitory effect based on inhibition of cAMP, which is a key secondary mediator in this process. The

Очевидно, ролята на мелатонина във фоликуларната стероидогенеза е комплексна и различна в зависимост от клетъчния тип (тека или гранулозни клетки), предварителния хормонален фон, продължителността на третиране, експерименталния модел (клетъчна култура или култивиране на фоликули), както и животинския вид и приложена доза (Nakamura *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2001). Предполага се, че в началните етапи на стероидогенезата мелатонинът има потискащ ефект, основан на инхибиране на cAMP, който е ключов вторичен посредник в този процес. Предполагането се базира на резултати, демонстриращи, че при краткотрайна инкубация (до 48 часа) мелатонинът оказва негативен ефект върху продукцията на прогестерон, докато при дългосрочно третиране ефектът му е положителен (Nakamura *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; H Tamura *et al.*, 1998) □. Счита се, че първоначално потискащият ефект върху cAMP е доминантен, а впоследствие другите въздействия, които хормона оказва (като индукция на експресията на иРНК за LH рецептор и поддържащото му действие в GCs) стават доминиращи.

Интересна насока е изследване ролята на мелатонин по отношение експресията на локални растежни фактори в яйчника и свързаните с тях сигнални пътища. Така например, инсулиноподобните растежни фактори (IGFs) и членове от семейството на трансформиращия растежен фактор бета (TGF-β), като инхибини, активини и костни морфогенни протеини (BMPs), също участват в процеса на фоликулогенеза. Инсулиноподобните растежни фактори се синтезират от гранулозните клетки и тека клетките (Poretsky *et al.*, 2011). Те са митогенни и антиапоптични пептиди, които стимулират диференциацията и имат инсулиноподобни метаболитни ефекти, които се проявяват чрез свързване със специфични високо-афинитетни мембранни рецептори. IGF-I и IGF-II стимулират ДНК синтезата и секрецията на естрадиол и прогестерон от гранулозни и гранулозо-лутеинни клетки (Poretsky *et al.*, 2011). Мелатонинът стимулира синтезата на IGF-I в култивирани hGCs (Schaeffer & Sirotkin, 1997). Picinato и сътрудници демонстрират, че мелатонинът индуцира IGF-I рецептора и активира вътреклетъчните сигнални пътища на PI3K/AKT, участващ главно в клетъчния метаболизъм, и MEK/ERKs, които са свързани с клетъчната пролиферация, растеж и диференциация (Picinato *et al.*, 2008).

Периферните нива на мелатонин при хората изразяват значителни индивидуални флукутации и зависят от възрастта, репродуктивния статус и наличието на психо-соматични нарушения (Tomova *et al.*, 2008). Изменения в амплитудата на ендогенния циркаден профил на секреция на

hypothesis is based on results demonstrating that in short-term incubation (up to 48 hours) melatonin has a negative effect on progesterone production, while in long-term treatment its effect is positive (Nakamura *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 1998) □. Initially, the inhibitory effect on cAMP is thought to be dominant, and subsequently other effects of the hormone (such as induction of LH receptor mRNA expression and its maintenance action in GCs) become dominant.

An interesting direction is the study of the role of melatonin in the expression of local growth factors in the ovary and related signaling pathways. For example, insulin-like growth factors (IGFs) and members of the transforming growth factor beta (TGF-β) family, such as inhibins, activins, and bone morphogenic proteins (BMPs), are also involved in folliculogenesis. Insulin-like growth factors are synthesized by granulosa cells and theca cells (Poretsky *et al.*, 2011). They are mitogenic and antiapoptotic peptides that stimulate differentiation and have insulin-like metabolic effects that are manifested by binding to specific high-affinity membrane receptors. IGF-I and IGF-II stimulate DNA synthesis and secretion of estradiol and progesterone by granulosa and granulosa-lutein cells (Poretsky *et al.*, 2011). Melatonin stimulates the synthesis of IGF-I in cultured hGCs and it has been shown that melatonin induces the IGF-I receptor and activates the intracellular signaling pathways of PI3K/AKT, involved mainly in cellular metabolism, and MEK/ERKs, which are associated with cell proliferation, growth and differentiation (Picinato *et al.*, 2008).

Peripheral melatonin levels in humans express significant individual fluctuations and depend on age, reproductive status and the presence of psycho-somatic disorders (Tomova *et al.* 2008). Changes in the amplitude of the endogenous circadian profile of hormone secretion have been observed in association with a number of diseases such as schizophrenia, depression, hypothalamic amenorrhea, anorexia nervosa, and a number of tumors (Brzezinski, 1997; Tomova *et al.* 2008). Melatonin is a chronobiological agent and, at least in photoperiodic species, the signal by which it controls reproduction is related to its nocturnal secretion. In humans, the changed stereotype of daily light exposure due to modern lifestyle, causes desynchronization of circadian rhythms in some individuals and is probably an important cause of hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and increased incidence of cardiovascular disease, especially in shift workers (Stoinev & Minkova, 1994; Lund *et al.*, 2001, Knutsson *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2005).

хормона са наблюдавани в асоциация с редица заболявания като шизофрения, депресия, хипоталамична аменорея, анорексия нервоза, както и редица тумори Brzezinski, 1997; Tomova *et al.*, 2008). Мелатонинът е хронобиологичен агент и поне при фотопериодичните видове сигналът, чрез който контролира репродукцията, е свързан с неговата нощна секреция. При човека, промененият стереотип в ежедневната светлинна експозиция вследствие съвременния начин на живот, предизвиква десинхронизация на циркадните ритми при някои индивиди и вероятно е важна причина за установените хиперинсулинемия, хипертриглицеридемия и повишена честота на сърдечно-съдови заболявания, особено при сменни работници (Стойнев & Минкова, 1994; Lund *et al.*, 2001; Knutsson, 2003; Karlsson *et al.*, 2005). Активността през тъмната фаза на денонощието (например при сменни работници, модерен начин на живот) води до нарушен инсулинов отговор спрямо глюкозата и най-вероятно е важен рисков фактор за развитие на затлъстяване, синдром на нощното хранене, хипертония, диабет и рак (Zacharieva *et al.*, 2004; Cornélissen *et al.*, 2008). В България, оригинално клинично проучване показва за първи път свързаност между мелатониновите и инсулинови нива при пациенти с метаболитен синдром (Robeva *et al.*, 2008).

Още Нобеловият лауреат Charles Huggins (Huggins Ch, 1952) изразява концепцията, че някои репродуктивни тумори, като рака на млечната жлеза и простатата, са последствие от патологично проявено нарушение в ендокринния отрицателен контрол на обратна връзка. Контролният механизъм, функциониращ при репродуктивно активни индивиди, съдържа стимулация от хипофизните гонадотропини на гонадите и прицелни органи за полови стероиди (напр. млечна жлеза и простата), като обратната връзка се състои в инхибиране на хипофизната секреция от стероидите. Основа на концепцията е схващането, че всяко нарушение в метаболизма на половите стероиди в прицелната тъкан, или липсата на баланс в производството на полови стероиди, се отразява на контрола върху хипофизата (или оста хипоталамус-хипофиза), и има за резултат неадекватен инхибиторен контрол върху гонадотропините. Това може да има за последствие свръхстимулация на гонадите (както и на надбъбречните жлези) и неконтролиран растеж в стероид-зависими прицелни органи.

В съвременен вид, тази теория се преосмисля в светлината на новата информация, обвързваща някои репродуктивни карциноми с наследствена обремененост, начин на живот и хранене, стрес, включително епигенетични фактори. Въпреки това, независимо от доказателствата за унаследяване на контролните механизми чрез генома,

Activity during the dark phase of the day (e.g. shift workers, modern lifestyle) leads to impaired insulin response to glucose and is probably an important risk factor for obesity, nocturnal eating syndrome, hypertension, diabetes and cancer (Zacharieva *et al.*, 2004; Cornélissen *et al.*, 2008). In Bulgaria, an original clinical study showed for the first time an association between melatonin and insulin levels in patients with metabolic syndrome (Robeva *et al.*, 2008).

As long ago as the middle of the last century, the Nobel laureate Charles Huggins (Huggins 1952) expressed the concept that some reproductive tumors, such as breast and prostate cancer, are a consequence of a pathological disorder of endocrine-negative feedback control. The control mechanism, functioning in reproductively active individuals, involves stimulation by the pituitary gonadotropins of the gonads and the target organs for sex steroids (e.g. mammary gland and prostate), the feedback being the inhibition of pituitary secretion by steroids. The concept is based on the notion that any disturbance in the metabolism of sex steroids in the target tissue, or a lack of balance in the production of sex steroids, affects the control of the pituitary gland (or hypothalamic-pituitary axis), and results in inadequate inhibitory control on gonadotropins. This can lead to overstimulation of the gonads (as well as the adrenal glands) and uncontrolled growth of steroid-dependent target organs.

In its modern form, this theory is being reconsidered in the light of new information linking some reproductive cancers to hereditary burden, lifestyle and diet, stress, and epigenetic factors. However, despite the evidence for inheritance of control mechanisms through the genome, the importance of estrogen and gonadotropic hormones in the etiology of subfertile conditions in men and women, as well as reproductive precancerous diseases and tumors is undeniable. For example, the inability of the hypothalamic-pituitary system to suppress LH secretion, a normal event in each menstrual cycle and during pregnancy, can cause increased stimulation of androgens in the ovarian stroma, which are subsequently aromatized to estrogens in the mammary gland and the adipose tissue by tissue-specific aromatase. Estrogens, in turn, are associated with increased levels of glandular epithelial proliferation.

During menopause, when ovarian steroid inhibitory control is reduced or absent, reproductive tissue is affected by chronic stimulation by growth gonadotropic factors and especially LH, which cannot be balanced

значението на естрогените и гонадотропните хормони в етиологията на субфертилни състояния при мъжа и жената, както и на репродуктивните преканцерозни заболявания и тумори е неоспоримо. Например, невъзможността на хипоталамо-хипофизната система да подтисне секрецията на LH, нормално събитие във всеки менструален цикъл и по време на бременност, може да предизвика увеличена стимулация на андрогени в стромата на яйчника, които впоследствие да бъдат ароматизирани до естрогени в млечната жлеза и мастната тъкан от тъканно експресирана ароматаза. Естрогените от своя страна са свързани с повишено ниво на пролиферация на епитела на жлезата.

По време на менопауза, когато е намален или липсва инхибиторния стероиден контрол от яйчниците, репродуктивните тъкани са под въздействието на хронична стимулация от растежните гонадотропни фактори и LH в частност, което не може да бъде балансирано от производството на прогестерон от овулиращи *corpora lutea*, който нормално подтисва хипофизната секреция на LH. Рискът допълнително нараства от стимулиращи клетъчния растеж и пролиферация множество ендокринни и паракринни растежни регулатори (EGF, инсулин и инсулиноподобни растежни фактори, интерлевкин 1-алфа и бета, ароматаза и т.н.).

Приложението на мелатонин при хората се основава на презумцията за неговия супресиращ ефект върху гонадотропините (в частност доказан по отношение секрецията на LH и пролактин при сезонно-циклиращите видове, в зависимост от продължителността на светлата част от денонощието) (Lincoln & Short, 1980; Arendt, 1988). Опитите за клинично приложение на хормона не оправдават очакванията в много насоки, но определено неговият ефект по отношение потенцирането на инхибиторния контрол върху гонадотропините заслужава внимание. В съвкупност, резултатите от пространни клинични проучвания дават основание да се счита, че повишената мелатонинова секреция представлява инхибиторен сигнал за размножаването при хората, т.е. генетично хората са вид, размножаващ се при дълъг ден. В подкрепа на тези наблюдения, хипогонадотропният хипогонадизъм, хипоталамичната аменорея, както и забавеният пубертет се свързват с високо-амплитудна секреция на хормона и изменено съотношение на дневни/нощни стойности (Kumanov *et al.*, 2005). В арктичните области, сезонният ановулаторен синдром също се проявява във връзка с повишени дневни мелатонинови нива (Arendt, 1997).

Съществуват данни за повишени нива на мелатонин през лутеалната фаза на менструалния цикъл в сравнение с фоликуларната (Brun *et al.*, 1987). Мелатонинът стимулира секрецията на прогестерон в човешки гранулоза-лутеинни клетки (Brzezinski

by progesterone production from the ovulating *corpora lutea* normally, that suppresses pituitary secretion of LH. The risk is further increased by stimulating cell growth and proliferation many endocrine and paracrine growth regulators (EGF, insulin and insulin-like growth factors, interleukin 1-alpha and beta, aromatase, etc.).

The use of melatonin in humans is based on the presumption of its suppressive effect on gonadotropins (particularly proven for the secretion of LH and prolactin in seasonally cycling species, depending on the length of daylight) (Lincoln & Short, 1980; Arendt, 1988). Attempts at clinical administration of the hormone do not live up to expectations in many ways, but its effect in potentiating gonadotropin inhibitory control is certainly noteworthy. Taken together, the results of extensive clinical trials suggest that increased melatonin secretion is an inhibitory signal for reproduction in humans, i.e., humans are a species that is genetically determined to reproduce during long daylight conditions. In support of these observations, hypogonadotropic hypogonadism, hypothalamic amenorrhea, and delayed puberty have been associated with high-amplitude hormone secretion and altered day/night ratios (Kumanov *et al.*, 2005). In the Arctic, seasonal anovulatory syndrome is also associated with elevated daily melatonin levels (Arendt, 1997).

There is evidence of elevated melatonin levels during the luteal phase of the menstrual cycle compared to the follicular (Brun *et al.*, 1987). Melatonin stimulates the secretion of progesterone in human granulosa-lutein cells (Brzezinski *et al.*, 1992) and its involvement in luteal phase regulation is thought to be one of its major functions in ovary. In addition, melatonin significantly increases the expression of mRNA for LH (but not for FSH) receptor in human granulosa-lutein cells, while at the same time suppressing the expression of the GnRH and GnRH receptor (Woo *et al.*, 2001). It increases the hCG-stimulated secretion of progesterone in these cells, probably through increased LH receptor expression.

It is possible that melatonin is an important antioxidant and acceptor of reactive oxidative radicals (ROS) in the female reproductive system. ROS inhibit progesterone production and induce CL regression (Sugino *et al.*, 2000). In the ovary, melatonin probably protects the corpus luteum from free radicals and therefore plays an important role in maintaining its function. In clinical trials, the hormone has been found to improve the quality of oocytes in IVM and increase the success of IVF. Its influence

*et al.*, 1992) и се предполага, че участието му в регулацията на лутеалната фаза е една от основните му функции в яйчника. Освен това мелатонинът повишава значително експресията на иРНК за LH (но не и за FSH) рецептора в човешки гранулоза-лутеинни клетки, докато в същото време потиска експресията на GnRH и GnRH рецептора (Woo *et al.*, 2001). Той повишава hCG-стимулираната секреция на прогестерон в тези клетки вероятно именно чрез повишената експресия на LH рецептора.

Възможно е мелатонинът да има значение в репродуктивната система на жената в качеството си на антиоксидант и акцептор на реактивни окислителни радикали (ROS). ROS потискат продукцията на прогестерон и индуцират регресия на CL (Sugino *et al.*, 2000). В яйчника мелатонинът вероятно предпазва жълтото тяло от свободните радикали и затова има важна роля в поддържане на функцията му. В клинични проучвания е установено е, че хормона подобрява качеството на овоцитите при IVM и повишава успеха на IVF. Възприема се положително и влиянието му в поддържане на ендометриума, както и в процеса на имплантация (Dair *et al.*, 2008). Най-вероятно високи нощни нива на хормона през лутеалната фаза и през ранната бременност стимулират синтеза на прогестерон от лутеинните клетки и по този начин мелатонинът допринася за успешното развитие на бременността.

#### **Заключение**

Въпреки огромния обем информация по отношение биологичните ефекти и действие на мелатонина, много проблеми остават неизяснени. Важните въпроси, които се нуждаят от решение, касаят ключови детайли като специфичната клетъчна локализация на функционални рецептори за мелатонин и механизмите за активирането им, последващи прицелни елементи на генна експресия и тяхното значение във физиологичен контекст и по-специално за репродуктивната система при човека. Изключително важно е да се прави разлика между физиологичните ефекти на мелатонина като естествен хронобиологичен сигнал и фармакологичните последици от приложението на мелатонин като лекарствена добавка. Същото се отнася и за интерпретацията на ефектите на мелатонин – от значение е индивидуален подход, който отчита ритмичността на секрецията на ендогенния хормон както и наличието на рецепторна възприемчивост и възможност за отговор на тъканта. Възрастта и степента на полово зрялост, фазата на развитие и/или полов цикъл, както и генетични вариации, могат да повлияят на това как репродуктивната тъкан ще реагира на мелатонин приложен отвън. Очевидно е, че мелатонинът и/или негови аналози поставят предизвикателства пред персонализираната репродуктивна медицина и ще намерят своето място в нейния арсенал.

in endometrial maintenance as well as in the implantation process is also perceived positively (Dair *et al.*, 2008). Most likely, high nocturnal hormone levels during the luteal phase and early pregnancy stimulate the synthesis of progesterone by lutein cells and thus melatonin contributes to the successful development of pregnancy.

#### **Conclusion**

Despite the vast amount of information regarding the biological effects and actions of melatonin, many problems remain unclear. Important issues that need to be addressed concern key details such as the specific cellular localization of functional melatonin receptors and their activation mechanisms, subsequent targeting elements of gene expression and their importance in a physiological context, especially for the human reproductive system. It is extremely important to distinguish between the physiological effects of melatonin as a natural chronobiological signal and the pharmacological consequences of the use of melatonin as a drug supplement. The same applies to the interpretation of the effects of melatonin - an individual approach is important, which considers the rhythmic secretion of endogenous hormone as well as the presence of receptor susceptibility and the ability to respond to tissue. Age and degree of puberty, stage of development and/or menstrual cycle, as well as genetic variations, may affect how reproductive tissue will respond to externally melatonin. It is obvious that melatonin and/or its analogues pose challenges to personalized reproductive medicine and will find their place in its arsenal.

#### **Благодарности:**

С подкрепата на Ф НИ на МОН и Договор КП-06-Н33/13

#### **Acknowledgments:**

Part of the research was supported by the Ministry of Education and Science, National Science Fund of Bulgaria under Grant КП-06-Н33/13.

# МОРФОЛОГИЧНА И ГЕНЕТИЧНА ОЦЕНКА НА ЧОВЕШКИ БЛАСТОЦИСТИ

Ѐ. Хасанова, Д. Гуленова, Е. Маринова и Г. Николов  
МЦ "РепроБиоМед" – София, ул. "Бойчо Огнянов" №28

## MORPHOLOGICAL AND GENETIC ASSESSMENT OF HUMAN BLASTOCYSTS

J. Hasanova, D. Gulenova, E. Marinova, G. Nikolov  
ReproBioMed Medical Centre – Sofia, 28 Boycho Ognyanov Str.

### Въведение

Инфертилитетът е сериозен социален и икономически проблем, а в индивидуален план нанася тежки психологически и емоционални щети на засегнатите. В развитите страни около 15-16% от двойките в репродуктивна възраст страдат от безплодие

Едни от критичните стъпки след *in vitro* оплождане са селектирането и трансферът на генетично здрав ембрион с добро качество и висок потенциал на развитие (Kim *et al.*, 2019). В голяма част от клиниките по асистирана репродукция, селекцията на ембриони се прави въз основа на техните морфологични характеристики в различните етапи на развитие - зигота, 2-3-дневни ембриони и в стадий бластоцист (Fragouli *et al.*, 2014). Култивирането на ембрионите до стадий бластоцист се използва като начин за подбор на най-жизнеспособните ембриони от кохортата с последващо намаляване броя на реализираните трансфери и честотата на многоплодна бременност (Irani *et al.*, 2018).

Традиционно, оценката на развитието на ембрионите става чрез ежедневно изваждане от инкубаторите и микроскопиране, което ги поставяше в субоптималните условия на околната среда в лабораторията (снижаване на температурата, промяна на рН и осмолалитета на средата, излагане на летливи органични вещества - VOCs, осветяване със силна бяла светлина и др.), към които те са особено чувствителни.

Появата на едностъпкови хранителни среди (*single step media*), подходящи за култивиране от зиготен до бластоцистен стадий, както и на специални инкубатори, снабдени с т.нар. *time-lapse system* (TLS), която позволява 24-часово наблюдение на морфо-кинетиката на ембриона (без изваждането му от инкубатора), доведоха до възможността за неинвазивна оценка качеството на развиващите се предимплантационни ембриони и тяхната подобрена селекция. Благодарение на TLS, ембриологът получава много повече информация относно ключови моменти от ембрионалното развитие, които вероятно са свързани със способността за образуване на бластоциста с висок имплантационен потенциал (Storr *et al.*, 2015).

### Introduction

Infertility is a serious social and economic problem, and in an individual perspective can cause severe psychological and emotional damage to affected people. In developed countries, about 15-16% of couples in reproductive age suffer from infertility.

One of the critical steps after *in vitro* fertilization is the selection and transfer genetically healthy embryos with good quality and high developmental potential (Kim *et al.*, 2019). In the vast majority of IVF laboratories around the world, embryo selection is based on their morphological evaluation at distinct developmental stages - at the zygote, at the day 2-3 (cleavage) and at the blastocyst stage (Fragouli *et al.*, 2014). Embryo cultivation to the blastocyst stage used to select the most potentially viable embryos from the cohort thus decreasing the number of embryos transferred and the multiple pregnancies rates (Irani *et al.*, 2018).

Traditionally, the development of embryos is assessed by daily microscopy, removing them from the incubators and exposing them to sub-optimal conditions in the laboratory (temperature fluctuations, changes in pH and osmolality, exposure to volatile organic compounds (VOCs) and strong white light, etc.) to which they are especially sensitive.

The introduction of *single-step media*, suitable for cultivation from the zygote to the blastocyst stage and of special incubators, equipped with the so-called *time-lapse system* (TLS), which allows 24-hour monitoring of the morphokinetics of embryos without removing them from the incubator, has led to the possibility for non-invasive embryo assessment and better selection. Thanks to TLS, the embryologist receives more information about key moments of embryo development, which are probably related to its ability to form a blastocyst with high implantation potential (Storr *et al.*, 2015).

It should be taken into consideration that advanced maternal age is one of the serious

Трябва да се има предвид, че авансиралата репродуктивна възраст при жената, е един от сериозните проблеми в асистираната репродукция, особено през последното десетилетие в България. Реализирането на успешна бременност рязко намалява към края на четвъртата декада поради намаления яйчников резерв и влошаващото се качество на яйцеклетките, което от своя страна води до висок процент ембриони с хромозомни аномалии, вариращи от 60% при жени под 35 години до над 80% при жени над 41 години (Kong *et al.*, 2017). В този смисъл, изборът на поне един еуплоиден ембрион с отлична морфология, е от ключово значение за постигането на развиваща се бременност и раждането на здрав доношен плод.

От първото, завършило с раждане, ин витро оплождане (през 1978 г.) до наши дни, повече от 8 милиона деца са родени след асистираны репродуктивни технологии (ART) (Crawford & Ledger, 2019). В световен мащаб, над 200, 000 деца се раждат годишно след IVF като броят на циклите постоянно нараства (Zhao *et al.*, 2020).

Най-малко 40-60 % от човешките ембриони са анеуплоидни, като тези проценти нарастват до 80 % при жени над 40 години. Това е най-често срещаната генетична аномалия при хората и е една от основните причини за неуспешна имплантация и загуба на бременност (Nagaoka *et al.*, 2012), както и за ниската успеваемост след ин витро оплождане и ембриотрансфер - от 30% при жени < 35 години до под 6% при жени > 40 години (Dahdouh *et al.*, 2015). В допълнение около 10-15 % от клиничните бременности са последвани от спонтанен аборт, 50 % от които се дължат на хромозомни аномалии (Fesahat *et al.*, 2020).

Най-ранните опити за пренатална диагностика са правени още през 1967 г., когато Гарднър и Едуардс анализират X-хроматина при заешки бластоцисти, с цел определяне пола на ембрионите. Няколко години по-късно, през 1985 г. Световната здравна организация предлага разработване на PGT (preimplantation genetic testing) с изследване на яйцеклетки и/или предимплантационни ембриони като етична и превантивна технология. Първото успешно приложение на PGT се осъществява едва през 1990 г. от Алан Хендисайд и колеги, които определят пола на ембриони, при които има риск от унаследяване на X-свързано заболяване; ползват полимеразна верижна реакция (PCR) чрез амплификация на Y-хромозомни специфични последователности с цел да разграничат мъжки и женски.

PGT-A или предимплантационен генетичен скрийнинг (PGS) е техника, с помощта на която е възможен цялостен хромозомен анализ на всич-

problems in assisted reproduction, especially in the last decade in Bulgaria. Achieving a successful pregnancy declines progressively with female age (especially after 38 years) because of diminished ovarian reserve and poor egg quality, which leads to a higher incidence of chromosomally abnormal embryos, ranging from 60% in women younger than 35 years to 80% in women 41 years and older (Kong *et al.*, 2017). In this sense, the selection of at least one embryo with excellent morphology is crucial for achieving a pregnancy and giving birth to a healthy full-term baby.

Since the birth of first IVF baby in 1978, more than 8 million children have been born after assisted reproductive technologies (ART) (Crawford & Ledger, 2019). Worldwide, more than 200, 000 children are born each year after IVF, and the number of cycles is steadily increasing (Zhao *et al.*, 2020).

At least 40-60% of human embryos are aneuploid with rates rising up to 80% and more in women at the age of 40+. This is the most common genetic abnormality in humans and is one of the main reasons for implantation failure and pregnancy loss (Nagaoka *et al.*, 2012), as well as for the low success rates after IVF-ET - 30% in women < 35 years and less than 6% in those above 40 (Dahdouh *et al.*, 2015). In addition, it has been estimated that more than 10-15 % of clinical pregnancies end in miscarriage, 50 % of which are due to chromosomal abnormalities (Fesahat *et al.*, 2020).

The earliest research on prenatal diagnosis was conducted in 1967, when Gardner and Edwards analyzed the X-chromatin in rabbit blastocysts to determine the sex of the embryos. A few years later, in 1985, the World Health Organization (WHO) proposed the development of PGT (preimplantation genetic testing) of oocytes and preimplantation embryos as an ethical and preventive technology. The first successful use of PGT was done in 1990 by Alan Handyside and colleagues who determined the sex of embryos in which there was a risk of inheriting an X-linked disease by polymerase chain reaction through amplification of Y-chromosome specific sequences in order to differentiate male from female.

PGT-A (formerly known as PGS- preimplantation genetic screening for aneuploidy) makes it possible to analyze all 24 chromosomes (22 autosomes and both sex chromosomes) and select viable euploid embryos to increase pregnancy rates, especially in women of

Критерии <i>Criteria</i>	Брой пациенти <i>Number of patients</i>
Напреднала възраст <i>Advanced age</i>	11 (61.1 %)
Спонтанни аборти <i>Miscarriages</i>	4 (22.2 %)
Доказани генетични заболявания <i>Genetic disease</i>	3 (16.7 %)

Табл. 1: Разпределение на пациентите по критерии, налагащи провеждането на PGS.

Table 1: Distribution of cases according to inclusion criteria

ки 24 хромозоми (22 автосоми и двете полови хромозоми - X и Y) и селекцията на жизнеспособни еуплоидни ембриони, които да увеличат процента реализирани бременности, най-вече при жени в напреднала репродуктивна възраст, с повтарящи се спонтанни аборти, генетични нарушения и повтарящи се неуспешни ин витро процедури (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2011). Все по-честото прилагане на този тип изследване, вероятно ще намали времето за постигане на успешна бременност, което е от изключителна важност за двойки в напреднала възраст (Romanelli *et al.*, 2019).

Секвенирането от ново поколение (Next generation sequencing – NGS) се отнася към групата на методите за масивно паралелно секвениране, които позволяват едновременно обработване на изключително голям брой ДНК фрагменти (Sciorio *et al.*, 2020). NGS може да се прилага при секвенирането както на целия геном, така и на отделни екзони, геномни участъци и митохондриални ДНК секвенции (Yohe & Thyagarajan, 2017). Понастоящем новогенерационното секвениране намира широко приложение в предимплантационният

advanced age, recurrent miscarriages, genetic disorders and recurrent unsuccessful in vitro fertilization procedures (Gutiérrez-Mateo *et al.*, 2011). The increasing use of this type of genetic testing is likely to reduce the time to achieve a successful pregnancy, which is crucial for elderly couples (Romanelli *et al.*, 2019).

Next generation sequencing (NGS) belongs to the group of massively parallel sequencing methods that allow parallel processing of an extremely large number of DNA fragments (Sciorio *et al.*, 2020). NGS can be used to sequence whole genome, individual exons, genomic regions and mitochondrial DNA sequences (Yohe & Thyagarajan, 2017). Currently, NGS is widely used in preimplantation genetic screening due to high sensitivity of the method, high productivity and the small amount of genetic material required (about 1 nM).

Most NGS platforms are based on the “sequencing by synthesis” principle, which allows multiple individual DNA templates to



Figure 1: Time - lapse incubator CCM, iBIS, Astec, Japan.

генетичен скрининг поради високата чувствителност на метода, висока производителност и малко количество генетичен материал, което е необходимо (около 1 nM).

По-голямата част от платформите за новогенерационно секвениране се основават на принципа „секвениране чрез синтез“ (sequencing by synthesis), което позволява прочитане на множество отделни ДНК матрици едновременно и в същото време позволява получаването на огромно количество ДНК секвенции с размери до 500 бази двойки (Yan *et al.*, 2014).

Чрез този метод могат да бъдат идентифицирани и небалансирани транслокации, сегментни анеуплоидии, дори ниски степени на мозаицизъм (20 %) и *de novo* възникнали мутации (Friedenthal *et al.*, 2018).

В настоящото изследване се сравняват резултатите от стандартната морфологична оценка на ембриони, достигнали до стадий бластоцист, с тези, получени след предимплантационен генетичен скрининг чрез новогенерационно секвениране (NGS - *next generation sequencing*).

#### Материали и методи

В изследването бяха включени 18 жени на възраст между 25 и 44 години. Анализирахме 63 успешно биопсирани ембриона, проследени и морфологично оценени на стадий бластоцист и генетично скринирани за анеуплоидии.

Критериите за включване на двойките в проучването бяха (Табл. 1): доказани генетични заболявания (n = 3), напреднала репродуктивна възраст ( $\geq 34$  години) (n = 11) и повтарящи се спонтанни аборти (n = 4).

be read simultaneously and at the same time allows a huge amount of DNA sequences up to 500 base pairs (Yan *et al.*, 2014).

This method can be used to identify unbalanced translocations, segmental aneuploidies, even low-level mosaicism and *de novo* mutations (Friedenthal *et al.*, 2018).

In the present study we have compared the results from standard morphological evaluation of embryos that have reached the blastocyst stage with those obtained after preimplantation genetic screening by *next generation sequencing* (NGS).

#### Materials and methods

The study includes 18 women aged 25 to 44 years. We analyzed 63 successfully biopsied embryos, that were morphologically assessed at the blastocyst stage and genetically screened for aneuploidies.

Inclusion criteria were (Table 1): known genetic disease (n = 3), advanced reproductive age ( $> 34$  years) (n = 11) and recurrent miscarriages (n = 4).

Genetic analysis was performed using DNA isolated after trophectoderm biopsy at blastocyst stage.

All embryos were cultured and analyzed by TLS (CCM iBIS, Astec, Japan) (Figure 1) at 37°C, 6 % CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> in a single-step culture media (SAGE 1-step®, Origio, Cooper Surgical, USA) until the blastocyst stage.



Фиг. 2: Снимка на излюпена бластоциста с най-добро качество на ICM и ТЕ (снимка- ембриологична лаборатория МЦ „РепроБиоМед“)

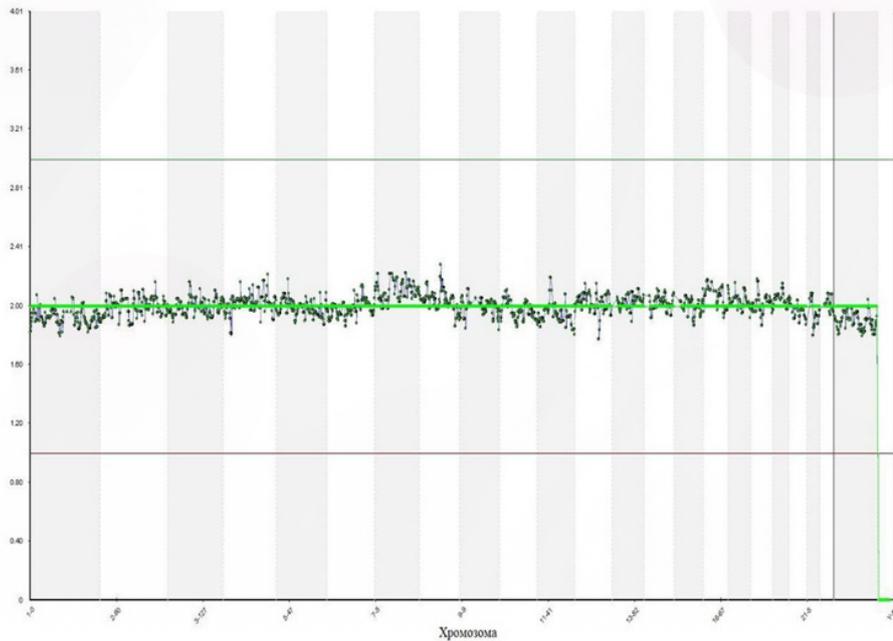
Figure 2: Hatching blastocyst with the best quality of ICM and TE (photo- embryological laboratory MC “Reprobiomed”)

	Степен <i>Grade</i>	Оценка <i>Rating</i>	Характеристика <i>Description</i>
<b>Етап на развитие на бластоциста</b>  <i>Stage of blastocyst development</i>	1	Ранна бластоциста <i>Early blastocyst</i>	Бластоцел < 50% от обема на ембриона <i>early blastocyst)</i> <i>Blastocoel cavity less than half the volume of the embryo</i>
	2	Бластоциста <i>Blastocyst</i>	Бластоцел напълно заемащ обема на ембриона (> 50%) <i>Cavity completely filling the embryo</i>
	3	Експандирала бластоциста <i>Expanded blastocyst</i>	Бластоцелът значително е нарастнал и разтегнал зона пелуцида; <i>Cavity larger than the embryo with thinning of the shell</i>
	4	Излюпена бластоциста <i>Hatching blastocyst</i>	Частично или изцяло излязъл от зона пелуцида бластоцист; <i>Hatched out/hatching out of the shell</i>
<b>Вътрешна клетъчна маса</b>  <i>Inner cell mass (ICM)</i>	1	Добър <i>Good</i>	Видима, лесно различима, с множество плътно подредени клетки <i>Prominent, easily discernible, with many cells that are compacted and tightly adhered together</i>
	2	Задоволителен <i>Fair</i>	Видима, с множество свободно групирани клетки <i>Easily discernible, with many cells that are loosely grouped together</i>
	3	Лош <i>Poor</i>	Трудно различима, наличие на малък брой клетки <i>Difficult to discern, with few cells</i>
<b>Трофоектодерма</b>  <i>Trophoectoderm (TE)</i>	1	Добър <i>Good</i>	Множество клетки, формиращи кохезивен епител <i>Many cells forming a cohesive epithelium</i>
	2	Задоволителен <i>Fair</i>	Няколко клетки, формиращи рехав епител <i>Few cells forming a loose epithelium</i>
	3	Лош <i>Poor</i>	Много малко на брой клетки <i>Very few cells</i>

Табл. 2: Консенсусна система за оценка на ембрионите в стадий бластоцист

Table 2: Consensus scoring system for blastocysts.

(Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011)



Фиг. 3: ДНК профил на еуплоиден ембрион. (Снимка - генетична лаборатория МЦ „РепроБиоМед“)  
 Fig. 3: DNA profile of an euploid embryo. (Graph – OTT, ReproBioMed MC)

За провеждането на генетичния анализ бе използвана ДНК, получена в резултат на трофектодермална биопсия, извършена на 5-6-ти ден след оплождането на ембрионите. Всички ембриони са култивирани и анализирани с помощта на TLS (CCM iBIS, Astec, Japan) (Фиг. 1) при 37°C, 6% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub> в едностъпкова среда (SAGE 1-step®, Origio, Cooper Surgical, USA) до достигане на стадий бластоцист.

**Морфологичната оценка** бе направена на база Истанбулския консенсус от 2011 г. въз основа степента на развитие на бластоцистата и качеството на трофектодермалните клетки и вътрешната клетъчна маса (Табл. 2).

Предимлантационният генетичният скрининг (PGT-A, PGS) на включените в проучването ембриони, бе извършен с помощта на високорезолуционно секвениране, което дава възможност за едновременно откриване на нарушения в броя на хромозомите, както и балансирани преобразувания между тях.

В съответствие с протокола на производителя, изолираната ДНК от трофоектодермални клетки, се фрагментира на случаен принцип и се амплифицира, използвайки SurePlex DNA Amplification System (Illumina). Амплифицираната ДНК се използва за подготовка на пул от геномни библиотеки, след което всички библиотеки се разреждат до получаване на еднаква концентрация на ДНК (т.нар. нормализиране на библиотеките) с използване на VeriSeq DNA Library Prep Kit (Illumina). Създава се обща библиотека, която след подлагане

**The morphological assessment** of embryos was performed according to the Istanbul consensus (2011) based on the degree of blastocyst expansion and the quality of trophectoderm and inner cell mass.

Preimplantation genetic screening of the embryos included in this study was performed using high-resolution sequencing, which allows the simultaneous detection of changes in the number of chromosomes and balanced translocation between them.

According to the manufacturer's instructions, isolated DNA from TE cells was randomly fragmented and amplified using SurePlex DNA Amplification System (Illumina). The amplified DNA was used to prepare genomic libraries, which were further diluted to obtain the same concentration of DNA (so-called library normalization) using the VeriSeq DNA Library Prep Kit (Illumina). A common library was then created which was subjected to temperature denaturation and was sequenced using the MiSeq (Illumina) system. To analyze the results from sequencing, we used BlueFuse software (Illumina), which stores, analyzes and interprets the collected data. The software automatically provides information on the overall status of each embryo and each chromosome, including a qualitative assessment of the results.

## Results

The present study included 18 patients aged 25 to 44 years with a mean age of 34.5 years. The

на температурна денатурация, се секвенира чрез MiSeq платформа. За анализ на получените резултати от секвенирането, е използван BlueFuse™ софтуер (Illumina), който съхранява, анализира и интерпретира получените след секвенирането данни. Софтуерът автоматично предоставя информация относно цялостния статус на всеки ембрион и всяка хромозома, включително и качествена оценка на резултатите.

### Резултати

В настоящото изследване бяха включени 18 пациентки на възраст между 25 и 44 години със средна възраст 34.5 години. Пациентките бяха разделени в три възрастови групи: в група 1 бяха включени 5 жени на възраст между 25 и 30 години, в група 2 бяха включени 8 жени на възраст между 31 и 39 години, а в група 3 бяха включени 5 жени на възраст между 40 и 44 години.

Беше направена морфологична оценка на общо 63 излюпени бластоцисти на база критериите на Истанбулската конвенция от 2011 г., непосредствено преди биопсията им. Ембрионите бяха разделени в четири групи според стадия на развитие и качеството на ТЕ и ИСМ. Група 1 включваше ембриони с най-високо качество (4/1/1, 4/1/2, 4/2/1), група 2 - ембриони със средно качество (4/2/2), в група 3 бяха разпределени ембрионите с лоша морфология (4/3/3, 4/3/1, 4/1/3, 4/2/3, 4/3/2) и в група 4 бяха включени ембриони, които са колабирали и не могат да бъдат оценени.

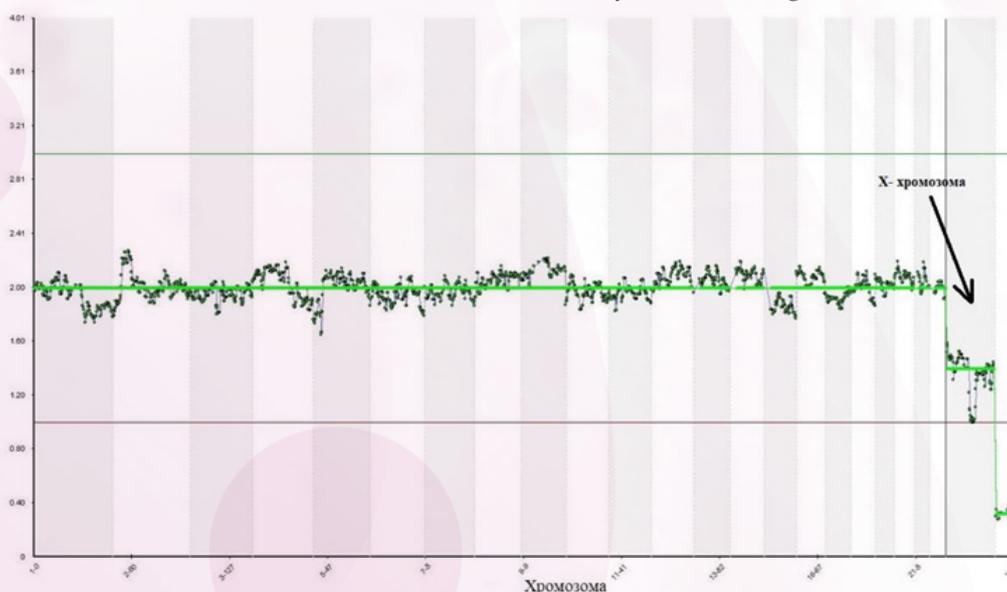
От изследвани чрез новогенерационно секвенирани ембриони 26 (41%) бяха еуплоидни (Фиг. 3), 29 (46%) бяха анеуплоидни и 8 неинтерпретируеми (13%).

patients were divided into three age groups: group 1 included five women between 25 and 30 years, group 2 included eight women between 31 and 39 years and group 3 included five women between 40 and 44 years.

A morphological assessment of a total of 63 hatched blastocysts was performed based on the 2011 Istanbul Convention criteria prior to their biopsy. Embryos were divided into four groups according to stage of development and TE and ICM quality. Group 1 included embryos of the highest quality (4/1/1, 4/1/2, 4/2/1), group 2 - embryos of fair quality (4/2/2), embryos with poor morphology were distributed in group 3 (4/3/3, 4/3/1, 4/1/3, 4/2/3, 4/3/2), and group 4 included embryos that collapsed and could not be evaluated.

From all NGS analyzed embryos twenty-six were euploid (41%) (Fig. 3), twenty-nine were aneuploid (46%) and eight were uninterpretable (13%). The most common chromosomal abnormalities were monosomies (48%) (Fig. 4), followed by trisomies (31%) and a combination of monosomies and trisomies (21%). Of all 29 aneuploid embryos, twenty-eight (97 %) contained autosomal aneuploidies and only one embryo had sex chromosome monosomy (3%). The most common chromosomal aneuploidies affected chromosomes 11, 13, 21, 22, responsible for 52% of all cases.

Of all euploid embryos, 65% received a grade 1 for the quality of the inner cell mass. 39% of aneuploid embryos received a grade 2 for the quality of the ICM. Grade 3 for ICM was given to 17% of aneuploid embryos, and only 1 (5%) euploid embryo received a grade of 3 for ICM. (Fig. 5)



Фиг. 4: ДНК профил на ембрион с монозомия X (45, X0). (Снимка - МЦ „РепроБиоМед“).  
Fig. 4: DNA profile of an embryo with monosomy X (45, X0). (Graph – OTT, ReproBioMed MC)



Фиг. 5: Съответствие между качеството на ICM и хромозомния статус на ембрионите.  
 Fig. 5: Correlation between the quality of ICM and ploidy of the embryos.

От всички изследвани ембриони с интерпретируеми резултати, при 29 (53%) бяха установени бройни хромозомни аномалии. Най-често срещани бяха монозомиите (48%), последвани от тризомии (31%) и комбинация от монозоми и тризомии (21%). В кохортата на анеуплоидните ембриони 28 (97%) съдържаха автозомни анеуплоидии и само при 1 ембрион (Фиг. 4) се наблюдаваше анеуплоидия на половите хромозоми (3%). Най-честите аберации засягаха хромозоми 11, 13, 21, 22, отговорни за 52% от всички анеуплоидии.

От всички euploidни ембриони, 65% са получили оценка 1 за качеството на вътрешната клетъчна маса. 39% от анеуплоидните ембриони са получили оценка 2 за качеството на вътрешната клетъчна маса. Най-лоша оценка 3 за ICM са получили 17% от анеуплоидните ембриони, а само 1 (5%) euploidен ембрион е получил оценка 3 за ICM. (Фиг.5)

От всички euploidни ембриони, 73% са получили най-висока морфологична оценка за качеството на TE. 48% от всички анеуплоидни ембриони са получили оценка 1 за качеството на TE. Нито един от euploidните ембриони не е получил оценка 3 за качеството на TE. (Фиг.6)

### Дискусия

В исторически план, стандартната морфологичната оценка е един от най-широко прилаганите подходи за селекция на ембриони за последващ трансфер (Minasi *et al.*, 2016). Освен морфологичното качество на ембрионите, от важност е и техният генетичен статус. Ако един ембрион е морфологично здрав и качествен, това не може да гарантира, че той със сигурност е и генетично здрав.

Анеуплоидията е една от основните причини за неуспехите в процедурите по асистирана репро-

Of all euploid embryos, 73% received the highest morphological grade for TE quality. 48% of all aneuploid embryos received a grade 1 for TE quality. None of the euploid embryos received a grade 3 for TE quality (Fig. 6).

### Discussion

Historically, standard morphological assessment has been one of the most widely used approach to select embryos for transfer (Minasi *et al.*, 2016). In addition to the morphological quality of embryos, their genetic status is also important. If an embryo is morphologically well structured and of good quality, this cannot guarantee that it is also genetically healthy.

Aneuploidy is one of the main reasons for failures in assisted reproduction procedures, as it reduces the chances of developing viable embryos and increases the risk of miscarriage. Therefore, over the years it has been necessary to introduce new methods for prenatal diagnosis. One of these methods is preimplantation genetic screening, which can perform a whole genome screening of all 23 chromosome pairs and transfer an euploid embryo.

In our study, we included two different methods of embryo selection for transfer. Morphological evaluation of all 63 embryos that reached the blastocyst stage, was performed according to the Istanbul Consensus, 2011 and then, applying preimplantation genetic screening (PGT-A/PGS) by new generation sequencing (NGS), we compared the results of the two analyzes.

Usually, on day 5/6 of embryo development, the stage of blastocyst hatching is reached and, as a rule, only those embryos that are of very good or



Фиг. 6: Съответствие между качеството на ТЕ и хромозомния статус на ембрионите.  
 Fig. 6: Correlation between the quality of TE and ploidy of the embryos.

дукция, тъй като намалява шансовете за развитие на жизнеспособни ембриони и увеличава риска от спонтанни аборти. Поради това, през годините се е наложило въвеждането на нови методи за пренатална диагностика. Един от тези методи е предимплантационния генетичен скрийнинг, благодарение на който може да се направи цялостен геномен анализ на всички 23 хромозомни двойки и да се трансферира еуплоиден ембрион.

В нашето проучване включихме два различни метода за подбор на ембриони за последващ трансфер. Беше извършена морфологична оценка на всички 63 ембриони, успели да достигнат до стадий бластоцист съгласно Консенсусът от Истанбул, 2011 г., след което, прилагайки предимплантационен генетичен скрийнинг (PGS) чрез новогенерационно секвениране (NGS), сравнихме резултатите от двата анализа.

Обичайно, на ден 5/6 от развитието ембрионите достигат до стадий излюпваща се бластоциста и по правило се биопсират само тези, които са с много добро или задоволително (средно) морфологично качество – в настоящото проучване приблизително 77% от всички оценявани ембриони. Съвсем очаквано, бе установено, че е налице връзка между морфологичната оценка на бластоцистите (както по отношение на ICM, така и по отношение на ТЕ) и еуплоидността.

Резултатите сочат, че ако морфологично оценените бластоцисти са получили оценка 1 или 2, вероятността те да са еуплоидни е най-голяма. Почти всички с оценка 3, са били анеуплоидни. Тези резултати корелират с предходни подобни проучвания (Capalbo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018). Все пак, трябва да се има предвид, че тази корелация е относително слаба. Беше установено, че голяма

satisfactory (average) morphological quality are biopsied - in the present study approximately 77% of all embryos evaluated. Unsurprisingly, there was an obvious link between morphological assessment of blastocysts (both ICM and TE) and euploidy.

The results show that if morphologically assessed blastocysts received a score of 1 or 2 (for TE and ICM), they are most likely to be euploid. Almost all with a score of 3 were aneuploid. These results correlate with previous similar studies (Capalbo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018). However, it should be borne in mind that this correlation is relatively weak. It has been found that a large proportion (about 45%) of high-quality blastocysts are also aneuploid. The age of the woman, as already pointed out, is a very limiting factor in terms of success in assisted reproduction procedures, mostly due to the increasing incidence of aneuploidies in the later stages of women's reproductive life.

In conclusion, regardless of the possibilities provided by the new time-lapse imaging culture systems for assessing the morphology and morphokinetics of embryos, their selection for ET only by morphological criteria is not enough. This is especially true for women of advanced reproductive age (> 38 years), as well as in those with multiple previous miscarriages or failures after IVF. PGT-A is practically mandatory in cases of balanced chromosomal rearrangements in one of the partners.

част (около 45%) от висококачествените бластоцисти са анеуплоидни. Възрастта на жената, както вече бе изтъкнато, е силно лимитиращ фактор по отношение на успеваемостта от процедурите по асистирана репродукция, най-вече поради нарастващата честота на анеуплоидиите в по-късните етапи от репродуктивния живот на жените. В заключение, независимо от възможностите, които ни предоставят новите системи за култивиране с time-lapse imaging, за оценка на морфологията и морфокинетиката на ембрионите, селектиране-

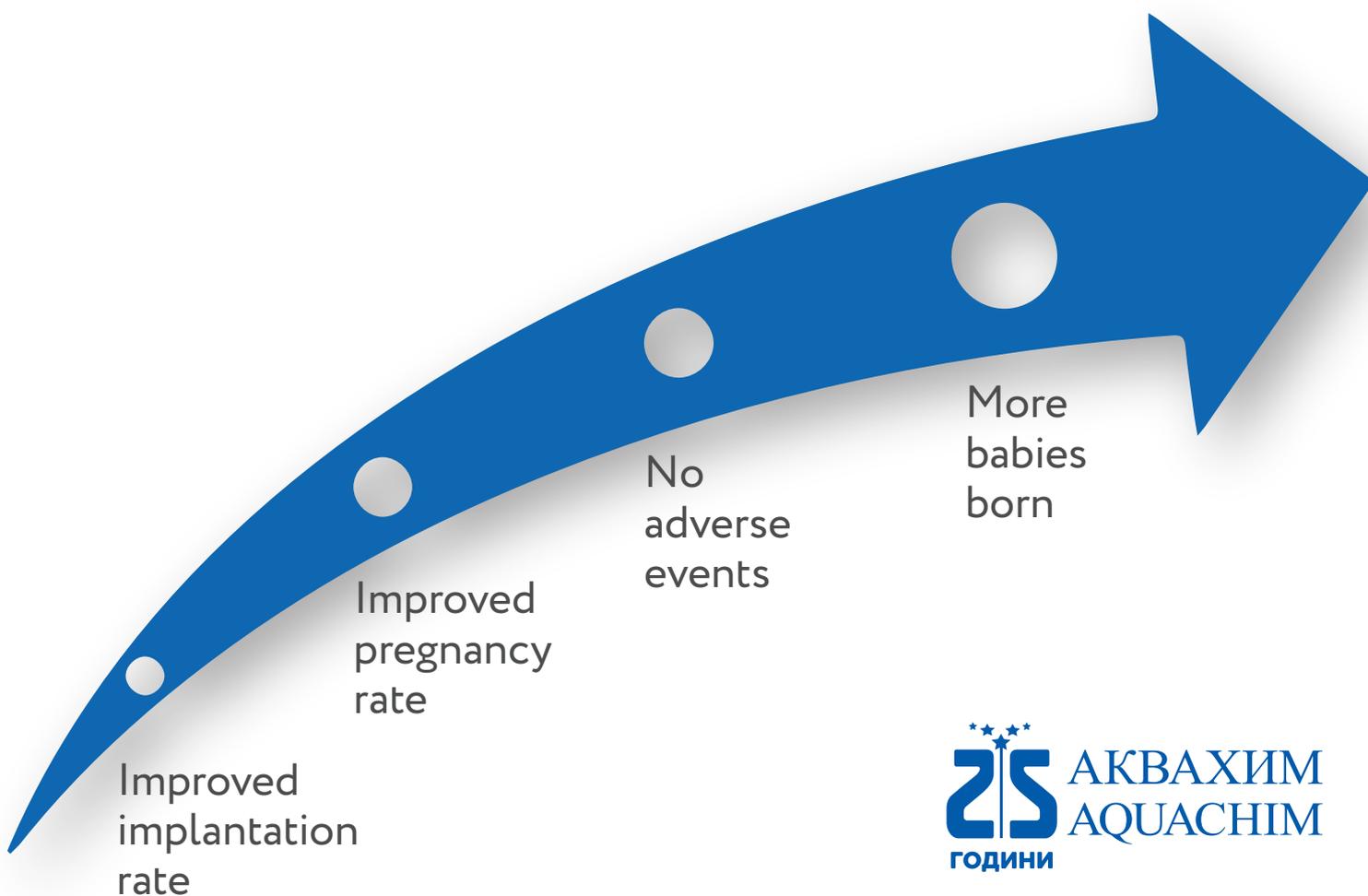
то им за ЕТ само по морфологични критерии не е достатъчно. Това е особено валидно при жени в напреднала репродуктивна възраст (> 38 г.), както и при такива с множество предходни спонтанни аборти или неуспехи след IVF. PGT-A е на практика задължително в случаите с балансиран хромозомни реорганизации при някой от партньорите.

### Литература

1. Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., Nagy, Z. P., & Ubaldi, F. M. (2014). Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(6), 1173–1181.
2. Crawford, G. E., & Ledger, W. L. (2019). In vitro fertilisation/intracytoplasmic sperm injection beyond 2020. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 126(2), 237–243.
3. Dahdouh, E. M., Balayla, J., Audibert, F., Wilson, R. D., Brock, J. A., Campagnolo, C., Carroll, J., Chong, K., Gagnon, A., Johnson, J. A., MacDonald, W., Okun, N., Pastuck, M., & Vallée-Pouliot, K. (2015). *Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening*. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 37(5), 451–463.
4. Fesahat, F., Montazeri, F., & Hoseini, S. M. (2020). Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 49(5), 101723.
5. Fragouli, E., Alfarawati, S., Spath, K., & Wells, D. (2014). Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. *Molecular Human Reproduction*, 20(2), 117–126.
6. Friedenthal, J., Maxwell, S. M., Munné, S., Kramer, Y., McCulloh, D. H., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2018). Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 109(4), 627–632.
7. Gutiérrez-Mateo, C., Colls, P., Sánchez-García, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Wells, D., & Munné, S. (2011). Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and Sterility*, 95(3), 953–958.
8. Irani, M., O'Neill, C., Palermo, G. D., Xu, K., Zhang, C., Qin, X., Zhan, Q., Clarke, R. N., Ye, Z., Zaninovic, N., & Rosenwaks, Z. (2018). Blastocyst development rate influences implantation and live birth rates of similarly graded euploid blastocysts. *Fertility and Sterility*, 110(1), 95–102.e1.
9. Kim, M. K., Park, J. K., Jeon, Y., Choe, S. A., Lee, H. J., Kim, J., Chang, E. M., Kim, J. W., Lyu, S. W., Kim, J. Y., Kwak, I. P., Lee, W. S., & Yoon, T. K. (2019). Correlation between morphologic grading and euploidy rates of blastocysts, and clinical outcomes in in vitro fertilization preimplantation genetic screening. *Journal of Korean Medical Science*, 34(4), 1–11.
10. Kong, G. W. S., Ma, Y., Ou, J., Kwok, Y. K. Y., Wang, W., Yeung, Q. S. Y., Wong, C. K. M., Li, Q., Xu, W., Lu, W., Li, H., Li, T. C., & Choy, K. W. (2017). Validation of a high-throughput and robust technique: BACs-on-beads assay (KaryoLite BoBs) for pre-implantation aneuploidy screening. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(4), 514–520.
11. Minasi, M. G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M. T., & Greco, E. (2016). Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: A consecutive case series study. *Human Reproduction*, 31(10), 2245–2254.
12. Nagaoka, S. I., Hassold, T. J., & Hunt, P. A. (2012). Human aneuploidy: Mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 493–504.
13. Romanelli, V., Poli, M., & Capalbo, A. (2019). Preimplantation genetic testing in assisted reproductive technology. *Panminerva Medica*, March, 30–41.
14. Sciorio, R., Tramontano, L., & Catt, J. (2020). Preimplantation genetic diagnosis (PGD) and genetic testing for aneuploidy (PGT-A): status and future challenges. *Gynecological Endocrinology*, 36(1), 6–11.
15. Storr, A., Venetis, C. A., Cooke, S., Susetio, D., Kilani, S., & Ledger, W. (2015). Morphokinetic parameters using time-lapse technology and day 5 embryo quality: a prospective cohort study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(7), 1151–1160.
16. Wang, A., Kort, J., Behr, B., & Westphal, L. M. (2018). Euploidy in relation to blastocyst sex and morphology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(9), 1565–1572.
17. Yan, L. Y., Wei, Y., Huang, J., Zhu, X. H., Shi, X. D., Xia, X., Yan, J., Lu, C. L., Lian, Y., Li, R., Liu, P., & Qiao, J. (2014). Advances in preimplantation genetic diagnosis/screening. *Science China Life Sciences*, 57(7), 665–671.
18. Yohe, S., & Thyagarajan, B. (2017). Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 141(11), 1544–1557.
19. Zhao, J., Yan, Y., Huang, X., & Li, Y. (2020). Do the children born after assisted reproductive technology have an increased risk of birth defects? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 33(2), 322–333.

# EMBRYOGLUE®

Implantation promoting medium for  
increased take-home baby rate



 **AKVAXIM  
AQUACHIM  
ГОДИНИ**

AKVAXIM АД  
1582 София, България  
бул. "Проф. Цветан Лазаров" 83  
тел. +359 2 807 5044  
факс +359 2 807 5050  
моб. +359 88 866 0226  
[www.aquachim.bg](http://www.aquachim.bg)



*Уважаеми колеги,*

След проведено на 30.09.2021 г. редовно събрание на Управителния съвет на Българската асоциация по репродуктивна човешка ембриология (БАРЧЕ) бе свикано общо-отчетно-изборно събрание (ДВ, бр. 84/08.10.2021), което се проведе на 10.12.2021 г. от 17 ч. в София.

След установяване на кворума, събранието беше открито от Проф. Пламен Тодоров с приветствени думи и кратък доклад за дейността до момента. Д. Гуленова представи финансов отчет. И двата доклада се приеха единодушно.

**Бяха взети с консенсус следните решения:**

- Беше освободен от длъжност досегашния Председател на Асоциацията – Проф. Пламен Тодоров;
- За нов Председател на Асоциацията бе избран Д-р Георги Иванов Николов.
- Секретар на Асоциацията остана Д-р Д. Гуленова, д.б.
- Запази се състава на досегашния Управителен съвет:
  - Д-р Георги Николов – Председател
  - Д-р Диана Гуленова, д.б. – Секретар
  - Проф. Пламен Тодоров, д.б.н. – Член
  - Д-р Георги Вакрилов – Член
  - Д-р Десислава Тачева-Владиминова, д.б. – Член
- Да се направят постъпки за смяна на седалището на БАРЧЕ, а именно на нов адрес: София, кв. Овча Купел, ул. „Бойчо Огнянов“ 28 - МЦ „РепробиоМед“.
- Да се промени редакционната колегия на сп. „Ембриология“, като за главен редактор бе избран Д-р Георги Николов, а от редакционната колегия с прискърбие бе отписан Dr Wilfried Feichtinger, който за съжаление почина на 3 юни 2021 г. след дълга борба с рака.
- Бе запазен досегашния размер на членския внос – 120 лв.
- Асоциацията запазва и досегашния профил на дейността си.

По предложение на Проф. П. Тодоров – се призова за по-активно участие на членовете и техните колеги по места в подготовката и издаването на сп. „Ембриология“ с написване и своевременно предаване на нови статии, които да бъдат двуезични (на Български и Английски език).

Поради изчерпване на дневния ред събранието се закры от Проф. Тодоров в 19 ч. и се пристъпи към по-приятни занимания, включващи задушевна атмосфера, вкусна храна и подходящи за нея напитки (с любезната подкрепа на фирма ELTA 90).

Документацията, относно направената промяна в управлението на Асоциацията е входирана в Агенция по вписванията.

*От УС на БАРЧЕ*



**Вилфред Файтингер  
(1950-2021)**

**САТЕЛИТЕН НАУЧЕН СИМПОЗИУМ  
„СТВОЛОВИТЕ КЛЕТКИ – НОВ ХОРИЗОНТ ПРЕД  
ПЕРСОНАЛИЗИРАНАТА МЕДИЦИНА“**

**4-5 НОЕМВРИ 2022, СОФИЯ  
АУЛА на Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“**

4 ноември 14.00-19.00 часа: Научна сесия в участието на водещи български и чуждестранни учени

**Основни направления**

- **Стволовите клетки – съвременни реалности и перспективи**
- **Омикс технологиите за развитието на персонализираната медицина**
- **Геномно редактиране на клетъчни продукти за хуманна употреба**
- **Социални предизвикателства\ и нови възможности**

5 ноември 10.00-13.00 часа: Представяне на новите проекти с участието на Софийски Университет

- **EATRIS – Plus** H2020 INFRADEV-3-2019 Grant No 871096
- **Cost Action CA21151** "GENERATION OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FROM HAPLO-SELECTED CORD BLOOD SAMPLES"

**Организира се с финансовата подкрепа на МОН за Научна инфраструктура „Клетъчни технологии в биомедицината“ от НПКНИ и H2020 INFRADEV-3-2019 Grant No 87109 от Националното председателство на ЕАТРИС – България съвместно с Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“**

## 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.

Е-mail: gnikolov@yahoo.com

plamen.ivf@gmail.com

Тел.: 088 870 3786 (д-р Г. Николов)

088 821 7095 (П. Тодоров)



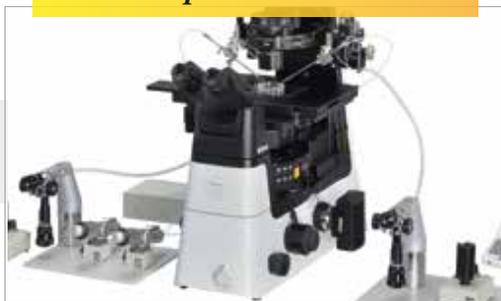
## Осмели се да поискаш повече

Японските компании Nikon и Narishige разработиха високопрецизна, компактна микроманипулаторна система в отговор на нарастващите изисквания на пазара за ICSI системи. Комбинацията между моделите Ti2 и NTX позволява да създадете оптималната конфигурация, отговаряща на вашите специфични нужди.

*Компактен и стабилен дизайн*



*Джойстик за превъзходна оперативност*



*Плавно движение без отклонение на микроелектродите*



### Характеристики

**Намаленото разстояние** между микроманипулатора и микроелектродния връх увеличават **стабилността**.

Вграден в основата **ъгломер** осигурява точна работа под ъгъл.

Комбиниран 3D манипулатор с моторно задвижване за груба настройка и 3D манипулатор с маслено-хидравлично фино задвижване.

Оборудван с **възвратен механизъм** на микроелектродите за лесна смяна на петритата.

Full solution for  
effective biopsy procedures



# SATURN 5 ACTIVE

Laser - assisted hatching of frozen embryo transfer cycles

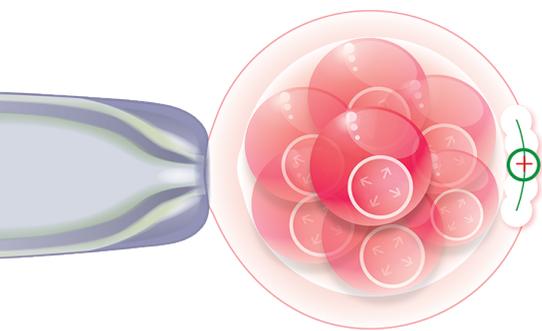
Laser - assisted immotile sperm selection

Trophectoderm/ Blastocyst biopsy for PGS

Laser - assisted ICSI

Polar body biopsy for PGD

Blastomere biopsy for PGD



За демонстрация във Вашата клиника  
се свържете с нас: [www.ivd.bg](http://www.ivd.bg)

