



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ**

Ирена Цветанова Антонова

**Човешките овоцити при асистирана репродукция –
систематизация на факторите, влияещи върху
качеството, изработване на методика за оценка и анализ
на техники за подобряване на оплождането**

АВТОРЕФЕРАТ

Варна 2024 г.

Дисертационният труд съдържа 170 страници, в които са включени 64 цветни фигури и 33 таблици. Библиографията обхваща 268 литературни източника, от които 19 на кирилица и 249 на латиница. Публикациите, свързани с дисертационния труд са 9.

Проучванията по дисертационни труд са извършени в САГБАЛ „Д-р Щерев“, гр. София.
Дисертационният труд е допуснат до публична защита на Катедрен съвет на Катедра Биология на 05.04.2024 г.

Научно жури:

Вътрешни членове:

1. Доц. Галина Алексиева Янева, д.б.
2. Проф. Диана Георгиева Иванова, д.б.н.

Резервен вътрешен член: доц. Оскан Бахидинов Тасинов, д.б.

Външни членове:

1. Проф. Таня Николова Тимева, д.м.
2. Доц. Таня Владимирова Милачич, д.б.
3. Доц. Иван Миладинов Бочев, д.б.

Резервен външен член: Проф. Иванка Исталианова Димова, д.м.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 28.06.2024 г. от ч. в онлайн платформата на Медицински Университет – Варна, гр. Варна, ул. „Марин Дринов“ № 55.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ-Варна

www.mu-varna.bg

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА БИОЛОГИЯ

Ирена Цветанова Антонова

**Човешките овоцити при асистирана репродукция –
систематизация на факторите, влияещи върху качеството,
изработване на методика за оценка и анализ на техники за
подобряване на оплождането**

ДИСЕРТАЦИЯ

За присъждане на научна и образователна степен “доктор”

Професионално направление 4.43. “Биологически науки”

Докторска програма: “Медицинска биология”

Научни ръководители

Проф. Добри Лазаров Иванов, д.б.

Доц. д-р Мария Величкова Юнакова, д.м.

Варна, 2024 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- ESHRE - Европейска Асоциация по Човешка Репродукция и Ембриология
- PRP - Platelet -rich plasma
- ИТМ - индекс на телесната маса
- ИИ - изкуствен интелект
- FSH - фоликуло стимулиращ хормон
- ICSI - intracytoplasmic sperm injection
- АРТ - асистирани репродуктивни технологии
- КОХ - контролирана овариална хиперстимулация
- МII - метафаза II
- SV - Spindle view
- ФП - пункция на фоликули
- СОС - кумулузно-ооцитни комплекси
- ChatGPT - Chat Generative Pre-trained Transformer
- IVF - ин витро оплождане
- ПЯО - преждевременно яйчниково отпадане
- КБ - клинични бременности
- ЕТ - ембриотрансфер
- CR - Cancellation rate
- ТВБ - тазово възпалителна болест

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През 2022 година светът приветства раждането на 10 милионното бебе, заченато в лабораторни условия чрез методите на асистирана репродукция. Само няколко години по-рано, през 2018 г. пък беше отбелязана една много важна кръгла годишнина – 40 години от раждането на първото ин витро бебе Луиз Браун през 1978г. За изминалите повече 4 десетилетия родените бебета с помощта на асистирани репродуктивни технологии нараства с бързи темпове всяка следваща година и в някои държави те вече са над 5% от общия брой родени деца годишно. На срещата на ESHRE (Европейска Асоциация по Човешка Репродукция и Ембриология) през 2023г в Копенхаген бяха изнесени данни, че в световен мащаб годишно се извършват над 2 милиона ин витро процедури, от които се раждат над половин милион деца.

Много неща са се променили, откакто преди 40 години Едуардс и Стептоу за пръв път успешно са аспирирали яйцеклетка, оплодили в лабораторни условия и трансферирали обратно в матката. В днешни дни ембриологията е една от най-модерните и най-бързо развиващите се дисциплини, а съвременните ембриологични лаборатории са оборудвани с високо технологична апаратура. Ежегодно се провеждат десетки научни форуми както на обща, така и на специализирана тематика, където се представят най-новите открития в различните направления на ембриологията - андрологията, криобиологията, генетичната диагностика и инженерство, а също и най-новите разработки на компаниите, произвеждащи лабораторно оборудване, хранителни среди и специализирана техника.

Благодарение на бурното развитие на репродуктивните асистирани технологии, в последното десетилетие се наложи индивидуалният подход като метод за лечение на двойките с инфертилитет. Персонализираната медицина предполага прилагане на разнообразни методи и техники за лечение в зависимост от конкретната причина за стерилитет. Най-широко поле за разработване и прилагане на тези допълнителни методики се открива в ембриологичната част от ин витро цикъла, където се прилагат върху сперматозоиди, яйцеклетки и ембриони с цел подобряване на тяхното качество, оплодителна способност и имплантационен потенциал.

При сперматозоидите се прилагат различни методи, които целят селекция на такива с възможно най-оптимална морфология, най-нисък процент фрагментирана ДНК и най-добра подвижност

За ембрионите опциите за допълнително въздействие са най-разнообразни. Разработени са множество хранителни среди, специализирана апаратура за наблюдение и манипулиране, тестове за генетичен анализ, както и най-различни други методики с цел подобряване на качеството им и висок шанс за имплантация.

При яйцеклетките възможностите са доста по-лимитирани, най-вече поради силно ограниченият брой гамети, които могат да се добият в един стимулационен цикъл.

Именно повишаващата се средна възраст на жените, търсещи лечение чрез асистирана репродукция се очертава като основен лимитиращ фактор и причина за застой и плато в процента на постигнати успешни бременности и живи раждания в последните години.

Това кара множество клинични и научни екипи от цял свят да фокусират своя поглед върху методи за по-прецизен анализ на човешките овоцити, разработка на техники за подобряване на качеството им, внедряване на редица открития и нововъведения от съвременната медицина като манипулации чрез стволови клетки, PRP (pellet-rich plasma), митохондриален трансфер, растежни фактори, работа с изкуствен интелект.

Част от прилаганите методики са многократно доказани, утвърдени и вече рутинно са въведени в клиничната практика, друга част са все още в процес на клинични проучвания и всяка година техният брой нараства.

Търсенето на път към по-качествени гамети за репродукция е предизвикателство, което ще бъде основният актуален фокус през следващите години от развитието на съвременната репродуктивна медицина и ембриология.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

II.1 ЦЕЛ

ЦЕЛТА на дисертационния труд е да се направи обстоен анализ на акуратността на факторите, влияещи върху качеството и фертилизационния потенциал на човешките яйцеклетки; да се изведе графична визуализация, да се предложи оптимална система за неинвазивна морфо-физиологична оценка на женските гаметети с висока предиктивна стойност за последващото оплождане, развитие на получените ембриони и имплантация и да се изследват допълнителни техники за подобряване на фертилизационния потенциал.

II.2 ЗАДАЧИ

1. Да се изследва влиянието на пациент-специфични фактори върху броя, зрелостта, оплодителния и имплантационен потенциал на яйцеклетките: възраст, индекс на телесна маса (ИТМ), тютюнопушене, серумни нива на фоликуло-стимулиращ хормон (FSH).
2. Да се изследва влиянието на някои заболявания - тазово-възпалителни болести, ендометриоза върху броя, зрелостта, оплодителния и имплантационен потенциал на яйцеклетките.
3. Да се изследва влиянието на някои лабораторни техники – intracytoplasmic sperm injection (ICSI) и криоконсервация върху броя, зрелостта, оплодителния и имплантационен потенциал на яйцеклетките.
4. Да се предложи систематизация на факторите, влияещи върху качеството на овоцитите, изведена в табличен вид на базата на анализ на литературни данни и да се предложи ново допълнение към класификацията за по-висока прецизност.
5. Да се предложи нов подход за систематизация на факторите, влияещи върху качеството на овоцитите, генериран посредством насочена работа с изкуствен интелект.
6. Да се предложи нова система за оценка на яйцеклетките, включваща както морфологичните характеристики, така и функционалните прояви по време на

оплождане с висока информативна и предиктивна стойност за оплождане, качество на получените ембриони и крайният изход от асистираните репродуктивни технологии (АРТ).

7. Да се анализира ефектът от прилагане на допълнителни лабораторни методики (асистирана овоцитна активация и поляризационна микроскопия) върху резултатите от оплождане и процентът постигнати клинични бременности.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

III. 1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

III.1. 1. Обща характеристика на работния материал

Клиничен контингент

За изпълнението на поставените задачи и постигането на набелязаната цел в проучването са включени 9816 пациентки, преминали цикъл лечение на инфертилитет със собствени яйцеклетки чрез контролирана овариална хиперстимулация за целите асистирана репродукция и са достигнали до фоликуларна пункция, в резултат на която са добити общо 67 187 яйцеклетки, обект на настоящото изследване.

Място на проучването

Проучването е проведено в ин витро отделението и ембриологичната лаборатория на САГБАЛ „Д-р Щерев“, гр. София в тясно сътрудничество с клинична лаборатория.

Период на проучването

Проучването е проведено в рамките на девет годишен период и включва преминалите за лечение чрез методите на АРТ през САГБАЛ „Д-р Щерев“ пациенти за периода от Януари 2013г. до Декември 2021г. Анализът има ретроспективен характер, като данните са извлечени посредством болничен компютърен софтуер - JOYSTICK healthcare management system („Смарт Софтуер Системс“ - сертифициран с ISO/IEC 27001:2017 и ISO 9001:2015). От януари 2017г. до декември 2020г. е проведено проспективно оценяване и проследяване на яйцеклетките, подложени на ICSI процедура с цел да се предложи оптимална система за морфо-физиологична оценка.

Единица на проучването

В проучването са включени всички яйцеклетки, добити от пациентки с индикация за лечение чрез асистирана репродукция и преминали през контролирана овариална хиперстимулация (КОХ), минимална стимулация или пункция на фоликули на естествен цикъл чрез таймиране на овулацията.

В зависимост от факторите, които се изследват и оценяват, включените в настоящото проучване пациентки и техните яйцеклетки са разпределени в няколко групи, като при всяка една от тях са решавани специфични задачи.

III. 1.2. Основни групи на работния материал

Фактори, влияещи върху качеството на яйцеклетките

По отношение на факторите влияещи върху качеството на яйцеклетките и анализ на тяхната акуратност, за всеки отделен фактор пациентките са разпределени в няколко групи, в които са изследвани среден брой добити яйцеклетки след фоликулярна пункция, среден брой зрели яйцеклетки, процент оплождане, процент канселирани цикли и брой клинични бременности.

Критерии за включване:

- Могат да бъдат оценени числено
- Има литературни данни за тяхното влияние
- Могат да бъдат разделени в различни категории
- Могат да бъдат сравнени с контролна група
- Имат установени референтни стойности
- Литературните данни за тяхното влияние са противоречиви или обект на дебат
- В периода на провеждане на опита са константна величина
- Резултатите могат да бъдат сравнени както помежду си в различните подкатегории, така и с контролна група
- Има достатъчен брой случаи, за да се направи реперзентативно изследване
- Данните могат да бъдат екстрапулирани от електронните медицински досиета чрез задаване на желаните параметри
- Всички пациентки при които е извършена пункция на фоликули в резултат на която са добити между 0 и 46 кумулулно-ооцитни комплекса
- Използване на собствени яйцеклетки за да бъде проследена корелацията между фактора и качеството на яйцеклетките
- Използване на донорски сперматозоиди за целите на оплождане
- Използване на партньорски сперматозоиди с нормални параметри (нормозооспермия) на пробата или леки до средни отклонения от нормата (лека до средна астенозооспермия, лека до средна олигозооспермия) и морфология над 3% по Kruger.
- Подписано информирано съгласие за обработка на лични данни от страна на пациентите
- Подписано информирано съгласие за провеждане на съответната манипулация от страна на пациентите

Исключващи критерии:

- Пациентки, при които е стопирана хормоналната стимулация, поради лош яйчников отговор, липса на фоликуларен растеж, тънка маточна лигавица и др.
- Пациентки, при които е настъпила спонтанна руптура на фоликулите непосредствено преди извършването на фоликуларната пункция
- Жени, донорки на яйцеклетки
- Тежки отклонения от спермалната проба в деня на фоликуларната пункция (тежка олигоастенозооспермия, некроспермия, криптозооспермия) и морфология под 3% по Kruger
- Сперматозоиди, добити от тестисите по хирургичен път
- Неподписано информирано съгласие

Възраст

С цел да се потвърди или отхвърли водещата роля на фактора възраст анализирахме медицинските досиета на 9816 пациентки, преминали през процедура по асистирана репродукция и достигнали до фоликуларна пункция. Според възрастовия фактор те са разделени на 4 групи, дефинирани от Европейският IVF мониторинг към Европейската Асоциация по човешка репродукция и ембриология - група 1: под 30 г.; група 2: 31-34 г.; 35-39 г.; група 4: над 40 г. (фиг. 1А).

Индекс на телесната маса (ИТМ)

За да се установи има ли отношение ИТМ към броя на добитите яйцеклетки и оплождането разделихме 4882 жени в 4 основни групи, определени според критериите на СЗО, 1995г. Групите са: група 1: ИТМ до 18,49; група 2: от 18,5 до 24,99; група 3: от 25 до 29,99 и група 4: над 30 ИТМ. За целта изчислихме ИТМ за всяка пациентка, за която има данни за възраст и тегло по формулата: $ИТМ = КГ/М^2$ (фиг. 1 В).

Тютюнопушене

Проучихме резултатите за 989 пациентки, при които са снети анамнестични данни дали пушат или не, за да се отчете има ли отражение върху броя и качеството на яйцеклетките при български жени, целящи бременност и употребяващи никотинови изделия по време на лечебния процес. В зависимост от това те са разделени на 2 групи: група 1: пушачи; група 2: непушачи (фиг. 1 С).

Базални нива на FSH

За да се констатира дали високите серумни нива на фоликуло-стимулиращия хормон, изследван в ранна фоликуларна фаза влияят сигнификантно върху качеството на овоцитите, бяха извлечени данните за 411 пациентки, които са изследвали посредством кръвен лабораторен тест стойностите на хормона FSH между 3ти и 5ти ден от менструалния цикъл преди да пристъпят към ин витро процедура. Според повечето литературни източници, анализиращи маркерите за изчерпване на яйчников резерв, се обособяват 3 групи в

зависимост от стойностите на хормона: група 1: до 8.5 IU/l, група 2: от 8.51 до 11.99 IU/l, група 3: над 12 IU/l (фиг. 1 D).

Влияние на ендометриозата

С цел да изучим връзката между патофизиологичният механизъм на заболяването и броя и качеството на яйцеклетките, разгледахме резултатите при пациентки, диагностицирани с ендометриоза и потърсили лечение чрез асистирана репродукция в клиниката. Събрани са данни за 472 жени с диагноза ендометриоза (фиг. 1E) като водещ фактор за инфертилитет в двойката. За контролна група са сравнени резултатите на 573 пациентски двойки с мъжки фактор.

Влияние на тубарния фактор

Анализирахме резултатите на 2201 пациентки, лекувани чрез ин витро процедура с диагноза тубарен стерилитет, за да се отчете как се отразяват различните възпалителни и адхезионни процеси върху овоцитите и тяхното качество. Като контролна група данните са сравнявани с такива на пациенти с мъжки фактор (фиг. 1F).

Влияние на ICSI процедурата

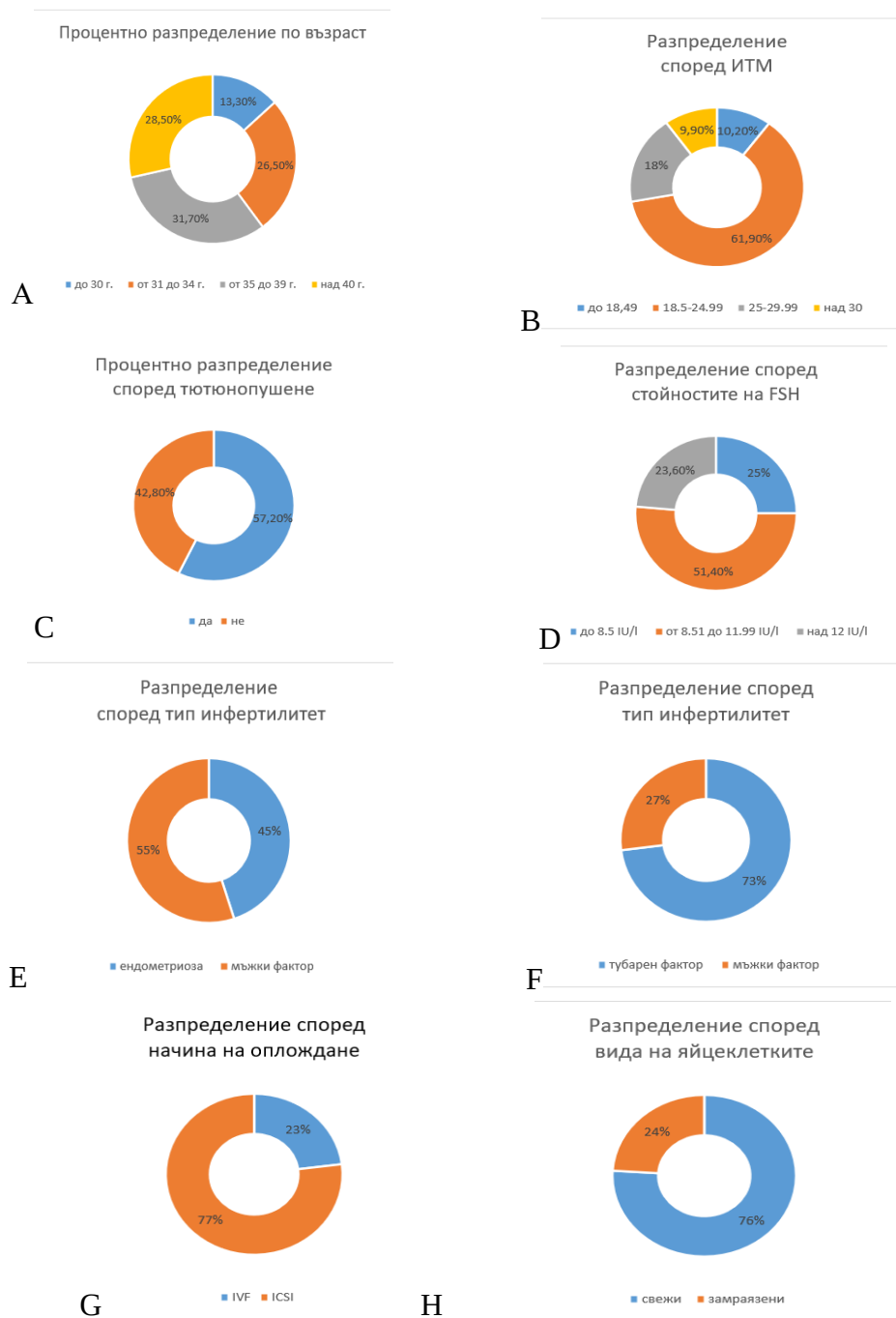
За да бъде окончателно да отхвърлена значимостта на ICSI процедурата като фактор, който е имал силно влияние в първоначалните години след своето въвеждане, изчислихме резултатите от оплождане при 2897 цикъла. В 666 от тях е приложена класическа IVF процедура, а при 2231 – манипулиране чрез ICSI (фиг. 1G).

Влияние на криоконсервацията

За да отчетем има ли все още клинично значение този фактор при българските пациенти, обобщихме данните за общо 213 цикъла – 1154 яйцеклетки. При 162 от циклите са използвани свежи яйцеклетки, а при 62 - размразени (фиг. 1H).

Управление на факторите и графично представяне

С цел да представим възможно най-пълна и нагледна обобщена картина на факторите, които имат отношение върху овоцитното качество, направихме интегративен анализ на научната литература, както и с изкуствен интелект (ИИ) с последващо екстапулиране на данните в удобен за използване табличен вид.



Фиг. 1. Разпределение на групите в зависимост от изследваните фактори

Оценка на качеството на яйцеклетките

Според препоръките за добра лабораторна практика на ESHRE, при извършване на процедура по оплождане чрез ICSI, е необходимо акуратно да бъде документирано качеството на яйцеклетките. В ежедневната работа на ембриолозите обаче това не е стандартна процедура и не се прилага рутинно. Няма и популярна и лесно приложима система за оценка на овоцитите. С цел да се предложи оптимална система за оценка на яйцеклетките, базирана не само на техните морфологични особености, но и на функционалните им характеристики, анализирахме данни от процедурите на 468 двойки пациенти. В продължение на 4-годишен период (януари 2017 г. - декември 2020 г.) бяха проспективно проследени и окачествени общо 4127 яйцеклетки. Само зрелите, метафаза II яйцеклетки (MII), които подлежат на оплождане чрез ICSI са оценени.

Техники, повишаващи оплодителния потенциал на яйцеклетките

Асистирана овоцитна активация

За да се установи ефектът от прилагане на калциева активация при български пациенти с предхождащи неуспешни опити, свързани с проблеми в оплождането са проследени данните от 337 зрели MII яйцеклетки в рамките на 74 ICSI цикъла.

С цел да се сравнят резултатите, циклите бяха разделени в 2 основни групи:

Група 1 – 30 цикъла, при които е използван Ca^{2+} ionophore като допълнителна методика за подобряване на резултатите от оплождането.

Група 2 – 44 цикъла с нисък процент или липсващо оплождане без приложена калциева активация – контролна група.

Визуализация на делителното вретено – Spindle view (SV)

За да установим дали визуализацията на делителното вретено с помощта на поляризационна микроскопия може да помогне за подобряване на резултатите, проследихме прилагането на тази методика при селектирана група пациентки с индикации за провеждането ѝ. Като контролна група използвахме жени, отговарящи на същите критерии, при които не е приложена тази допълнителна техника.

Група 1 – 24 пациентки на възраст ≥ 40 години с добити между 1 и 3 зрели яйцеклетки, подложени на ICSI процедура и приложен spindle view

Група 2 – 72 пациентки на възраст ≥ 40 години с добити между 1 и 3 зрели яйцеклетки, подложени на ICSI процедура без spindle view

III.2. МЕТОДИ

III.2.1. Методи за първичен подбор на пациенти:

Анамнестични методи

При първото си посещение в клиниката, пациентите попълват информационна карта, съдържаща базова информация за пациента, която след това се въвежда в електронната болнична система JOYSTICK healthcare management system („Смарт Софтуер Системс“ - ISO/IEC 27001:2017 и ISO 9001:2015) и се създава електронно медицинско досие на пациента. Всички последващи тестове, процедури и интервенции се документират в електронното досие.

Диагностични методи

Спрямо информацията, получена от първичната консултация се назначават допълнителни диагностични тестове за доуточняване на причините за инфертилитет:

Методи за образна диагностика

Методи за установяване на тубарна проходимост

Лабораторни методи

В клинична лаборатория (МДЛ „Цибалаб“ ЕООД) чрез кръвно пробовземане се изследват хормоните, имащи отношение към репродуктивната функция - базални серумни нива на FSH [mIU/ml], LH [mIU/ml], Prol [ng/ml], E2 [pg/ml], AMX [ng/ml], Inhibin B [pg/ml], TSH [mIU/l].

Методи за анализ на семенна течност:

При мъжа от двойката се прави обикновена спермограма за изследване на мъжкия фактор. Извършва се по два основни начина – мануално чрез микроскопия (Nikon Eclipse Ei R, Nikon Microscope Solutions, Japan) или чрез автоматична компютърна система за анализ (SCA[®] CASA system, Microptic, Hamilton Thorn, USA). Заключение се дава според критериите на СЗО, 1999 г.

III.2.2. Методи за хормонална стимулация за целите на АРТ

При пристъпване към цикъл на лечение се провежда овариална стимулация на яйчниците при жената.

Методи за провеждане на КОХ

Стимулацията на овариалния цикъл включва администрация на орални и/или инжекционни форми медикаменти по установени протоколи на лечение с цел да се индуцира суперовулация.

Манипулационни методи

Фоликулярната пункция (ФП) се осъществява под ултразвуков контрол, като към вагиналният трансдюсер на ехографския апарат се прикрепя метален водач с игла за

аспирация 16-18 G, 330 mm дължина (COOK Medical, USA; Wallace, Cooper Surgical, Denmark) с цел асирване на фоликуларното съдържимо.

III.2.3. Методи по ин витро оплождане на гаметите

Оценката и манипулацията на гаметите започва от постъпването на фоликуларните аспирати в ембриологичната лаборатория за да се извърши анализ на съдържимото.

Методи за оценка и селекция на кумулусно-ооцитни комплекси.

В ламинарен бокс (IVFTech Sterile 180, Denmark) под постоянен поток на стерилен въздух аспирираната фоликуларна течност се прехвърля в петри (Nunc™ Cell Culture/Petri Dishes, Thermo Fisher Scientific, USA) и под стерео микроскоп (Nikon SMZ1270, Japan) се идентифицират кумулусно-ооцитните комплекси (COC). Тези COC, които съдържат вителус се промиват неколkokратно в бикарбонатна буферирана среда (G-IVF PLUS, Vitrolife, Sweden) и се поставят за инкубация в CO₂-инкубатор с двойна газова смес (SANYO MCO-5AC, PHC group, Japan).

Методи за оценка и селекция на зрели овоцити

След 3-5 часово инкубиране COC, които ще се подлагат на ICSI процедура се денудират посредством хранителна среда, съдържаща хиалуронидаза (Hyase 10X, Vitrolife, Sweden). Единствено зрелите овоцити на стадий MII се подготвят за оплождане.

Методи за оплождане на овоцитите

Оплождането се осъществява по 2 основни метода – при т.нар. класическо ин витро оплождане (IVF) към яйцеклетките, се добавят предварително обработени и изолирани сперматозоиди без да се отстраняват техните кумулусни маси, докато при ICSI оплождането всички зрели яйцеклетки се подлагат на интрацитоплазмено инжектиране с единичен сперматозоид. Инжектирането се извършва на инвретен микроскоп (Zeiss Observer a1 ax10, Germany), снабден с микроманипулатор (Eppendorff Transfer Man4, Germany).

III.2.4. Собствени методи за морфо-физиологична оценка

С цел да се предложи нова, оптимална и информативна система за двуфакторна оценка на яйцеклетките, по време на процедурата по инжектиране се оцениха както морфологичните характеристики, така и физиологичните (функционалните) им проявления. Новата бинарна система за оценяване е наречена OVOSCORE.

Методи за морфологична оценка

Морфологичното оценяване се извърши посредством наблюдение чрез микроскопия. Основните морфологични характеристики, които се проследиха, са тези, за които има докладвани данни, че имат отношение към генетичната конституция на овоцита и имплантационния потенциал на генерирания от него ембрион.

Методи за функционална оценка

По време на процедурата по инжектиране на овоцитите се документираха функционалните характеристики на яйцеклетката.

Скоринг система

Яйцеклетките получиха две отделни оценки, на базата на морфологичните им особености и функционалните им характеристики по време на ICSI процедура.

Оценка по морфологични маркери:

- **Grade A:** яйцеклетки без видими морфологични дефекти
- **Grade B:** яйцеклетки с 1 видим морфологичен дефект
- **Grade C:** яйцеклетки с 2 или повече едновременно присъстващи дефекта

Оценка на функционалните параметри:

- **Grade 1:** инвагинация и съпротивление на пипетната пенетрация; нормално скъсване на оволемата; вискозна цитоплазма с голяма дълго стояща „фунийка“ (1/4 до 1/6 от обема на яйцеклетката)
- **Grade 2:** инвагинация; слабо съпротивление; лесно късане на оволемата и вискозна цитоплазма с малка краткотрайна фунийка
- **Grade 3:** без инвагинация; без съпротивление; внезапно късане на оволемата; няма вискозитет; няма инжекционна фунийка

III.2.5. Методи за повишаване на процента оплождане

Калциева активация

С цел постигане на по-високи нива на оплождане използвахме като допълнение към стандартните лабораторни процедури готова за употреба среда GM508 CultActive на GYNEMED, Germany по указан от производителя протокол.

Визуализация на мейотичното вретено

За целта използвахме специализирана апаратура, снабдена със софтуер – полюскоп (Oosight™, Hamilton Thorn, USA), с който беше възможно да се наблюдава (в случаите, в които е формирано) позицията на мейотичното вретено.

III.2.6. Методи за анализ и управление на факторите

Анализ на литературни източници

Пет бази данни и референтни списъци (Medline, PubMed, Scopus, Cochrane Library, Scholar) бяха изследвани за подходящи проучвания, публикувани между 2000 г. и 2023 г. Двама независими изследователя направиха интегративен преглед на литературните източници и селектираха 115 от тях като най-релевантни по темата.

Методи за систематизация чрез изкуствен интелект

С цел представяне на факторите, обект на настоящото изследване в информативен и систематизиран вид, използвахме продукта Chat Generative Pre-trained Transformer

(ChatGPT) на фирма OpenAI, L.P. с неговата премиум версия GPT-4 от м. Март 2023г. създаден с висока медицинска насоченост.

III.2.7. Статистически методи

Първична селекция на данните

Статистическа обработка на данните

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

След анализа на клиничния материал и прилагане на методите, включително и статистически, оформихме получените резултати в графичен и табличен вид и подложихме на анализ. Проучванията са систематизирани в 4 основни раздела:

1. Анализ на влиянието на фактори, свързани с начина на живот на пациентките (възраст, ИТМ, тютюнопушене и стойности на FSH), някои заболявания (ендометриоза и тазово-възпалителни заболявания) и лабораторни процедури (ICSI, криоконсервация) върху броя, зрелостта и оплодителния потенциал на добитите яйцеклетки и произтичащите от това резултати като получени клинични бременности.
2. Анализ, систематизация и предложение за управление на факторите оказващи влияние върху качеството на овоцитите посредством трансформация на информацията в табличен вид, както и представяне на нова класификация, генерирана на базата на насочена работа с изкуствен интелект.
3. Предложение за нова система за оценка на яйцеклетките OVOSCORE, с висока информативна и предиктивна стойност, базирана на морфо-физиологични характеристики и анализ на резултатите и ефективността ѝ по отношение на оплождане, качество на ембриони и имплантация.
4. Анализ на ефективността на допълнителни лабораторни процедури за повишаване шанса за оплождане на яйцеклетките след прилагане на методиките активация с калциев йонофор и визуализация на мейотичното вретено чрез полоскоп.

IV.1. Анализ на влиянието на фактори, свързани с начина на живот на пациентките (възраст, ИТМ, тютюнопушене и стойности на FSH), някои заболявания (ендометриоза и тазово-възпалителни заболявания) и лабораторни процедури (ICSI, криоконсервация) върху броя, зрелостта и оплодителния потенциал на добитите яйцеклетки и произтичащите от това резултати като получени клинични бременности

За анализ и оценка на факторите, включени в настоящото изследване са проследени резултатите при 9816 IVF/ICSI цикъла, проведени в 7-годишен период в САГБАЛ „Д-р Щерев“ от м. януари 2013г, когато в болницата е инсталиран специализиран болничен софтуер с ембриологична секция до м. декември 2019г. Поради факта, че в IVF отделението се извършват годишно между 1000 и 1500 цикъла на лечение чрез АРТ и изключително много данни се попълват акуратно в предварително създадени образец-формуляри, беше възможно да се селектират и извлекат редица параметри и да се анализират тяхната корелация за брой пациенти с висока репрезентативна стойност и добра хомогенност на изследваните подгрупи.

За целта на изследването оценихме влиянието на всеки един фактор сам по себе си и резултатите от неговото влияние към средния брой добити яйцеклетки, средния брой зрели яйцеклетки, които могат да се подложат на оплождане, фертилизационния индекс и процентът постигнати бременности, за да се прецени силата на неговата прогностична стойност.

Възраст

За да изследваме този фактор при български пациентки, обособихме 4 възрастови групи според възприетите от Европейският IVF мониторинг към ESHRE критерии. От разпределението на броя цикли в различните възрастови групи се установява, че най-голям е делът на пациентите във възрастовата група 35-39 години (n= 3107), следван от този на жени над 40 години (n= 2800). По-младите пациентки на възраст 31-34 години са по-малко като брой (n= 2114) и най-малък е делът на най-младите на възраст от 18 до 30 години (n= 1795).

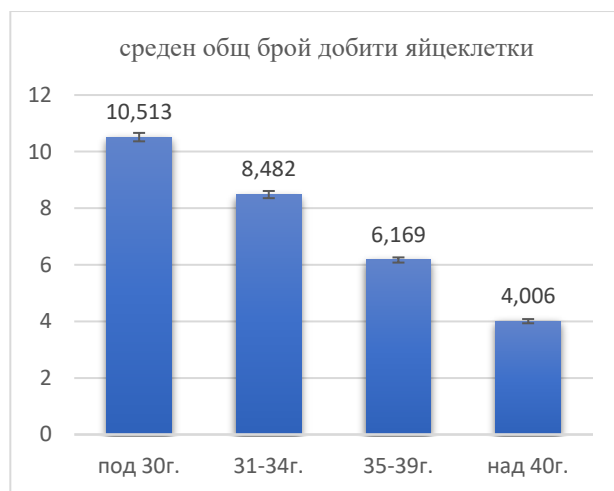
След извършване на фоликулярна пункция под УЗ контрол от тези 9816 опита са добити общо 67 187 кумулусно-ооцитни комплекси. На табл. 1 е показано разпределението на всички яйцеклетки в различните възрастови категории:

Табл. 1. Основни статистически показатели на общия брой яйцеклетки по възрастови групи

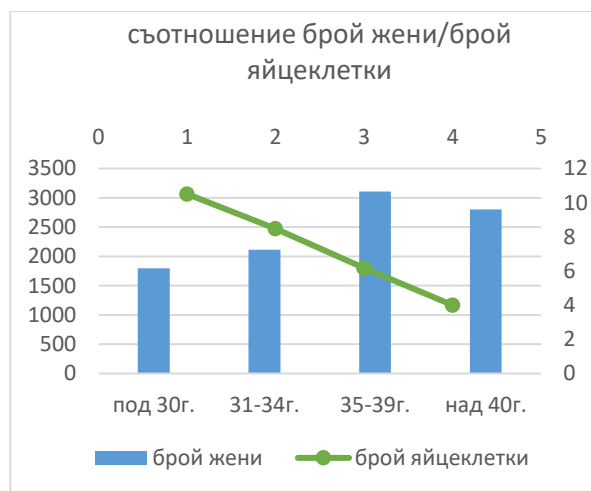
общ брой яйцеклетки					
възраст	п	мин.	макс.	ср. брой	SE
до 30	18871	0	42	10,513	0,149

31 - 34	17930	0	45	8,482	0,127
35 - 39	19168	0	43	6,169	0,0911
над 40	11218	0	34	4,006	0,0739

От направения статистически анализ чрез теста на Kruskal-Wallis се установи, че има ясна статистическа разлика между изследваните групи ($p < 0,05$). Наблюдава се отчетлива тенденция за намаляване на броя на добитите яйцеклетки с увеличаване на възрастта (фиг. 2). Изследването показва налична обратна корелация между параметрите възраст и среден брой добити яйцеклетки след ФП. С увеличаване на годините във всяка възрастова група се наблюдава намаляване на броя на овоцитите, което е отразено и във фиг. 3, показваща броя на пациентките в различните възрастови групи и данните за средния брой яйцеклетки в съответните групи:



Фиг. 2. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните възрастови групи



Фиг. 3. Брой на жените във възрастовите групи и средния брой добити яйцеклетки във всяка група

При множествено сравнение по метода на Dunn се доказва различия между всички двойки възрастови групи ($p < 0.05$).

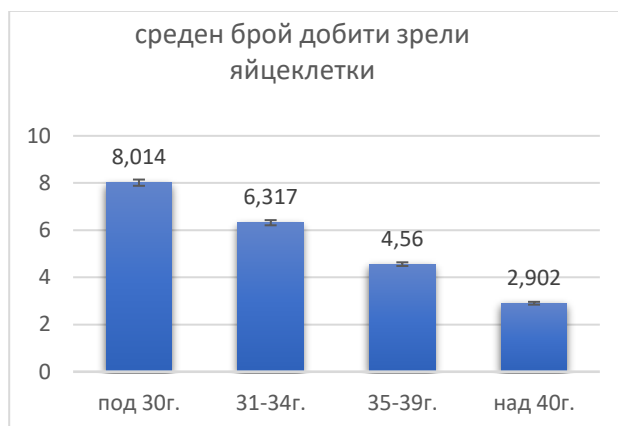
При анализ на циклите, в които няма годни за оплождане яйцеклетки отново се откриват значителни различия в отделните възрастови групи. (табл. 2).

От численото сравнение между групите се извежда отново ясна тенденция – при пациентки над 40 г. рискът целия опит да приключи без да се достигне до процедура по оплождане на гаметите поради липса на годни яйцеклетки е над 18%. При младите жени във възрастовите групи до 30 г. и 31-34 г. той варира между 4 и 6 % средно поради присъствие на жени с лош яйчников отговор, ендометриоза и/или преждевременно яйчниково отпадане (ПЯО) в тези групи.

На фиг. 4 са отразени броя на зрелите яйцеклетки в различните възрастови групи:

Табл. 2. Процент от циклите в които няма яйцеклетки и/или зрели яйцеклетки

възраст	под 30г.	31-34г.	35-39г.	над 40г.
няма яйцеклетки (%)	1,28	1,7	4,35	8,2
няма NM (%)	2,42	4,13	6,56	10
общо % от циклите	3,7	5,83	10,91	18,2



Фиг. 4. Среден брой МП яйцеклетки в различните възрастови групи

Графиката демонстрира тенденция за намаляващ брой годни за оплождане яйцеклетки с увеличаване на възрастта на лекуваните жени, като се запазва обратната корелация между възраст и брой яйцеклетки. По отношение на процентното съотношение на зрелите овоцити спрямо общия брой, в групите се наблюдава отново сигнификантна разлика ($p < 0.05$), изразена при сравнение на групата 40+ годишни пациентки с останалите възрастови групи.

От направения сравнителен анализ установихме, че не само средния брой зрели овоцити е с намаляваща тенденция с покачване на възрастта, но и пропорцията им спрямо общия брой добити яйцеклетки също е по-ниска при по-възрастни жени.

По отношение на оплождането бяха регистрирани следните резултати: група до 30г. – 75% оплождане, група 31-34 г. - 74%, група 35-39 г. – 74% и група над 40 г. – 73%. Посредством Pearson's chi-squared test достоверни различия са установени при групата жени над 40 години. Беше отчетена силна сигнификантна разлика в средния процент оплодени яйцеклетки между групата на жените над 40 години в сравнение с тези под 30 г. ($p < 0.0001$) и гранични в сравнение с останалите 2 групи: ($p = 0.0595$) за възрастова група 31-34 г. и ($p = 0.0563$) за група 35-39 г. съответно.

При проследяване на циклите до крайния изход от лечението спрямо възрастовия фактор достигнахме до следните резултати, демонстрирани в табл. 3:

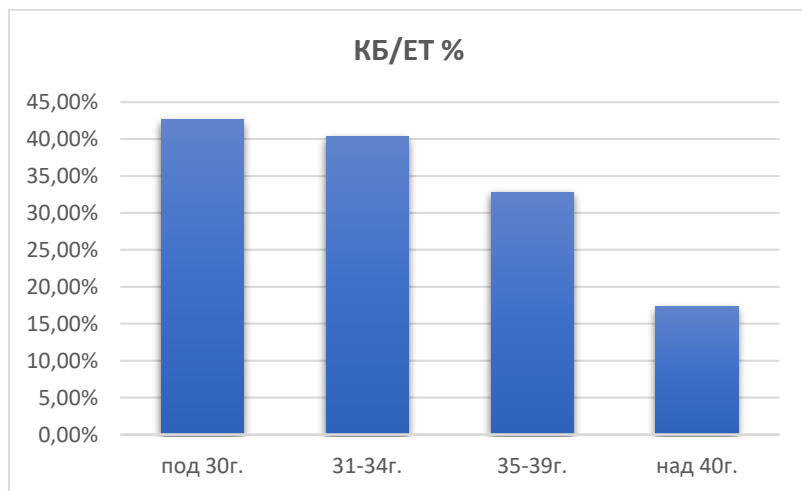
Табл. 3. Основни данни за изхода от лечението

Възрастова група	под 30г.	31-34г.	35-39г.	над 40г.
канселирана след пункция				
брой	174	308	675	913
%	10%	15%	22%	33%

приключила с трансфер				
брой	946	1210	1892	1618
%	53%	57%	61%	58%
приключила с трансфер и замразяване				
брой	349	319	288	100
%	19%	15%	9%	3%
приключила със замразяване				
брой	326	277	252	169
%	18%	13%	8%	6%

Данните показват, че при сигнификантно по-висок процент от опитите, които правят жени над 40 годишна възраст не се достига до ембриотрансфер (ЕТ) и/или замразяване. Разликата е достоверна, сравнена с всички останали групи ($p < 0.001$). Също процентът на ембриони, които са годни за замразяване е значително по-нисък и отбелязва обратна корелационна зависимост. Относителният дял на жените със свеж трансфер е сравним в четирите групи.

При сравняване на резултатите от постигнатите клинични бременности също се наблюдават статистически различия (фиг. 5).



Фиг. 5. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

Демонстрираните данни показват сравними резултати от лечението при жени до 35 г. възраст. В групата 35-39 г. обаче се наблюдава сигнификантно по-нисък процент постигнати бременности ($p < 0.001$) в сравнение с първите 2 групи. В групата на жените над 40 г. бременностите са със значителна статистическа разлика сравнени с всяка една от другите групи ($p < 0.001$).

Дискусия:

Резултатите, генерирани след обработването на данните за над 67 хиляди яйцеклетки от български пациентки корелират с множеството литературни доклади, свързващи възрастовият фактор с намаляващата продукция на овоцити. Анализът на броя и процентното разпределение на зрелите овоцити също затвърждава тази хипотеза – колкото повече напредва възрастта на партньорката от лекувана двойка, толкова по-малко годни за оплождане яйцеклетки се добиват след хормонална стимулация. Възрастовото разпределение показва и отношение към процента оплождане, намаляващо след 40 г. възраст.

Резултатите от постигнати клинични бременности потвърждават световно приетият условен cut-off за възрастта, при която човешките овоцити започват осезаемо влошаване на качеството и респективно шансове за настъпване на бременност – 35 години. При пациентки, потърсили лечение за инфертилитет след 40 годишна възраст шансът да се достигне до имплантация на ембрион е още-по редуциран и намалява рязко със всяка изминала година след 40тата.

Възрастта като основен водещ фактор, влияещ върху качеството на овоцитите се затвърждава от настоящото изследване.

ИТМ

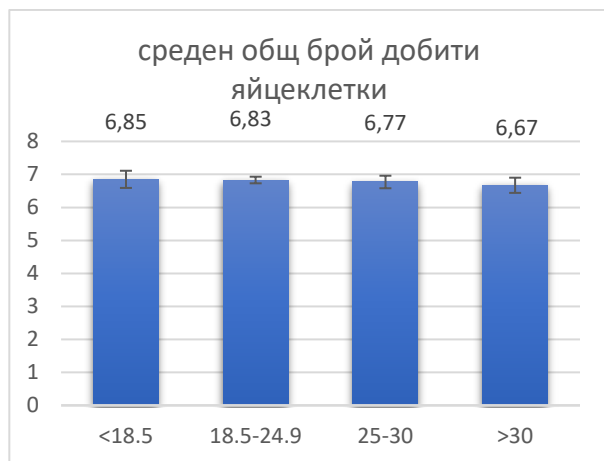
С цел да бъде изследван какъв е конкретният ефект върху яйцеклетките, тяхното качество и фертилизационен потенциал анализирахме резултатите на общо 4882 жени от партньорски двойки, провели лечение чрез АРТ, за които има въведени данни за ръст и тегло при започване на процедура по ин витро оплождане. Пациентките са разпределени както следва: в група 1 (ИТМ под 18,5) – 498 жени, група 2 (от 18,5 до 24,9) – 3021 жени, група 3 (25 - 29,9) – 789 жени и група 4 (над 30) – 484 жени.

След проведена КОХ и ФП са добити общо 33 205 овоцита (табл. 4).

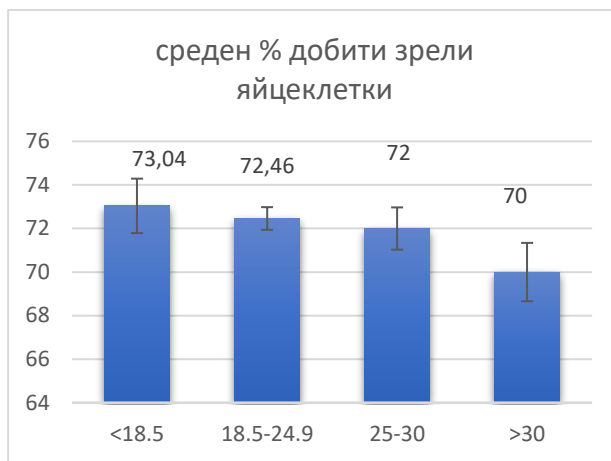
Табл. 4. Основни статистически данни за добитите яйцеклетки в различните категории ИТМ

общ брой яйцеклетки					
ИТМ	п	мин.	макс.	среден брой	SE
<18.5	3406	0	43	6,85	0,26
18.5-24.9	20620	0	45	6,83	0,1
25-30	5950	0	36	6,77	0,19
>30	3229	0	28	6,67	0,23

Непараметричният тест на Kruskal-Wallis не показва статистически разлики в средния брой добити яйцеклетки между различните двойки групи (фиг. 6). По отношение на средният брой МП яйцеклетки, подходящи да бъдат подложени на оплождане, чрез анализ на множествоно сравнение с теста на Dunn също не са установени достоверни разлики. Анализирайки данните за процентното съотношение на зрелите яйцеклетки към общата популация добити овоцити се наблюдава тенденция за намаляване на техните пропорции в групата с обезитет (фиг. 7), но не се установи статистически значима разлика.



Фиг. 6. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните възрастови групи



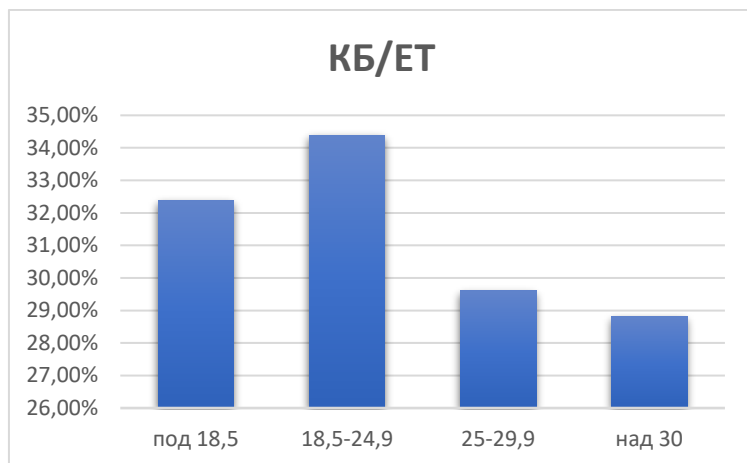
Фиг. 7. Дял на добитите МП яйцеклетки спрямо общия брой добити яйцеклетки

При сравнение на cancellation rate (CR) след фоликулярен пункция – процентното съотношение на циклите, в които няма добита нито една яйцеклетка, или няма добита нито една зряла яйцеклетка варира в граници 9-11% в различните групи и не се установява сигнификантна разлика между групите.

Процентът на оплождане също е съизмерим в отделните категории ИТМ и е в стойности 74-75%.

Анализът на крайните резултати от ин витро цикъла показват сходно разпределение в процентите на изхода от циклите в различните групи. При анализ на честотата на постигнати бременности (фиг. 8) се установиха сигнификантни различия в някои от групите:

В групата на пациентки с поднормено тегло положителни резултати са установени при 32,37% от тях, довели до 109 клинични бременности. В групата с нормално тегло са регистрирани най-високи стойности - 745 бременности и 34,38% КБ/ЕТ. При жените с наднормено тегло са отчетени 183 положителни кръвни теста и 29,60% успешни цикли. Най-нисък брой се наблюдава в групата със затлъстяване – 28,8% имплантации от 344 ембриотрансфера.



Фиг. 8. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

При сравнителен анализ между отделните групи не беше отчетена статистическа разлика между групата на жени с поднормено (група 1) и нормално тегло (група 2) ($p = 0.4714$). Сигнификантно по-нисък е процентът на клинични бременности между група 2 и групата с наднормено тегло (група 3) ($p = 0.0256$), както и между група 2 и групата със затлъстяване (група 4) ($p = 0.0412$). Въпреки че множественото сравнение чрез теста на Dunn не откри статистическа разлика между групите 3 и 4, се наблюдава ясна обратна корелация между стойности на ИТМ и процент успешни имплантации.

Дискусия:

Показателите, които пряко индикират качеството и фертилизационният потенциал на овоцитите – среден брой, пропорция на МП, фертилизационен индекс, не показват пряка корелационна зависимост от стойностите на ИТМ на пациентките. Единствените сигнификантни различия, които бяха установени при настоящото изследване са в резултатите от постигнатите успешни бременности, подкрепено и от по-ранни проучвания на нашия екип. Изводите, които прави настоящото проучване са, че повишените нива на адипозна тъкан не повлияват пряко качеството на овоцитите и причината за по-ниските нива на постигнати бременности при жени с наднормени стойности на теглото би следвало да се търсят в компрометираната рецептивност на ендометриалната лигавица.

Тютюнопушене

В изследването са включени 557 жени, отбелязали в информационната си карта, че са пушачки. За контролна група са селектирани 416 жени непушачки в сходни възрастови граници.

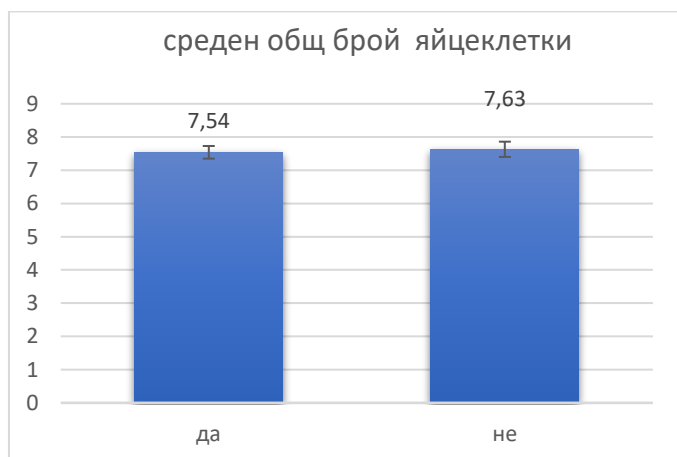
Резултатите при отчитане на броя добити яйцеклетки са представени в таблица 5:

Табл. 5. Основни статистически данни за средния брой добити яйцеклетки

общ брой яйцеклетки

тютюнопушене	n	мин.	макс.	среден брой	SE
да	3174	0	27	5,7	0,19
не	2272	0	30	5,48	0,23

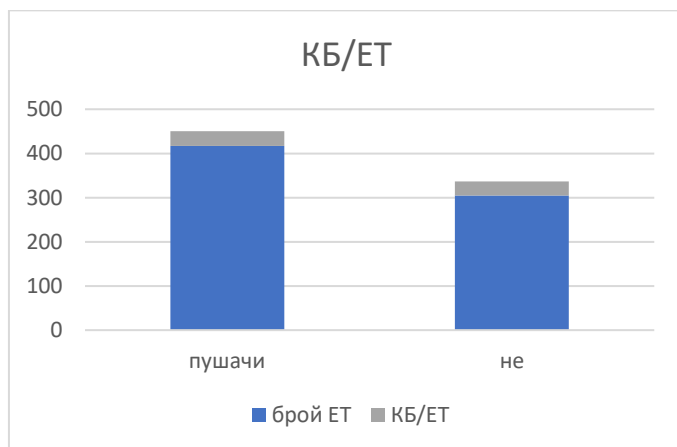
От направения статистически тест по Mann-Whitney не бяха установени статистически различия между двете кохорти в средния брой добити яйцеклетки (фиг. 9).



Фиг. 9. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в двете групи

По отношение на средния брой зрели МІІ яйцеклетки също няма установени статистически зависимости разлики. Данните от двете сравнявани групи са хомогенни и сравними по този показател, както и спрямо средният процент зрели овоцити от общата кохорта. Резултатите от оплождането също показват сходни характеристики – 75% и в двете групи.

Анализът на крайните резултати от проведения цикъл на лечение демонстрират хомогенност и в двете групи. Подобни са и резултатите от постигнатите клинични бременности, демонстрирани на фиг. 10:



Фиг. 10. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

Не беше установена статистическа разлика в броя и процентното съотношение на постигнатите успешни бременности.

Дискусия:

Настоящото изследване не установи значителни различия при яйцеклетките на жени пушачки, сравнени с контролна група. Не бяха детектирани разлики, касаещи средните стойности на броя добити яйцеклетки, както и броя на годните за оплождане яйцеклетки. Данните за оплождането им, както и финалните резултати от процедурата по АРТ също демонстрираха сходност. Няма разлика и в дяловете на забременелите жени, независимо дали пушат или не.

Изводите от това проучване кореспондират с наскоро публикувано изследване на университета Кеймбридж, в което изследващият екип установява засягане на някои морфологични характеристики на яйцеклетките в употребяващата тютюневи изделия група, но не отчитат сигнификантни разлики в яйчниковият отговор, оплождането и имплантационните резултати. Въпреки това, авторите подчертават, че е важно пациентите, опитващи се да постигнат бременност да бъдат консултирани и информирани за многобройните негативни последици от тютюнопушенето върху здравето и потенциално върху развиващия се плод.

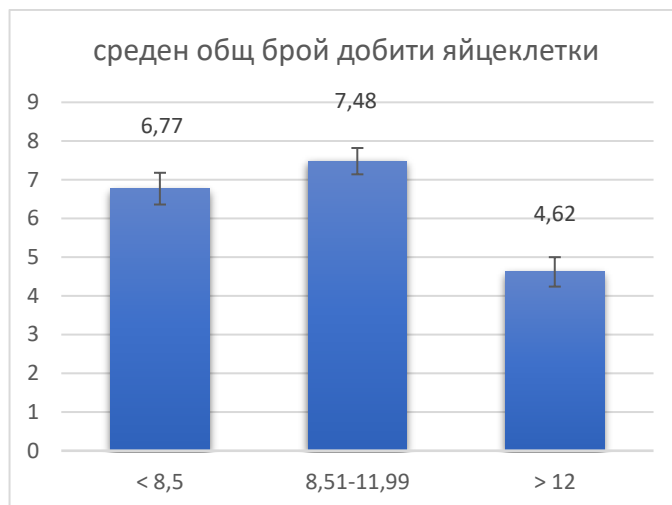
FSH

В това изследване сме анализирали резултатите на 411 пациентки, за които има данни за базалните серумни нива на FSH при стартиране на хормонална стимулация за целите на АРТ, разпределени в 3 групи в зависимост от конкретните стойности: група 1: (под 8,5 IU/l) $n=103$, група 2: (от 8.51 до 1.99 IU/l) $n=211$, група 3: (над 12 IU/l) $n=97$.

При отчитане на средният брой добити яйцеклетки след КОХ бяха получени резултати, демонстрирани в табл. 6. От направения статистически анализ чрез теста на Kruskal-Wallis се установи сигнификантни разлики между броя на овоцитите в група 1 спрямо група 3 ($p<0.05$), както и между група 2 спрямо група 3 ($p<0.05$) (фиг. 11):

Табл. 6. Основни статистически данни за добитите яйцеклетки в различните групи

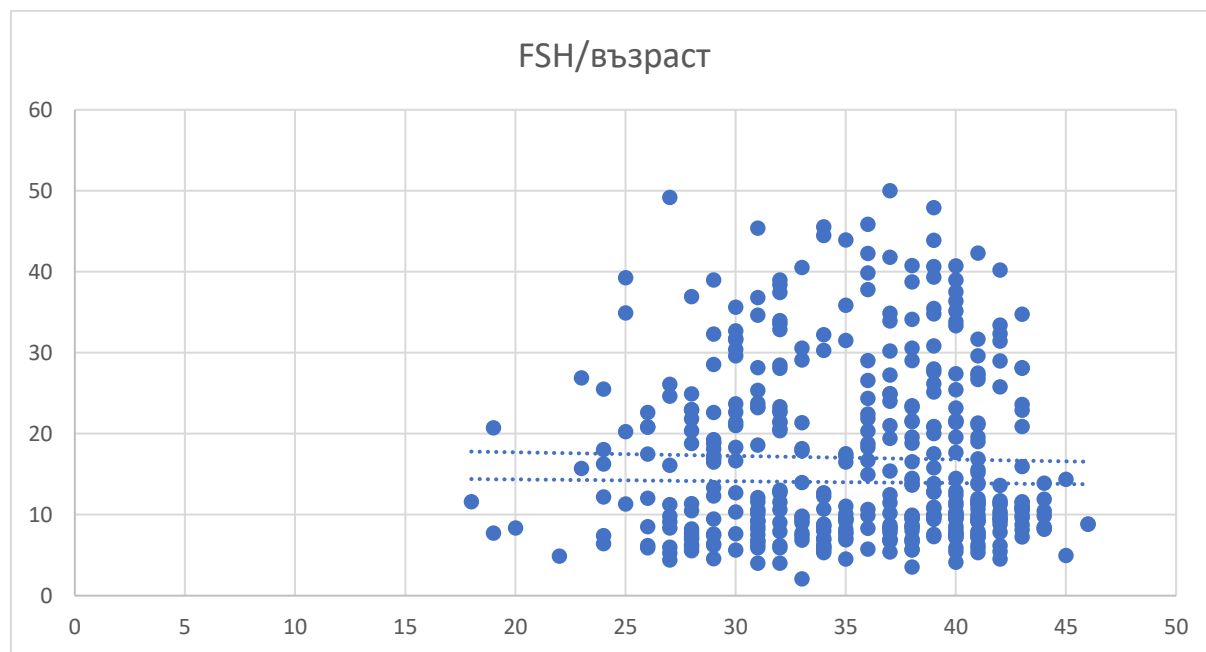
общ брой яйцеклетки					
FSH	n	мин.	макс.	ср. брой	SE
< 8,5	697	0	27	6,77	0,48
8,51-11,99	1579	0	27	7,48	0,43
> 12	448	0	26	4,62	0,44



Фиг. 11. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните групи

Аналогични са данните относно делът на зрели яйцеклетки в различните групи - затвърждава се тенденцията за понижен брой яйцеклетки при завишени нива на FSH над 12 IU/L.

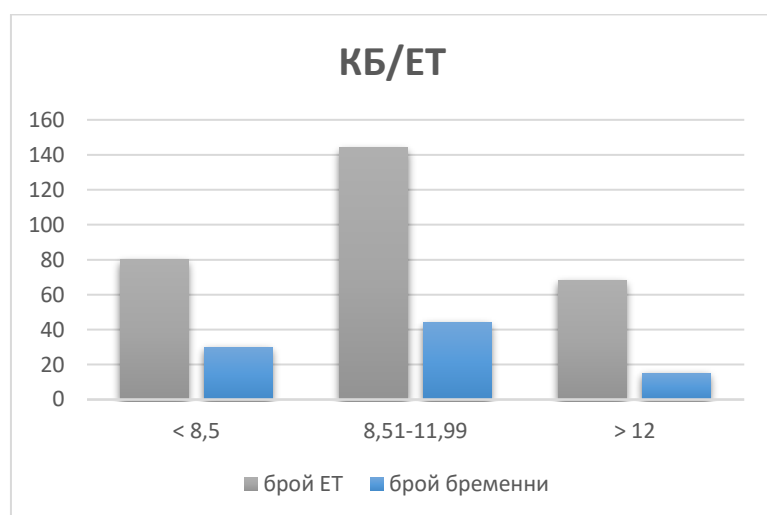
По отношение на връзката между възрастта на лекуваните жени и техните FSH стойности анализираните данни и резултатите са представени графично на фиг. 12:



Фиг. 12. Корелационна зависимост между възраст и стойности на FSH.

Анализът на параметричният корелационен коефициент между тези 2 фактора отчете взаимозависимост между увеличаващата се възраст на пациентките и стойностите на техните базални серумни нива на FSH.

Финалните резултати от проведеното лечение показват някои закономерния различия в отделните изследвани групи. Въпреки че не беше отчетена сигнификантност, налице е правопрпорционална зависимост между процентното съотношение на канселираните цикли и увеличаващите стойности на хормона FSH. В групата на пациентки с над 12 IU/l почти 1/3 от циклите са приключили без нито 1 развиващ се ембрион, подходящ за трансфер или замразяване. Тези резултати се потвърждават и при отчитането на имплантационният индекс (фиг. 13):



Фиг. 13. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

В групата до 8,5 IU/l бяха отчетени най-високи нива на постигнати бременности – 37,5%. По-ниски са резултатите във втората група (от 8.51 до 1.99 IU/l) – 30,56% и най-лошите резултати от лечението са постигнати в групата над 12 IU/l FSH – 22,10%.

Демонстрираните резултати са закономерен резултат от цялостния анализ на кохортата и достигат сигнификантност в резултатите от лечението между група 1 и 3 ($p = 0.0431$).

Дискусия:

Съществуващите литературни данни, които поддържат тезата, че високите серумни нива на FSH влияят негативно както върху морфологията на овоцитите (висок процент тъмни, гранулирани яйцеклетки) и водят до по-ниски резултати при регистриране на бременности, напълно кореспондират с получените в нашето изследване резултати. Като cut-off граница бихме могли да очертаем стойности над 12 IU/l, при които се отчитат значителни различия както по отношение на броя добити яйцеклетки, така и по отношение на постигнатите

бременности. На базата на нашите данни, бихме могли да затвърдим ролята на стойностите на FSH не само като надежден маркер за яйчников резерв, но и като биологичен фактор, влияещ върху качеството на гаметите.

Ендометриоза и тубарен фактор

За да установим има ли корелация между продукцията на овоцити, оплождането и имплантационния потенциал при жени, засегнати от ендометриоза и тазово-възпалителни болести (ТВБ), изследвахме постигнатите резултати от лечение чрез АРТ на жени с диагностицирана ендометриоза и ТВБ и ги сравнихме с пациентски двойки с мъжки фактор като контролна група (табл. 7). Резултатът от направения статистически анализ чрез теста на Kruskal-Wallis е, че има установена сигнификантност в средния брой добити яйцеклетки между групата на ендометриозата и контролната група, а също така и между групата на ТВБ и контролната група ($p < 0,01$). При сравнение между двете изследвани групи също се наблюдават статистически различия – при жените с ендометриоза се отчитат значително по-малък брой получени след стимулация яйцеклетки ($p < 0,01$) (фиг. 14).

Табл. 7. Основни статистически данни за добитите яйцеклетки в различните групи

общ брой яйцеклетки					
	п	мин.	макс.	ср. брой	SE
Ендометриоза	2471	0	28	5,24	0,21
Тубарен фактор	15693	0	45	7,1	0,24
Контрола	4408	0	32	7,7	0,23



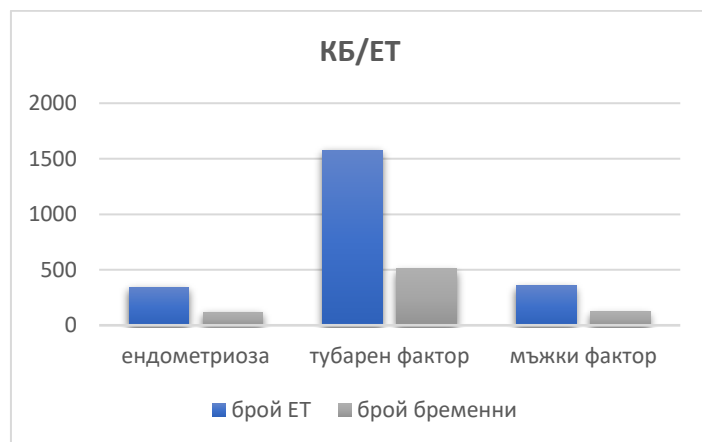
Фиг. 14. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните групи

Аналогични са и резултатите, когато сравняваме дела на средния брой добити годни за оплождане яйцеклетки. Отново се установява статистическо различие както при сравняване на отделните две групи с контролата така и между самите изследвани групи ($p < 0,01$).

По отношение на крайния изход от лечението в трите групи – двете изследвани и контролната, демонстрират съпоставими данни относно това как е приключила процедурата. Процентът на канселирани цикли както при групата жени с ендометриоза,

така и при групата с ТВБ е по-висок и доближава стойности от $\frac{1}{4}$ от всички проведени пункции, но въпреки това не се установява статистическа зависимост при сравняване с контролната група.

При анализ на данните от постигнати бременности бяха установени следните зависимости, демонстрирани на фиг. 15:



Фиг. 15. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

Резултатите от това изследване показват, че въпреки сигнификантно по-ниският брой добити яйцеклетки при пациентките с възпалителни заболявания на репродуктивната система, постигнатите клинични бременности (КБ) са съизмерими в трите групи. Процентът успешни имплантации при тубарен фактор са 32,26%, за групата на ендометриозата е 33,70% без достоверна разлика ($p = 0.6055$). Най-висок процент имплантации се установява в контролната група – 34,83% КБ/ЕТ, но той не е със статистически значима стойност нито спрямо групата на ендометриозата ($p = 0.7530$), нито спрямо тубарния фактор ($p = 0.3507$).

Дискусия:

Резултатите, които нашия екип получи при обработката на данните за различните фактори за стерилитет са многообразни, но в основната си същност напълно кореспондират с изводите от литературното ревю, публикувано през 2017г. в сп. Journal of Ovarian Research от екипа на проф. Raoul Orvieto от университетската болница в Тел Авив, Израел (192). В статията авторите отбелязват, че възпалителните процеси в малкия таз променят нормалната среда на фоликулярната течност, но този процес има по-голямо биологично, отколкото клинично значение за жените, целящи забременяване. В редица публикации, които се цитират, авторите установяват множество промени в морфологичния статус на добитите след стимулация яйцеклетки, но когато се анализират крайните резултати от имплантации и бременност, данните са крайно противоречиви. Нашия анализ на изхода от

лечение при български пациентки демонстрират сходство с основните изводи по отношение на броя добити яйцеклетки и подкрепят тези публикации, които не установяват клинично значими разлики в процента забременяване.

ICSI процедура

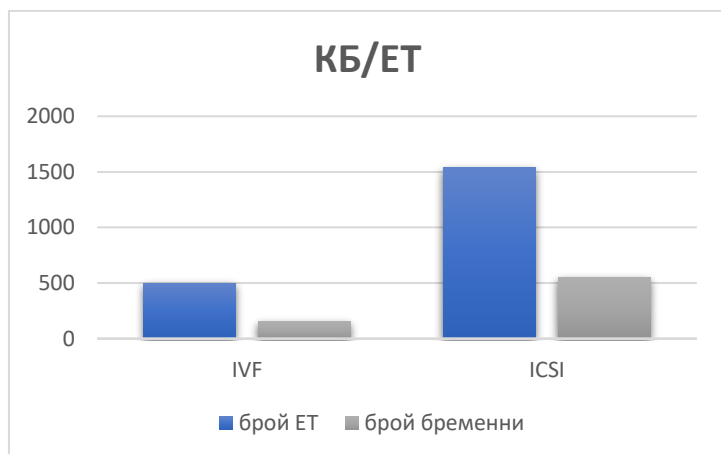
За да отчетем актуален фактор ли е все още ICSI процедурата, обработихме резултатите от общо 2897 цикъла, в които е приложена само една от двете процедури. Средният брой на добитите яйцеклетки, както и средната възраст са съпоставими, за да са възможно най-сравними резултатите (табл. 8).

Табл. 8. Основни статистически данни за добитите яйцеклетки в различните групи

общ брой яйцеклетки								
	п	мин.	макс.	среден брой	SE	FR	Damage	неоплодени
ICSI	17368	5	16	7,7	0,46	75%	2,5%	22,5%
IVF	5234	6	14	7,8	0,47	74%	NA	26%

При сравнение на средният процент оплодени яйцеклетки, не се отчитат сигнификантни разлики ($p = 0.1443$). Неоплодените яйцеклетки са 22,5% и 26% съответно за ICSI и за IVF процедурата. Дегенериралите след инжектиране овоцити (damage) са 2,5%.

По отношение на крайните резултати, данните също показват сходство при двете процедури. Не бяха отчетени достоверни разлики по отношение на процента канселирани цикли поради липса на оплождаване или неразвиващи се ембриони. Данните за установените бременности след прилагане на двете процедури са демонстрирани на фиг. 16.



Фиг. 16. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

Регистрираните клинични бременности са в по-висок процент, когато се прилага ICSI като метод за оплождане (35,7%) в сравнение със случаите, при които е избрана IVF техниката (31,2%). Въпреки тези разлики, статистическият анализ не отчете достоверни различия в постигнатите резултати между двете процедури ($p = 0.0661$).

Дискусия:

Данните от нашето проучване демонстрират пренебрежимо нисък процент дегенерирали след микроманипулиране гамети, който се компенсира напълно с високият фертилизационен индекс. Избора на ICSI като метод на оплождане е свързан и с прецизна селекция както на яйцеклетките, така и на сперматозоидите и в последните години се е превърнал в предпочитан метод за работа в ембриологичните лаборатории в световен мащаб. Съвременните публикации напълно затвърждават нашите резултати и изваждат тази лабораторна процедура от списъка с фактори, които повлияват качеството на овоцитите и крайният резултат от лечението.

Криоконсервация

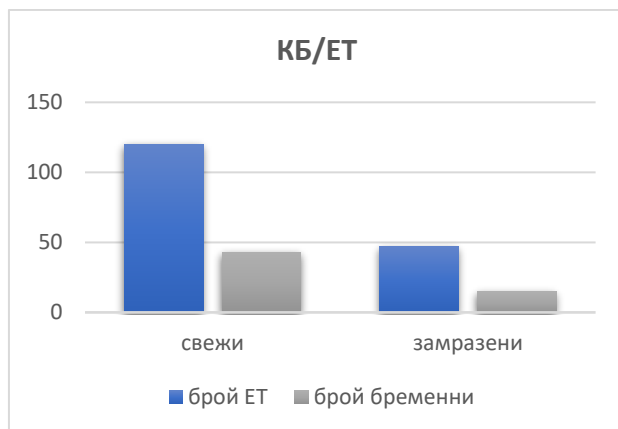
С цел да изследваме дали замразените яйцеклетки притежават същата компетентност, както и свежите, отчетохме резултатите при 62 процедури, при които са използвани замразени яйцеклетки и ги сравнихме с 162 със свежи такива.

След размразяване по протокол, са отчетени 208 преживели от 213 размразени – 98% survival rate (SR). Основните данни са представени на табл. 9:

Табл. 9. Основни статистически данни

общ брой яйцеклетки					
	п	мин.	макс.	ср брой	SE
свежи	1154	1	14	5,5	0,29
замразени	213	1	11	5,3	0,27

Отчетеното оплождане е съответно 72% за замразените яйцеклетки и 75% за свежите. Въпреки по-високите стойности при свежите овоцити, след статистическа обработка посредством Pearson's chi-squared test не бяха детектирани достоверни разлики ($p = 0.3560$). Подобни са и резултатите от крайния изход на лечението (фиг. 17) – по-високи стойности на постигнати бременности при процедурите със свежи яйцеклетки – 35,83% и 31,91% при замразените, като отново не се установява сигнификантност ($p = 0.3560$).



Фиг. 17. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

Дискусия

Публикациите от последните години дават предимство на витрификацията като методика и не се установяват разлики при лечението на пациентки със свежи или замразени овоцити. Други съвременни публикации не отчитат влияние на витрификацията върху качеството на яйцеклетките. Нашите резултати напълно кореспондират с литературните данни по темата и са доказателство за отлично работещата методика и добрата подготовка и опитност на ембриолозите и криобилистите в България.

ОБОБЩЕНИЕ:

По отношение на основните параметри, разгледани в този дисертационен труд, различните изследвани фактори оказват влияние върху различни аспекти от цикъла на вербуване, добиване и оплождане на яйцеклетките.

Анализ на **средния брой добити яйцеклетки** отчете по-нисък добив, пропорционално на увеличаването на възрастта на лекуваните пациентки, като най-отчетливо е това при жени над 40 годишна възраст. Друга фактор, оказващ влияние, са серумните FSH стойности над 12 IU/L, както и при диагностицирани с ендометриоза или ТВБ пациентки.

Реципрочни са данните, засягащи годните за оплождане яйцеклетки. Установено беше влиянието на същите фактори при обработка на данните за **среден брой зрели яйцеклетки**, като отново възрастта се очертава като фактор с най-голямо значение за изследвания параметър.

По отношение на **оплождането** се отчита относителна хомогенност при повечето изследвани фактори, с изключение на жените, които са на възраст над 40 години – при тях се установи статистически по-ниски резултати и по-малък брой получени ембриони от подложените на оплождане яйцеклетки.

Анализирайки данните за това как е приключила процедурата по асистирана репродукция, важен показател е **cancellation rate** – при какъв процент от направените процедури не се е

достигнало до трансфер и/или замразяване поради липса на зрели яйцеклетки, липса на оплождане или липса на развиващи се ембриони. Най-отчетливи разлики със силна статистическа зависимост отчетохме при възрастовия фактор – между всички групи са открити достоверни разлики ($p < 0,001$). Корелация е установена и при пациентки с FSH стойности над 12 IU/l, при които рискът целия цикъл да бъде канселиран е по-висок, в сравнение с жените в групата с $FSH < 8,5$ IU/l ($P = 0.0372$).

Друг важен индикатор, който може да се проследи, са постигнатите **клинични бременности**. При жени на възраст над 35 години шансовете за достигане на успешна имплантация са сигнификантно по-ниски. Закономерен е и резултатът при пациентките с FSH стойности над 12 IU/l. Тук за пръв път се появява и нов фактор – при жени с високи стойности на ИТМ се наблюдават по-ниски нива на забременяване. При отчитане на този фактор обаче трябва да се вземе предвид влиянието на високите нива на излишна мастна тъкан върху рецептивността на лигавицата, както и липсата на статистически разлики в броя добити яйцеклетки и фертилизационния индекс в различните групи ИТМ.

Обобщението, което би могло да се направи на базата на изследваните 9816 български пациентки и 67 187 яйцеклетки е, че възрастта се откроява като водещ фактор, оказващ най-значително влияние върху качеството и оплодителния потенциал на яйцеклетките. Друг съществен фактор с водеща роля, са показателите на фоликуло-стимулиращия хормон, когато серумните му стойности надвишават 12 IU/l (фиг. 18).

ОБОБЩЕНИЕ

ФАКТОРИ	БРОЙ Я	БРОЙ NM	ОПОЖДАНЕ	CANCELLATION RATE	БРЕМЕННОСТ
ВЪЗРАСТ	✓	✓	✓	✓	✓
ИТМ					✓
ТЮТЮНОПУШЕНЕ					
FSH	✓	✓			✓
ЕНДОМЕТРИОЗА	✓	✓			
ТУБАРЕН ФАКТОР					
ICSI					
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ					

Фиг. 18. Връзка между изследваните фактори и компетентността на овоцитите

IV.2. Анализ, систематизация и предложение за управление на факторите оказващи влияние върху качеството на овоцитите посредством трансформация на информацията в табличен вид, както и представяне на нова класификация, генерирана на базата на насочена работа с изкуствен интелект.

За целта на настоящото проучване анализирахме данните от най-новите публикации в научната литература, за да допълним, осъвременим и преобразуваме в лесен за използване табличен вид двата основни вида фактори, влияещи върху компетентността на човешките яйцеклетки. За по-голяма акуратност, нашият екип предлага допълнително подразделение на факторите с външно въздействие.

Освен това популярно разделяне на 2 основни групи, представяме и още 1 нова класификация, базирана на данни от работа с изкуствен интелект

Оригиналното разделение на фактори с външно и вътрешно въздействие търпи непрекъснати актуализации поради активната работа на различни екипи в това направление. След интегративен анализ на 115 публикации до 2023г. включително от 5 научни бази данни, нашият екип трансформира литературните данни в табличен изглед на основните фактори с външно и вътрешно влияние (табл. 10), за които има изнесени сведения за потенциален ефект върху компетентността на яйцеклетките. Освен основното разделение на 2 групи, предлагаме за по-голяма прецизност и допълнително подразделяне при факторите с външно въздействие:

- Фактори с индиректно въздействие върху овоцитите - до фоликулярната пункция
- Фактори с директно въздействие – след фоликулярната пункция

Табл. 10. Фактори, влияещи върху качеството на яйцеклетките

ФАКТОРИ ВИЛЯЕЩИ ВЪРХУ КАЧЕСТВОТО НА ЯЙЦЕКЛЕТКИТЕ	
ФАКТОРИ С ВЪТРЕШНО ВЪЗДЕЙСТВИЕ	ФАКТОРИ С ВЪНШНО ВЪЗДЕЙСТВИЕ
	ВЪНШНИ ФАКТОРИ С ИНДИРЕКТНО ВЪЗДЕЙСТВИЕ
ВЪЗРАСТ	КОХ
ПЯО	ХИМИО- И ЛЪЧЕТЕРАПИЯ
ИТМ	ЗАМЪРСЕНОСТ НА ВЪЗДУХА
ТЮТЮНОПУШЕНЕ	МЕДИКАМЕНТИ
АЛКОХОЛ	ОКСИДАТИВЕН СТРЕС
НАРКОТИЦИ	ХИРУРГИЯ НА МАЛЪК ТАЗ
КОФЕИН	ПРОФЕСИОНАЛНИ РИСКОВЕ
ФИЗИЧЕСКА АКТИВНОСТ	ТОКСИНИ ОТ ОКОЛНАТА СРЕДА
ХРАНЕНЕ	PRP
СУПЛЕМЕНТИ	АПЛИКАЦИЯ НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ
СТРЕС	МИТОХОНДРИАЛЕН ТРАНСФЕР
СЕРУМНИ НИВА НА FSH	БАРОКАМЕРА
КАЧЕСТВО НА СЪНЯ	ФИЗИОТЕРАПИЯ НА МАЛЪК ТАЗ
ЕНДОМЕТРИОЗА	РАСТЕЖЕН ХОРМОН
ТВБ	НУКЛЕАРЕН ТРАНСФЕР
СПКЯ	ВЪНШНИ ФАКТОРИ С ДИРЕКТНО ВЪЗДЕЙСТВИЕ
ОХСС	
АВТОИМУННИ БОЛЕСТИ	ДЕНУДАЦИЯ
КАРЦИНОМИ	ICSI
ГЕНЕТИЧНИ МУТАЦИИ	КРИОКОНСЕРВАЦИЯ
МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ	ЛАБОРАТОРНИ УСЛОВИЯ
ХРОНИЧНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ	УСЛОВИЯ В ИНКУБАТОРА
	КУЛТУРАЛНИ УСЛОВИЯ
	ЕПИГЕНЕТИЧНИ ПРОМЕНИ

Систематизация на факторите чрез изкуствен интелект

С цел да получим подробна и пълна картина на факторите, които оказват влияние на качеството на човешките яйцеклетки, използвахме продукта ChatGPT (Open AI) с неговата премиум версия - GPT-4, реализирана през месец март 2023 г. Посредством поредица от конкретно насочени въпроси, теми и команди GPT-4 генерира изцяло нова и различна класификация на факторите, групирайки ги тематично в 9 отделни категории (фиг. 19):

1. Възраст

Това е факторът с най-ключово значение и най-голямо влияние върху броя и качеството на яйцеклетките. От него основно зависи шансът за постигане на успешна бременност

2. Яйчников резерв

Намаленият яйчников резерв е свързан с редуцирани шансове за постигане на бременност дори при по-млади пациентки поради силно ограничения брой на яйцеклетки, които се добиват след овариална стимулация

3. Начин на живот (лайфстайл)

Редица избори, които човек прави в ежедневието си, както и някои вредни навици могат значително да повлияят както количеството, така и качеството на техните яйцеклетки.

Най-значително влияние оказват следните фактори:

- Тегло и ИТМ
- Тютюнопушене
- Злоупотреба с алкохол
- Използване на наркотични вещества и халюциногени
- Небалансирано хранене, недохранване и високо мазнинни диети
- Липса на физическа активност или прекомерна такава
- Злоупотреба с кофенинови напитки и продукти
- Стрес

4. Генетични фактори

Редица наследствени и де ново мутации биха могли да имат значително влияние върху фертилитета на индивида, свързан с понижен яйчников резерв, субоптимален отговор на стимулация и добиване на гамети с небалансиран кариотип

5. Медицински състояния

Най-значимите заболявания, които имат отношение към качеството на яйцеклетките са:

- СПКЯ
- Ендометриоза
- Автоимунни заболявания
- Хронични заболявания
- Предишни хирургични интервенции в малкия таз
- Ракови заболявания, химио- и лъчетерапия
- Инфекции и възпаления на репродуктивния тракт

6. Хормонален статус

От голямо значение за фертилитета и качеството на овоцитите са нормалните стойности на половите хормони като LH, FSH, TSH, прогестерон, пролактин, естрадиол и най-вече анти-мюлеров хормон. Също така щитовидната жлеза е важно да функционира нормално и нейните хормони да са в референтни граници.

7. Овариална стимулация

Правилният избор на протокол за стимулиране на яйчниците и назначаването на оптимални дози ежедневно е от ключово значение за оптималния резултат при добиване на яйцеклетки след фоликуларната пункция. Прекалено високите дози от своя страна са свързани с риск от ОХСС

8. Влияние на фактори от околната среда

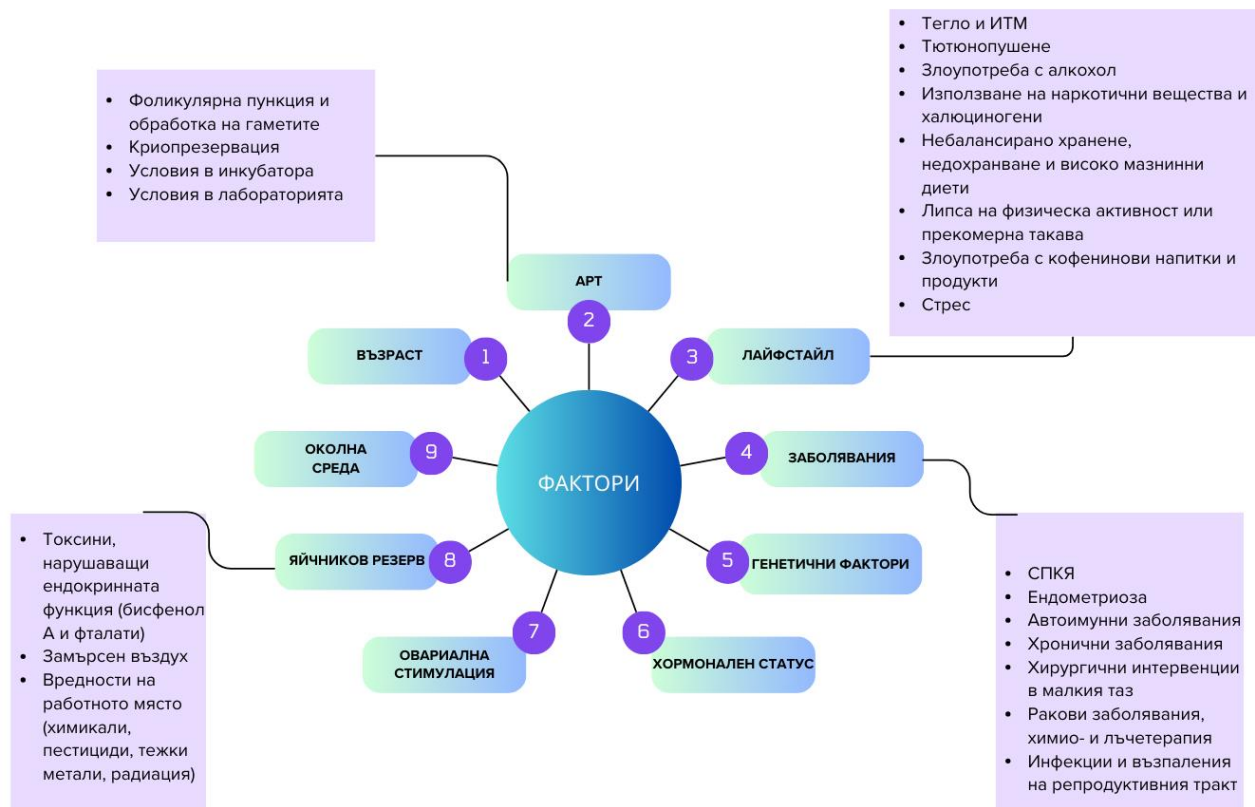
В ежедневието си хората са изложени на редица токсични и вредни влияния от околната среда. Най-важните и имащи отношение към фертилитета са:

- Токсини, нарушаващи ендокринната функция (бисфенол А и фталати)
- Замърсен въздух
- Вредности на работното място (химикали, пестициди, тежки метали, радиация)

9. Асистиращи репродуктивни технологии

Добиването на гаметите и тяхното манипулиране в лабораторни условия са свързани с редица рискове за тяхното унищожаване или неправилно развитие заради субоптимални условия на манипулиране и инкубиране. Най-критичните точки са:

- Фоликуларна пункция и обработка на гаметите
- Криопрезервация
- Условия в инкубатора
- Условия в лабораторията



Фиг. 19. Обобщена визуализация на факторите, влияещи върху овоцитното качество, генерирани чрез ИИ

ОБОБЩЕНИЕ:

Управлението на факторите посредством систематизация и имплементиране в удобна за навигация таблична форма е част от съвременните методи за изготвяне на цялостна и пълна картина на репродуктивните проблеми на конкретната пациентска двойка и прецизно изготвяне на индивидуален терапевтичен план.

Обединението и класифицирането на фактори с потенциално влияние върху яйцеклетките дава добра предиктивност при консултиране и лечение на пациенти с инфертилитет относно очакваният яйчников отговор на стимулацията, броя и качеството на яйцеклетките, техния оплодителен потенциал, както и очакваните шансове за постигане на бременност. В същото време дава и възможност за коригиране или отстраняване на редица фактори, за да бъдат съответно повишени и шансовете за успех от лечението. Това са най-вече факторите, свързани с начина на живот, както и по-строг мониторинг контрол върху някои заболявания, имащи отношение към фертилитета, подлагането на хирургични интервенции ако това е нужно преди започване на процедурата и т.н.

Използването на съвременните технологични достижения и частност изкуственият интелект е от критично значение за бъдещето на асистираните репродуктивни технологии и на медицината като цяло. В асистираната репродукция като модерна и високо технологична дисциплина новите технологии винаги са приемани и утилизирани с бързи темпове. Работи се в различни направления, в които използването на тази съвременна технология може да помогне за подобряване на резултатите от лечение на пациенти с инфертилитет. Използваният модел успешно генерира класификация, в която за всички включени фактори има литературни данни за потенциално влияние върху женските гамети и присъстват в класическата класификация. Различен е подходът на AI към групирането в сравнение с класическото систематизиране – в класификацията, предложена от изкуствения интелект факторите са групирани по сходност на техния произход.

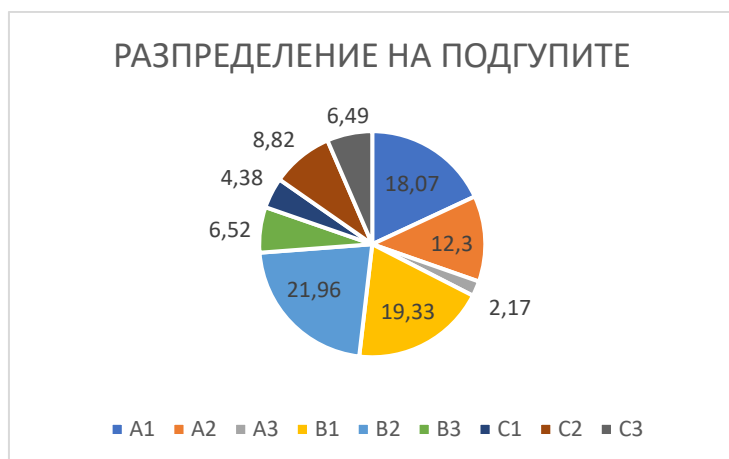
IV.3. Предложение за нова система за оценка на яйцеклетките OVOSCORE, с висока информативна и предиктивна стойност, базирана на морфо-физиологични характеристики и анализ на резултатите и ефективността и по отношение на оплождане, качество на ембриони и имплантация.

По време на лабораторното оплождане обикновено качеството на овоцитите се оценява визуално чрез морфологични критерии под инвртетен микроскоп. Основният недостатък на метода е, че субективен, защото се основава на чисто качествени критерии, зависи от оператора и изисква години обучение. В статия от 2022 г. екип изследователи от няколко научни институции във Франция правят ревю на литературата по темата и изводът, до който достигат е, че морфологичната оценка си остава основният и най-достъпен метод за анализ. Паралелно с това в препоръките на ESHRE за добра лабораторна практика не е посочена нито една конкретна система за оценяване качеството на яйцеклетките, но се подчертава важността от акуратното отразяване на морфологичните им особености. Това налага всяка лаборатория да избере по какъв начин да отразява овоцитното качество в документацията на пациентите, или изобщо дали да присъства подобна информация.

В САГБАЛ „Д-р Щерев“ цялата информация относно цикъла на лечение на двойките се отразява акуратно и детайлно в медицинските им досиета и поради тази причина нашият екип създаде собствена система за оценка - OVOSCORE, данните от които са анализирани в настоящото изследване.

Анализирахме данните от 468 цикъла, при които бяха добити 4127 кумулусно-ооцитни комплекса. Годни за оплождане бяха 3083 от тях и те бяха оценени според системата OVOSCORE, като са проследени резултатите от оплождане, формация на бластоцисти и в случаите, в които е възможно да се отчете процент постигнати бременности.

След морфологична оценка чрез инвртетен микроскоп и оценяване на функционалните характеристики при инжектиране чрез микроманипулатор, всички яйцеклетки бяха разпределени в различните групи и подгрупи, демонстрирани на фиг. 20.



Фиг. 20. Процентно разпределение на подтиповете яйцеклетки

С най-висока честота са окачествяваните като тип В (47,81%) от ембриологичният екип, като сред тях най-често срещаните подтипове са В1(19,33%) и В2 (21,96 %) и в значително по-нисък процент В3 (6,52%). В по-нисък процент са оценявани яйцеклетките тип А (32,5%), които по високите критерии на работещият екип трябва да са „перфектни“ и да отговарят на абсолютно всички определения за добра яйцеклетка. От тях по време на ICSI процедура най-голям процент (18,07% от общата популация) са демонстрирали нормален физиологичен отговор при пенетриране с инжекционната пипета и са окачествени като най-високият клас А1, при 12,3% се е наблюдавал леко понижен тургур и еластичност и са оценени като А2 и в най-ниският дял от всички подгрупи попадат яйцеклетките тип А3 (2,17%), при които се наблюдават отлични морфологични характеристики и цитоплазма с нарушена ултраструктурна композиция, които не демонстрират компактност по време на оплождане. Най-малък относителен дял заемат яйцеклетките тип С (19,69%), при които има ясно открояващи се 2 или повече тежки морфологични дефекти. При тях в съответствие с външните им показатели, най-често се срещат типовете С2 (8,82%) и С3 (6,45%) и с относително рядка честота С1 (4,38%).

Възраст и качество на яйцеклетки

Пропорционалното разпределение на броя яйцеклетки в различните възрастови групи очертава нарастващ дял на гаметите с морфологични отклонения с увеличаване на средната възраст на лекуваните жени. След прилагането на двойния модел за оценка чрез OVOSCORE обобщената картина демонстрира синхронност между влошените морфологични и физиологични характеристики при стареещите яйцеклетки (табл. 11).

Табл. 11. Корелация между тип и подтип яйцеклетки и възраст

тип яйцеклетки	възрастова група
----------------	------------------

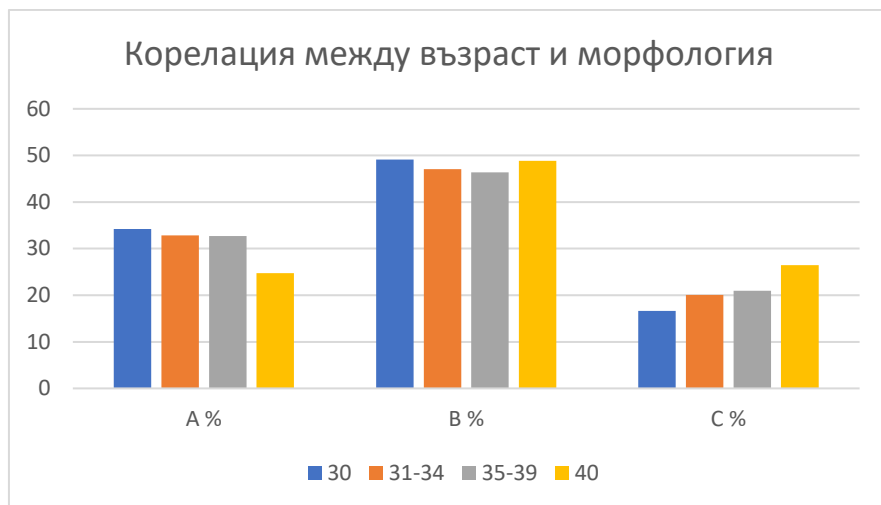
	30	31-34	35-39	40
A1	193	155	159	50
A2	152	129	75	22
A3	31	20	14	2
общо	376	304	248	74
B1	218	162	148	68
B2	249	216	154	58
B3	73	58	50	20
общо	540	436	352	146
C1	33	45	37	20
C2	97	78	63	34
C3	53	63	59	25
общо	183	186	159	79

При сравняване на пропорциите яйцеклетки в различните възрастови групи, тестът Critical Chi-square cut off test установява сигнификантна зависимост ($p = 0.0212$) между групата на най-младите до 30 г. и групата на най-възрастните над 40 г. жени в пропорцията на процентното съотношение на яйцеклетки с отлично качество тип А.

Анализът показва хомогенност между всички възрастови групи по отношение на яйцеклетките тип В.

Достоверни различия бяха установени при сравнение на пропорциите яйцеклетки, оценени като най-лоши по отношение на своите морфологични прояви. Силна статистическа разлика беше отчетена отново между най-младата и най-възрастната група пациентки ($p = 0.0012$), като се установява положителна корелация между увеличаващата се средна възраст и броя на гаметите с отчетлив дисморфизъм (фиг. 21).

Данните, получени от статистическият анализ потвърждават хипотезата, че съществува неразривна връзка между овоцитното остаряване на генетично, ултраструктурно и морфологично ниво. Въпреки че няма много изследвания по темата, това съждение е подчинено на логиката, че натрупването на изменения на молекулярно ниво оказва влияние върху цялостния органел и клетка и нашият анализ го затвърждава. Като cut-off граница можем на базата на получените резултати да посочим възрастта от 40 години, след която пропорцията от яйцеклетки с различни дисморфизми чувствително се увеличава и това корелира и с резултатите от лечението чрез АРТ.



Фиг. 21. Корелация на основните групи и възрастта

Резултати от оплождане

С цел да установим има ли достоверна зависимост между фертилизационен индекс и морфо-физиологични особености на яйцеклетките, анализирахме групите и подгрупите, дефинирани чрез системата OVOSCORE по отношение на техните резултати от оплождане.

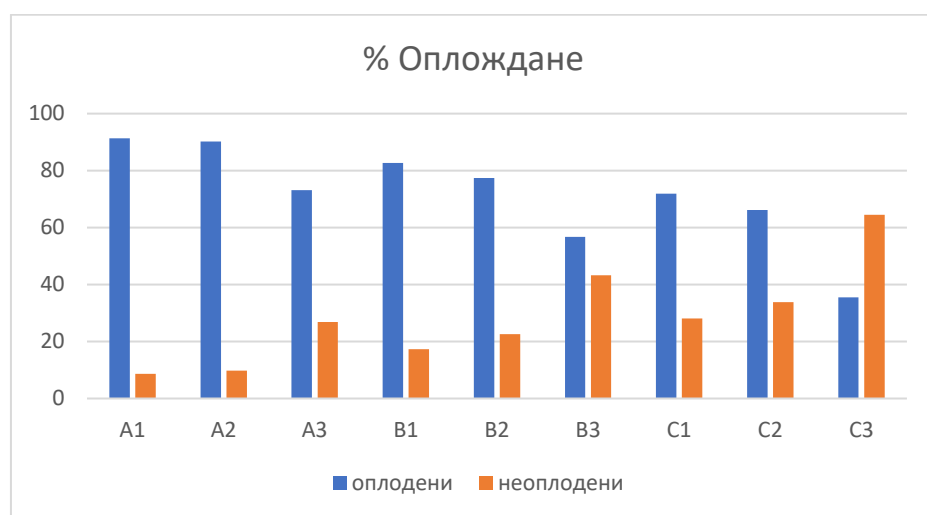
Средните стойности на оплождане, дефинирани от Виенският консенсус варират между 70 и 80%. От направения статистически анализ чрез теста на Kruskal-Wallis се установи, че има ясна статистическа разлика между изследваните групи. Наблюдава се отчетлива тенденция за намаляване на дела на оплодените яйцеклетки с влошаване тяхното морфологично качество (табл. 12).

Табл. 12. Резултати от оплождане на подтиповете яйцеклетки

	да	не	общ брой	% да	% не
A1	509	48	557	91,382406	8,617594255
A2	340	37	377	90,185676	9,814323607
A3	49	18	67	73,134328	26,86567164
B1	493	103	596	82,718121	17,28187919
B2	524	153	677	77,400295	22,59970458
B3	114	87	201	56,716418	43,28358209
C1	97	38	135	71,851852	28,14814815
C2	180	92	272	66,176471	33,82352941
C3	71	129	200	35,5	64,5

Аналогични са резултатите и при оценка на функционалните параметри – колкото по-слабо вискозна е цитоплазмата и нееластична мембраната, толкова по-висока е пропорцията на неоплодените гаметети. В една от подгрупите – С3, в която са налице най-лошите морфо-функционални параметри, квотата на неоплодените яйцеклетки е по-голяма от оплодените.

При статистическа обработка на данните в подгрупата на А тип яйцеклетките не се открива сигнификантна зависимост между А1, А2 и А3 тип яйцеклетките. В останалите 2 групи обаче – В и С, се отчитат достоверни различия при сравнение на подгрупите ($p < 0,05$) (фиг. 22).



Фиг. 22. Оплождане в подгрупите

Представените резултати сочат, че показателите, свързани с оплодителния потенциал на яйцеклетките бележат ясна негативна тенденция с влошаването на морфо-физиологичните показатели на гаметите.

Дегенерация след ICSI

Важен показател при отчитане на оплождане е процентът дегенерирали след манипулацията гаметети. За да установим потенциална връзка между морфо-физиологичните характеристики на овоцита и рискът от дегенерация след ICSI, проследихме и сравнихме процентите дегенерирали яйцеклетки след манипулиране.

На табл. 13 е представено численото и процентно изражение на оплождането на яйцеклетките в различните подгрупи и дела на дегенериралите след манипулацията:

Табл. 13. Процентно разпределение на дела оплодени, неоплодени и дегенерирали след инжектиране яйцеклетки

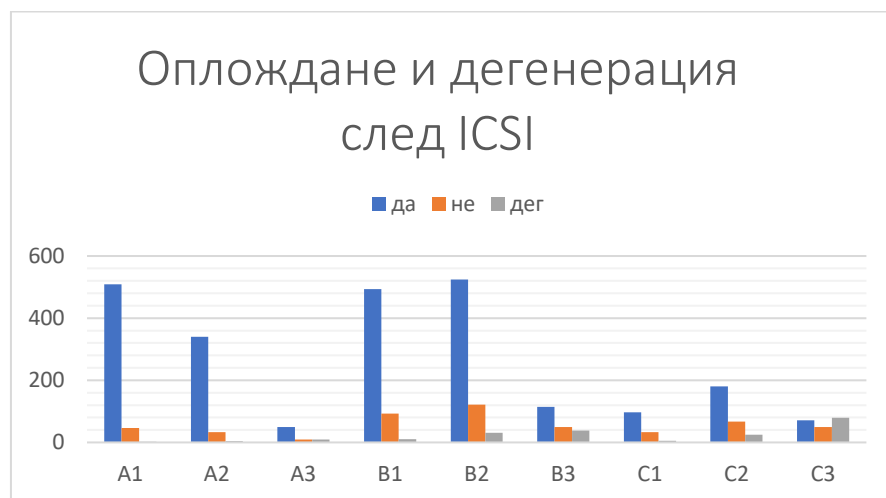
	оплодени	неоплодени	дегенерирали	общо	% дегенерирали
A1	509	46	2	557	0,36
A2	340	33	4	377	1,1
A3	49	9	9	67	13,43
B1	493	93	10	596	1,68
B2	524	122	31	677	4,58
B3	114	49	38	201	18,91
C1	97	33	5	135	3,7
C2	180	67	25	272	9,19
C3	71	50	79	200	39,5

Анализът на резултатите показва висок дял на дегенериране при овоцитите, чиито физиологични показатели са оценени като категория 3 – това са яйцеклетки с ниска плътност на цитоплазмата и нееластични мембрани, които лесно се късат при пенетрация на инжекционната пипета и не оказват съпротивление. В границите на подгрупите се установиха сигнификантни различия по отношение на дегенериралиите овоцити.

Между подгрупи A1 и A2 липсват достоверни различия ($p = 0.1704$), но при сравнение с A3 се установява силна статистическа разлика и при двете подгрупи ($p < 0,001$).

Аналогични са данните при изчисляване на достоверни зависимости в подгрупите B1, B2 и B3. За разлика от тях, при група C посредством множество сравнение по метода на Dunn се отчетоха значими различия във всяка една от подгрупите, сравнена с останалите.

За да отчетем допълнителното влияние на морфологичният фактор към прогнозата за дегенерация на яйцеклетките, сравнихме подгрупите A3, B3 и C3 и установихме липса на сигнификантност между A3 и B3 ($p = 0.3413$) и наличие на отчетлива разлика при сравнение на всяка една от двете подгрупи с C3 ($p < 0.0001$) (фиг. 23).



Фиг. 23. Оплождане и дегенерация след инжектиране

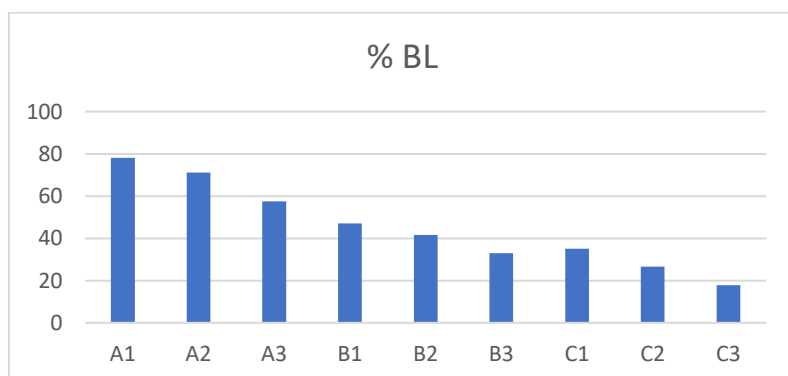
Макар и единични, има публикации, които са изследвали темата и свързват оплодените яйцеклетки с присъствието на значително по-голяма ICSI фуния, в сравнение с дегенериралите. Именно физиологичните характеристики са тези, които имат най-голямо отношение към успешното извършване на манипулацията. Нашето проучване потвърждава изнесените данни и подчертава важността на физиологичните характеристики на яйцеклетките като предиктивен белег за техният оплодителен потенциал и риск от дегенерация. Като допълнение към публикуваните данни можем да добавим и получените от нас резултати, в които комбинирането на физиологичните характеристики на яйцеклетката с нейното морфологично качество посредством системата OVOSCORE дава оценка с висока прогностична стойност за оплождането и дегенерацията след ICSI.

Бластоцистна формация

Само част от генерираните чрез методите на АРТ ембриони достигат стадий бластоцист. За да направим връзка между морфо-физиологичните показатели на овоцита и вероятността за бластоцистна формация, анализирахме данните за да отчетем колко от оплодените яйцеклетки са достигнали до този стадий при култивирането им до ден 5.

В група А бластоцистната пропорция достига до 74, 16%, в група В е 43,22% и в група С пада до 27,24%. При множествено сравнение между всички групи се отчита достоверна разлика ($p < 0.0001$).

По отношение на подгрупите, тестът проведен посредством Marasculio's procedure for comparing multiple proportions не откри сигнификантни различия в границите на самата група. Установиха се значими различия при сравняване на А1, А2 и А3 подгрупите с всяка една друга подгрупа ($p < 0.0001$) (фиг. 24).



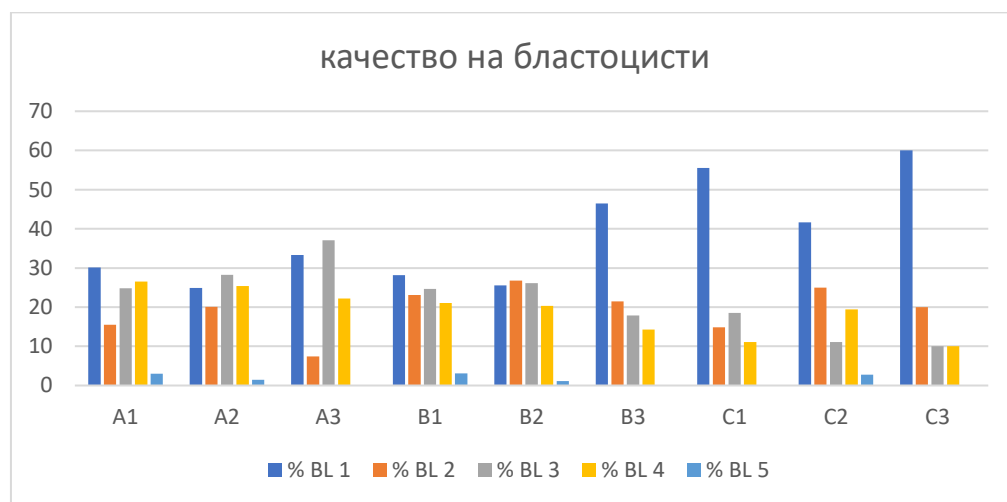
Фиг. 24. Процент получени бластоцисти в подгрупите

Настоящото проучване потвърждава изнесените данни за корелацията между характеристиките на женската гамета и капацитета на ембриона и подчертава водещата роля на морфологичния критерий като прогностичен фактор.

Качество на бластоцисти

Освен количественото измерване на процента бластоцистна формация, получен от кохортата зиготи, важен показател за потенциала на бластоцистите е тяхното качествено оценяване. Една от целите на нашето изследване е да свържем морфо-физиологичните характеристики на яйцеклетките и качествените показатели на получените бластоцисти.

При анализ на подгрупите се установи, че в при A3, B3 и C3 не се отчита нито един излюпващ се бластоцист. Пропорциите на бластоцистно качество запазват своята сравнимост и единствено в при подгрупите C1, C2 и C3 делът на ранни бластоцисти BL1 е достоверно по-висок в сравнение с останалите подгрупи ($<0,05$) (фиг. 25).



Фиг. 25. Разпределение на бластоцистите по качество при подтиповете яйцеклетки

Нашите резултати потвърждават литературните данни за първостепенното значение на морфологичната оценка и добавят като допълнителен предиктивен фактор за качество на бластоцистите функционалните параметри на яйцеклетката по време на оплождане.

Резултати от имплантация

Само малка част от първоначално добитите овоцити достигат до ембриотрансфер. Анализ беше възможно да се извърши в още по-малък процент от тези цикли – само в случаите, в които имаме 0% или 100% имплантация.

Данните от получените бременности в трите основни морфологични групи, демонстрирани на фиг. 63 показват ясна тенденция за намаляване на броя успешни бременности с

увеличаване на морфологичния дисморфизъм. Процентът успешни бременности в група А достига 66,5% КБ/ЕТ. За група В той е 23,88% и в група С пада до 11,39%.

Статистическата обработка показва силни достоверни разлики между групите А и В ($p < 0.0001$), както и значима разлика между В и С ($p = 0.0185$). Между група А и С очаквано се установява също силна сигнификантна разлика ($p < 0.0001$).

При разглеждане на постигнатите бременности в различните подгрупи, тенденцията се запазва същата (табл. 14). В подгрупа В3 и С3 няма регистрирана нито една получена бременност. Въпреки че поради малките бройки яйцеклетки, които попадат в различните подгрупи статистически анализ е трудно да бъде направен, резултатите които се получават са убедителни и закономерни.

Табл. 14. Брой и процент получени имплантации

имплантация					
	да	не	общ брой	% да	% не
A1	85	39	124	68,5484	31,4516
A2	47	28	75	62,6667	37,3333
A3	7	3	10	70	30
B1	33	70	103	32,0388	67,9612
B2	20	78	98	20,4082	79,5918
B3	0	21	21	0	100
C1	2	22	24	8,33333	91,6667
C2	7	33	40	17,5	82,5
C3	0	15	15	0	100

Данните от нашето проучване подкрепят публикациите, откриващи корелация между овоцитното качество и резултатите от проведения цикъл на лечение. Направените подробни изследвания върху вискозитета на цитоплазмата, еластичността на оволемата и наличието на инжекционни фунийки дават допълнителни данни, че и функционалните характеристики също имат отношение върху крайният резултат и могат да бъдат включени като добавъчен фактор с добра информационна стойност към цялостната оценка на овоцита.

ОБОБЩЕНИЕ:

Препоръките на Европейската асоциация за добра лабораторна практика препоръчва овоцитното качество да се документира при извършване на процедурите по оплождане без да посочва конкретна система за това. Редица автори, изследващи овоцитите подчертават

корелацията между качество на яйцеклетки, качество на ембриони и успеваемост от процедурата, но в същото време отбелязват, че липсата на унифицирана система кара всеки работен екип да прилага свои собствени методи за оценка на гаметите и различни начини за документирането им. Според анкета, проведена на XVII конгрес на Българската Асоциация по Стерилитет и Репродуктивно здраве (БАСРЗ) само в единични ин витро лаборатории в България се документира качество на яйцеклетки, като не бяха посочени конкретни оценъчни системи, които се използват.

Проучване показва, че докато компрометираните яйцеклетки имат статистически по-ниски шансове за формиране на добър ембрион, то техните качествени сестрински гамети не са засегнати от този фактор. Ето защо изборът на висококачествени овоцити може да увеличи успеваемостта на оплождането и последващото развитие на ембриона.

- Системата за оценка на яйцеклетките OVOSCORE е лесна за приложение, неинвазивна и не изисква време и допълнителна техника за нейното прилагане.
- Изпълнява препоръките на ESHRE за документиране на качеството на яйцеклетките без да е времеемка и да създава излишни обеми при въвеждане на информацията в компютърната база данни или на хартиени носители.
- Има висока информативна стойност и е добър прогностичен маркер за последващо оплождане, качество на ембриони и имплантация.
- Дава възможност за проследяване на овоцита до ембрион и е част от методите за ембриоселекция чрез т.нар. деселекция, или проследяване на историята на ембриона (embryo history).
- Чрез системата лесно се идентифицират гигантски яйцеклетки и агрегация на гладък ендоплазмен ретикулум, за които има препоръки да бъдат трансферирани само в краен случай при липса на други ембриони.
- OVOSCORE дава информация за качеството на гаметите и е полезен инструмент за репродуктивният специалист при изготвяне на последваща стратегия за лечение след проведен неуспешен опит – в зависимост от резултатите и при история на яйцеклетки с лошо качество прилагане на допълнителни процедури – визуализация на делително вретено, Ca^{++} активация, проследяване чрез тайм-лапс и т.н.
- След неколнократни неуспешни опити при напреднала репродуктивна възраст над 40 години, изчерпан яйчников резерв, решаващ фактор в терапевтичния план може да бъде документираното качество на яйцеклетките – при наличие на основно оценени като тип C, е възможна дискусия с пациентите относно опцията за преминаване към донорска програма като предлагаща по-високи шансове за постигане на бременност.
- Доказва по категоричен начин връзката между морфо-физиологичните характеристики на овоцита и неговия потенциал за оплождане и компетентност на генерирания ембрион. Акумулирането на повече от 1 дисморфизъм сигнификантно понижава неговата перспектива в резултат на кумулативния ефект.

Като заключение може да се подчертае фундаменталното значение на акуратната оценка на само на ембрионите, но и на овоцитите като част от добрата лабораторна практика с цел селекция, проследяване и оценка на качествените овоцити като важен инструмент за по-успешна ембриоселекция с цел постигане на по-висока честота на клинични бременности.

IV.4. Анализ на ефективността от прилагане на допълнителни лабораторни методики за повишаване шанса за оплождане на яйцеклетките след прилагане на методиките активация с калциев йонофор и визуализация на мейотичното вретено чрез полоскоп.

В последните години има разработени редица допълнителни техники, целящи подобряване на резултатите при пациентски двойки, при които в цикъла на предходно лечение има установен проблем в гаметите или ембрионите, намаляващ техните шансове за успех. При яйцеклетките има ограничени възможности за работа поради лимитирания им брой и невъзможност за селекция. Най-често прилаганите методики при тях са активация със среда с калциев йонофор и визуализация на мейотичното вретено с полоскоп.

Асистирана овоцитна активация

За да изследваме ефективността от прилаганата допълнителна методика, анализирахме данните при пациентски двойки, провели 74 цикъла на лечение, разделени в 2 групи в зависимост от това дали е прилагана допълнително техниката или не.

В Група 1 общо 175 зрели МII яйцеклетки са подложени на оплождане. На ден 1ви 49 от тях са оплодени. Средният процент на фертилизация в групата е 24.7%.

В група 2 са инжектирани 162 яйцеклетки с нормална матурация, които след това са инкубирани в продължение на 15 минути в среда с Ca^{2+} ionophore. 99 от тях проявяват признаци на оплождане, като средният процент за тази група е 65%. ($p < 0.0001$).

При 18 от двойките (19 цикъла) в Група 1 се отчита пълна липса на оплождане и съответно не е извършен трансфер. Резултатът се повтаря при 2 от тези двойки и при опит с приложена калциева активация (3 цикъла).

Адекватното развитие на ембрионите и преминаването им във всеки стадий на развитие беше мониторирано и оценено в следващите дни. При 7 от опитите в контролната група и при 1 от групата с калциева активация трансферът се канселира, поради бавно делене и стационариране на ембрионите.

Ембриотрансфер и бременности

От всички 44 проведени цикъла на лечение в група 1 едва при 18 (41%) се достигна успешно до провеждане на ембриотрансфер. Клинични бременности се установиха при 2

от двойките (11.1%), които завършиха със спонтанен аборт в първи триместър от бременността.

В група 2 се реализираха 26 трансфера от 30 опита (83.3%) след допълнително активиране на подложените на ИКСИ яйцеклетки. Отчетени са 16 бременности (61.5%), като 14 от тях са нормално развиващи се, а 2 са приключили с липса на сърдечна дейност и ранен аборт. При 2 от пациентските двойки има оставащи ембриони с добри характеристики, които се замразяват и при тях бременност настъпва след размразен ембриотрансфер (табл. 15)

Табл. 15. Основни данни за изхода от лечението

	общ брой цикли	брой цикли с оплождане	брой цикли с ЕТ	брой бременни	КБ/ЕТ %
група 1	44	25	18	2	11.1%
група 2	30	27	26	16	61.5%

Като обобщение, от 28 пациентски двойки, провели между 2 и 5 опита за лечение на инфертилитет в рамките на 3-годишен период, при 16 от тях настъпи клинична бременност (57%), която се развива нормално - в 14 от случаите от свеж и в 2 от случаите от размразен трансфер. Установени бяха 2 двуплодни бременности, 1 от които с еднояйчни близнаци. Повтаряемост на резултат с липса на оплождане се отчете при 2 партньорски двойки, които бяха насочени към медико-генетична консултация и обсъдени опции за ползване на дарителски гамети.

Установените при проведеното проучване резултати по категоричен начин потвърждават публикуваните вече данни за успешното приложение на асистираната овоцитна активация в лечението на пациенти с инфертилитет. Наблюдава се подобрене не само в процента на оплодените яйцеклетки, но и в качеството на получените ембриони – в циклите, в които е използван Ca^{2+} ionophore само един е канселиран поради неадекватно делене на ембрионите. Положителният ефект от тази методика предполага все по-широкото и приложение в ембриологичната лаборатория. Методът може да се използва както самостоятелно, така и в комбинация с други техники за постигане на оптимален резултат.

Spindle view

За да отчетем ефективността на методиката, обобщихме данните при 24 пациентки на възраст над 40 години с добити до 3 зрели яйцеклетки и сравнихме резултатите с аналогична група от 72 жени, при които не е приложена тази техника.

При 15 (32%) от яйцеклетките, въпреки наличието на второ полярно телце, индикиращо цитоплазмена зрялост, не се визуализира характерната структура, показваща формираното вече делително вретено (табл. 16). При 31 от тях визуализацията беше успешна, като 22

яйцеклетки (48%) имаха нормално разположено делително вретено в областта под първо полярно телце, а при 9 (20%) се установи изместване в латерална посока.

Табл. 16. резултати от визуализацията с полюскоп

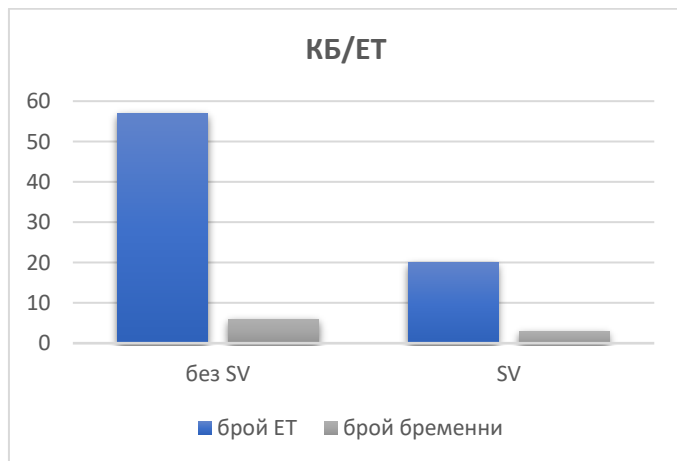
визуализация SV		не се визуализира
правилна позиция	изместване	
22	9	15

ICSI и оплождане

Всички зрели яйцеклетки, независимо от това дали се визуализира мейотичното вретено или не, бяха подложени на ICSI процедура, като за тези от тях, при които беше установено изместване, инжекционната пипета се позиционира на 90 градуса спрямо мястото на делителното вретено. На 18ти час беше отчетено 73% оплождане в изследваната група и 68% в контролната. Въпреки по-добрите резултати, не беше установена статистическа разлика ($p = 0.6475$).

Ембриотрансфер и бременности

В изследваната група при 20 от случаите (83%) се достигна до извършване на ЕТ, докато при контролната група беше извършен ЕТ при 57 от циклите (79%). Бяха установени 3 клинични едноплодни бременности в групата на spindle view и 6 едноплодни бременности в контролната група (фиг. 26).



Фиг. 26. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

Въпреки по-високият процент получени бременности (15% КБ/ЕТ на изследваната и 10,53% КБ/ЕТ на контролната група), не беше отчетена посредством анализ чрез Pearson's chi-square test статистическа по-добра успеваемост ($p = 0.5949$).

Визуализирането на мейотичното вретено в лабораторни условия преди да се пристъпи към процедура на оплождане би могло да даде информация за това, образувала ли е яйцеклетката стабилна делителна структура и пространствено къде е разположена тя. Липсват категорични данни както в публикациите по темата, така и в нашето изследване за ефективността на прилагането на тази допълнителна методика. Лимитиращ фактор се оказва и високата цена на специализираната апаратура и софтуер. Въпреки това, всяка модерна ембриологична лаборатория трябва да бъде оборудвана с най-новите технически средства, за да може да посрещне нуждите при по-сложни и специфични случаи на пациенти, обърнали се за помощ и лечение.

ОБОБЩЕНИЕ:

Допълнителните техники, които се предлагат извън стандартното ин витро оплождане се увеличават с напредването и развитието на модерните технологии. Някои от тях с течение на годините губят своята актуалност, но други са доказали своята висока ефективност и са неизменна част от лечението на двойки, при които не настъпва бременност чрез конвенционалните методи на лечение. Изследователите са в непрекъснато търсене на нови методи, които ще са следващата голяма стъпка към подобряване на резултатите от ин витро процедурите, които в последните години поради все по-увеличаващата се средна възраст на пациентките бележат спад. Напоследък всички погледи и надежди са свързани с прилагането на изкуствен интелект в АРТ технологиите и въпреки че засега той основно се използва за неинвазивна високо специализирана оценка и селекция, работата с него продължава по направление подобряване качеството на овоцитите и предотвратяване на хромозомни грешки, водещи до анеуплоидни ембриони.

Колкото и допълнителни методи да съществуват и да се предлагат в ембриологичните лаборатории, на тяхната ефективност може да се разчита, единствено когато съществуват строго определени индикации за тяхното прилагане. Ето защо всеки случай трябва да бъде внимателно разглеждан от екипа репродуктивни специалисти и ембриолози и подхода да бъде строго индивидуален, за да се очакват оптимални резултати от лечението.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Овоцитът е уникална и високо диференцирана клетка, която е отговорна както за създаването и активирането така и за контролирането на ембрионалния геном, поддържането на основни процеси като клетъчна хомеостаза, метаболизъм и прогресия на клетъчния цикъл в ранния ембрион. По време на овогенезата яйцеклетката трябва да натрупа компонентите, които са необходими за поддържане на ранния метаболизъм и физиологията на ембриона, както и компоненти, необходими за завършване на мейозата, инициране на прогресията на клетъчния цикъл и насочване на събитията в ранните етапи от развитието на новосформирания организъм. Овоцитът трябва да комбинира двата хаплоидни генома в един ембрионален геном, да активира транскрипцията на този геном в точното време и да активира подходящия набор от гени, които да бъдат транскрибирани. Овогенезата е критично зависима от правилното протичане на множество високо специализирани молекулярни механизми. Всяко едно нарушение на тези фини процеси, провокирано от различни фактори могат да компрометират качеството на яйцеклетките, което може да доведе до дълготрайни последици, свързани с анормално протичане на последващите фази на мейозата, намалена оплодителна способност, лошо качество на ембрионите и епигенетични дефекти, които засягат дългосрочното здраве на потомството.

Анализът и отдиференцирането на факторите, оказващи негативно въздействие върху качеството на яйцеклетките, може да послужи като основа за набелязване на редица мерки за превенция на негативните последици за репродуктивното здраве на жената.

Възрастта се откроява като безспорно най-съществен фактор, оказващ критично въздействие върху всички етапи от цикъла на лечение чрез АРТ и главен прогностичен критерий предопределящ крайният резултат. Отлагането на бременност за по-късен етап от живота носи редица рискове както от трудно постигане на имплантация и бременност, така и от висока честота на спонтанни аборти в първия триместър на бременността и повишен риск от хромозомни аномалии при фетуса.

Редица други фактори, като наднормено тегло, тютюнопушене, лоша диета, възпалителни заболявания също оказват частично негативно влияние и техният кумулативен ефект значително намалява шансовете за успешна репродукция.

Компетентността на овоцита е детерминанта за успеха от лечение чрез АРТ, тъй като овоцитите осигуряват практически всички клетъчни градивни елементи, включително митохондриите, необходими по време на ембриогенезата. Акуратното отразяване на тяхното качество по време на процедурата по оплождане може до голяма степен да прогнозира потенциала на всяка яйцеклетка, както и да послужи за отправна точка при последващ план за лечение и прилагане на допълнителни методики за повишаване на успеваемостта след неуспешен ин витро опит.

Холистичният подход и персонализираната медицина имат широко приложение при лечението на пациенти с инфертилитет с женски фактор. Идентифицирането на факторите, които оказват негативно или позитивно въздействие върху качеството на яйцеклетките позволява на лекуващият екип да даде най-подходящите препоръки и да избере оптимален план за лечение на двойката. Редуцирането или пълния отказ от редица вредни навици, промяна в хранителния и двигателния режим, подходяща суплементация биха променили в голяма степен прогнозите за успех от ин витро процедурата. Детайлното отразяване на качеството на гаметите и ембрионите дава нов инструмент в ръцете на лекуващия специалист какво би могло да се коригира и надгради ако е необходим нов цикъл на стимулация и оплождане.

Въпреки достиженията на съвременната медицина обаче, процентът постигнати успешни бременности и раждания от години се движи в сравнително ниски граници и това мотивира екипи от цял свят да правят множество изследвания и тестове, да изпитват различни методи и техники и да разработват иновативна апаратура, за да се преодолее платото на успеваемост и репродуктивната медицина да премине на следващото ниво от своето развитие.

Анализът и резултатите, обобщени в този дисертационен труд, подчертават наистина забележителните качества на яйцеклетката, която е надарена със универсални способности да комбинира собствените си компоненти и генетичен материал с този на навлезлия в нея сперматозоид и да даде началото на уникален нов организъм и да изведе на преден план нейната фундаментална значимост за целия процес на лечение.

ИЗВОДИ

1. Възрастта на жената се откроява като прогностичен фактор с най-висока достоверност. Във всички възрастови групи се отчита обратна корелация между средния брой добити яйцеклетки и възрастта на лекуваните пациентки.
2. Не се открива корелация между брой яйцеклетки и стойности на ИТМ. Статистически по-ниски резултати при установяване на бременност се отчитат, когато е налице наднормено тегло $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ или затлъстяване $\geq 30 \text{ kg/m}^2$.
3. Тютюнопушенето е фактор, който не повлиява пряко овоцитното качество и при жените пушачки не се отчитат занижени резултати след КОХ.
4. Серумните нива на FSH са биологичен фактор с влияние върху овоцитната компетентност. За граница може да се приемат стойности над 12 IU/l, при които се установяват достоверно по-ниски резултати както при количеството на добити яйцеклетки, така и при процентът успешни имплантации.
5. Ендометриозата има отражение върху добива на яйцеклетки. Статистически по-висок брой яйцеклетки се получават при жени, които са клинично здрави в сравнение с такива с ендометриоза.
6. Някои от лабораторните фактори, имащи отношение към жизнеспособността на яйцеклетките и техния оплодителен потенциал в миналото, като ICSI процедура и криоконсервация, вече губят своята актуалност в условията на съвременната ембриологична лаборатория.
7. Най-често срещаните фактори в научната литература биха могли да се управляват, посредством екстапулиране в удобен и лесен за използване табличен вид. Управлението на факторите посредством таблична визуализация е инструмент, който насочва консултиращият специалист към индивидуален терапевтичен подход в зависимост от присъствието и значимостта им при конкретната пациентка.
8. Факторите с вътрешно влияние могат да се разделят на 2 подгрупи – с индиректно въздействие (до фоликулярната пункция), които не повлияват пряко самия овоцит и такива, които имат директно въздействие, след като яйцеклетките са аспирирани извън тялото на жената и върху тях непосредствено се извършват разнообразни манипулации.

9. Чрез поредица от насочени команди и въпроси ИИ генерира нова класификация на факторите, диференцирани в 9 отделни категории. Всички утвърдени фактори са отразени в класификацията, създадена чрез ИИ, различен е подходът им на обединяване от стандартният, който ги разделя в 2 големи категории.
10. Системата за оценка на яйцеклетки OVOSCORE достоверно отразява потенциала и компетентността на овоците. Ембрионите, получени от яйцеклетки, оценени с добро качество са с по-добри характеристики и шансове за имплантация.
11. Асистираната овоцитна активация чрез калциев йонофор е подходящ метод за повишаване на фертилизационният капацитет. Достоверно по-висок процент оплождане се постига чрез прилагане на тази методика, което се отразява и в по-висок дял на постигнати бременности.
12. Визуализацията на делителното вретено при пациентки над 40г. с намален яйчников резерв може да даде достоверна картина за качеството на техните гамети. Прилагането на методиката не води до чувствително повишаване на успеваемостта, но може да бъде решаващ фактор при консултиране на пациентската двойка за преминаване към програма с донорски яйцеклетки.

ПРИНОСИ

1. За пръв път у нас задълбочено е разработена темата за качеството на овоцитите на български пациентки, лекуващи се чрез методите на АРТ.
2. За пръв път се обработват данни за такава голяма кохорта български пациенти – 9016 и се анализират резултатите за 67 187 яйцеклетки с висока репрезентативна стойност.
3. Доказана е връзката между редица фактори, като възраст, базални нива на FSH, някои заболявания и компетентността на овоцитите – данни, които могат да послужат за оптимизация на терапевтичния подход.
4. Демонстрирана е изтеклата актуалност на фактори като ICSI процедура и криопрезервация в съвременната ембриологична лаборатория в съответствие с напредъка на медицината и технологиите в последното десетилетие.
5. Принос е изследването на честотата на получаване на зрели МII яйцеклетки след хормонална стимулация, като е доказана положителната корелация с общия брой добити яйцеклетки и фактори, свързани с начина на живот, различни заболявания и т.н.
6. Оригинален принос е предложението за управление на факторите, имащи отношение върху потенциала на овоцитите посредством екстрапулирането им в удобен и лесен за преглед табличен вид, който би послужил на репродуктивните специалисти в процеса на изготвяне на стратегия за лечение в зависимост от индивидуалните характеристики на пациентката.
7. За пръв път се работи по темата фактори, влияещи върху компетентността на яйцеклетките чрез използване на изкуствен интелект.
8. Оригинален принос е предложената нова класификация на фактори, генерирана посредством работа с изкуствен интелект.
9. Оригинален принос е предложената нова система за оценка на яйцеклетките OVOSCORE, базирана на морфологичните особености и физиологичните прояви по време на оплождане с висока предиктивна стойност за фертилизация и качество на ембриони.

10. Изследвана е и е установена корелационна връзка и синхрон между морфологичните, физиологичните и молекулярни процеси в стареещият овоцит.
11. Изследвани са някои допълнителни техники, оказващи положителен ефект върху оплодителната способност на овоцитите, които може да залегнат в терапевтичния план за оптимизиране на изхода от ART при пациенти с предшестващи неуспехи.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Човешката яйцеклетка – исторически преглед и развитие на асистираната репродукция - И. Антонова, М. Юнакова, Н. Магунска, Т. Милачич, Д. Иванов – сп. GP news, бр. , 2020 г.
2. Пациент-специфични фактори, влияещи върху качеството и оплодителния потенциал на овоцитите - Антонова И., Юнакова М., Магунска Н., Бояджиев А., Дюлгерова-Николова Д., Иванов Д., сп. Репродуктивно здраве, бр. 33/2022 г.
3. ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE - European IVF Monitoring Consortium (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) , C Wyns, C De Geyter at al.; Human Reproduction Open, Volume 2022, Issue 3, 2022, hoac022,
4. Oocyte cryopreservation for future reproduction - D. Dyulgerova – Nikolova, I. Antonova, L. Valkova, T. Milachich, T. Timeva, Embryology journal, (volume 13, issue 1/2023)
5. ART in Europe, 2019: results generated from European registries by ESHRE, - European IVF Monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) , Jesper Smeenk, Christine Wyns, Christian De Geyter, Markus Kupka at al. Human Reproduction, 2023;, Volume 38, Issue 12, December 2023, Pages 2321–2338
6. Тютюнопушенето като фактор, влияещ върху качеството и имплантационния потенциал на овоцитите - Антонова И., Юнакова М., Янева Г., Иванов Д., сп. Репродуктивно здраве, бр. 35/2024 г.
7. Хранителни навици и женското репродуктивно здраве – И. Антонова, сп. GP news, бр. 3/2024 г.
8. Лайфстайл фактори, оказващи влияние върху човешката репродукция – И. Антонова, сп. Medinfo, бр. 2/2024 г.
9. Body mass index as a factor influencing oocyte competence and implantation potential distribution and results in 4,882 women undergoing fertility treatment - Antonova I., Ivanov D., Yaneva G., Magunska N., Dyulgerova-Nikolova D., Yunakova M., Shterev A., Acta medica, volume 52 (2024), issue 2

УЧАСТИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Индекс на телесната маса и резултати от АРТ при български пациенти; XIX Конгрес на БАСРЗ, Боровец, България - пленарна лекция
2. The oocyte or the endometrium? Who has the leading role for the impaired implantation rate in morbidly obese women?; 18th World Congress of the Academy of Human Reproduction, - Dublin Ireland – oral presentation
3. Atretic eggs-frequency and factors which increase their production, Yunakova, M., I. Kostov, N. Magunska, and I. Antonova.; HUMAN REPRODUCTION, vol. 36, pp. 411-411. GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND: OXFORD UNIV PRESS, 2021
4. Calcium ionophore activation improves ICSI outcome in patients with history of fertilization failure“ 19th World Congress of the Academy of Human Reproduction - Venice, Italy - oral presentation