



Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет по медицина
Катедра „Акушерство и гинекология“

Д-Р СИМОНА АНЖЕЛ ГЕОРГИЕВА

**ОВАРИАЛЕН ОТГОВОР,
КАЧЕСТВО НА ЕМБРИОНИТЕ
И ИЗВЪНМАТОЧНА БРЕМЕННОСТ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на
научна и образователна степен „Доктор“

Научна специалност 03.01.45. „Акушерство и гинекология“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.1. Медицина

Научна специалност: „Акушерство и гинекология“ (03.01.45)

Научен ръководител:

Проф. д-р Емил Ковачев, д.м.н.

Научни рецензенти:

Доц. д-р Мария Ангелова, д.м.

Доц. д-р Стефан Кисьов, д.м.

Варна, 2020

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на разширен Катедрен съвет на катедра „Акушерство и гинекология“ при МУ– Варна.

Данните за проучването във връзка с дисертацията са предоставени след оторизиран достъп до регистрите на Медицински център за асистирана репродукция „Варна“ ООД.

Дисертационният труд е представен на 131 страници и е онагледен със 7 таблици, 11 фигури, 14 графики и 4 приложения. Библиографията обхваща 289 източника, от които 16 на кирилица и 273 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на

..... 2020 г. от ч.

в

.....

на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – гр. Варна.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ – Варна: www.mu-varna.bg

Съдържание

Използвани съкращения	4
I. Въведение	5
II. Цел	9
III. Задачи	10
IV. Материали и методи.....	11
V. Резултати	27
VI. Обсъждане	42
VII. Заключение	52
VIII. Изводи	53
IX. Приноси	54
X. Публикации, свързани с дисертационния труд	55
XI. Приложения	56

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ART	асистирани репродуктивни технологии
ЕБ	ектопична бременност
ЕТ	ембриотрансфер
ОХСС	овариален хиперстимулационен синдром
ПКОС	поликистозен овариален синдром
КОХ	контролирана овариална хиперстимулация
ЧХГ	човешки хорионгонадотропин
AMX	анти-мюлеров хормон
IVF	ин витро фертилизация
ICSI	интрацитоплазмено инжектиране на единични сперматозоиди
FET	размразен ембриотрансфер
PGD	предимплантационна диагностика
FSH	фоликулостимулиращ хормон
eSET	елективен трансфер на единичен ембрион
ICM	вътрешна клетъчна маса
TE	трофоектодерма
ZP	zona pellucida
PVS	перивителинно пространство

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ин витро фертилизацията (IVF) е въведена първоначално за лечение на инфертилитет, свързан с тубарен произход. Първата бременност след IVF е докладвана през 1973 г. от изследователи в университета Монаш, ръководен от Карл Ууд. За съжаление, бременността е биохимична. Три години по-късно британският биолог и физиолог Едуардс заедно с гинеколога Стептоу съобщават за извънматочна бременност в резултат на IVF (250, 251). През 1978 г. благодарение на техните усилия се ражда първото „бебе в епруветка“, Луиза Браун, в резултат на трансфер на 8-клетъчен ембрион след ин витро фертилизация на преовулаторен овоцит, добит с лапароскопска екстракция от яйчника без предхождаща стимулация.

Повече от 40 години след раждането на първото дете след IVF през 1978 г., броят на ражданията в световен мащаб в резултат на IVF / ICSI надвишава осем милиона. Около 13–15% от двойките имат фертилни смущения и изискват лечение с методите на асистираните репродуктивни технологии.

В България няма официална статистика за броя на двойките с репродуктивни проблеми, както и за заболяемостта и смъртността във връзка с извънматочните бременности. Според първото мащабно проучване в нашата страна, проведено през 1982 година, 7,2% от двойките са с данни за стерилитет. През 2005 година, от доклада за изследване на честотата на безплодието, е установено, че около 15% от двойките са с фертилни проблеми. По данни на социологическо проучване „Изследване на проблемите на репродуктивното здраве“, проведено от Института за социални изследвания и маркетинг МБМД ЕООД през 2013г., двойките с инфертилитет в България са над 145 000. По данни на асоциациите на двойки с инфертилитет в България (фондация „Искам бебе“ и фондация „Зачатие“) броят на двойките с репродуктивни проблеми е около 200 000.

Асистираните репродуктивни технологии (АРТ) са независим рисков фактор за възникване на ектопична бременност (ЕБ), дори при строго спазване на протоколите за работа и при трансфериране на ембрионите директно в кухината на матката. Извънматочната бремен-

ност е потенциално животозастрашаващо състояние с честота около 2% в общата популация и до 8% според някои източници след IVF/ICSI. Редица автори проучват факторите, свързани с АРТ, които повишават вероятността за ектопична имплантация.

Извънматочната бременност е водеща причина за остър хирургичен корем в гинекологията с потенциален риск за живота и здравето на пациентката с честота на повторяемост около 10% (159, 165).

Добре известна е връзката между тубарния стерилитет и извънматочната бременност. Пациентките с анамнеза за тазово-възпалителна болест (най-често след инфекция с *Chlamydia trachomatis*), тубарна хирургия и тютюнопушене са с по-висок риск както след АРТ, така и след естествена концепция.

Първоначално се е смятало, че едновременното трансфериране на няколко ембриона е фактор, повишаващ нивото на имплантация и бременност. През 90-те години повсеместно се е извършвал ембриотрансфер на повече от 2 ембриона, като общата честота на живо раждане е била около 10%, а повече от 25% са били резултат от многоплодна бременност (148, 263).

Мултинумеричният ембриотрансфер е вторият по честота фактор, асоцииран с повишен риск от усложнения като многоплодна и извънматочна бременност (255). В миналото са се трансферирали повече от 2 ембриона с цел повишаване успеваемостта след АРТ. Днес в повечето центрове е възприет елективният ембриотрансфер на един ембрион (eSET) с цел понижаване риска от компликации. Финландия е една от страните пионери, която въвежда тази практика през 1996 г. Целта е да се трансферира най-висококачественият ембрион от кохортата (268, 269). Качеството на ембрионите е една от най-важните детерминанти за постигане на успешна бременност и живо раждане, но към момента няма данни относно риска за ектопична имплантация.

Трансферът на висококачествени ембриони е свързан с по-висок процент на успеваемост при пресни и FET цикли и е основно правило при елективният трансфер на единичен ембрион (eSET). eSET се дефинира като трансфер на един качествен ембрион, когато има най-малко два ембриона с добра морфология в кохортата (198).

Противоречиви са данните относно вероятността за ектопична

бременност след IVF/ICSI по отношение на деня на ембриотрансфер, като според някои автори трансферът на бластоцисти (ден 5) е протективен фактор. Редица проучвания установяват значително по-висока степен на бременност и имплантация в стадий бластоцист в сравнение с трансфера на ембриони в етап на делене (79, 82, 83, 84, 216). Смята се, че честотата на хромозомните аномалии е редуцирана в този етап, тъй като повечето абнормални ембриони не достигат този стадий (109, 121, 127).

През последните години нараства делът на държавите, които ограничават броя на трансферираните ембриони. Във Великобритания прогресивно намалява честотата на многоплодната бременност от 24% през 2009/2010 г., до 15% през 2010 г. и 10% през 2012 г. Белгия съчетава възстановяването на средства по изпълнението на асистирани репродуктивни технологии с ограничаване броя на прехвърлените ембриони и намалява процента на многоплодна бременност от 27% през 2003 г. до 11% през 2010 г. (60). Американското дружество по репродуктивна медицина (ASRM), например, заявява, че „лекарите трябва да бъдат насърчавани да съветват пациентите с добра прогноза да приемат елективния ембриотрансфер (eSET) и подчертава значението на клиничната преценка. При пациентки на възраст под 35 години с благоприятна прогноза „да се трансферира само един ембрион и не повече от два ембриона“ (ASRM, 2012). При пациентки на възраст 38–40 и 41–42 години ASRM посочва, че не трябва да се прехвърлят съответно повече от три и пет ембриона в етап на делене, а на възраст над 43 години няма ограничение (30).

Според някои проучвания размразеният ембриотрансфер (FET) понижава честотата на ЕБ, докато според други няма такава зависимост. В резултат на нарастващия опит, подобряване технологията на замразяване и размразяване на ембриони и повишаване честотата на живи раждания като основен резултат размразеният ембриотрансфер се прилага все по-често в Европа.

Важна детерминанта за резултата от IVF/ICSI е овариалният отговор на стимулация с гонадотропни хормони. Съществуват различни дефиниции на понятието, но напоследък се смята, че включва взаимодействието между количеството на приложените гонадотропини и

броя на аспирираните овоцити (консенсусна дефиниция за слаб яйчников отговор, приета от ESHRE).

Слабо проучена е ролята на овариалния отговор към контролираната овариална хиперстимулация върху вероятността за ЕБ. Стремелът към повишена успеваемост и ниска честота на усложнения след IVF/ICSI налага разработването на стратегии за превенция, анализирани на рисковите фактори и селектиране на пациентите в риск.

В ретроспективен анализ на 658 519 пресни автоложни IVF цикли в база данни на SART (2004–2012 г.) е установено, че при пациентките с лош яйчников отговор (т.е. 1–5 яйцеклетки), независимо от общата доза приложени гонадотропини ниска (< 1000 IU FSH) или висока (> 5000 IU FSH), честотата на постигнатите бременности е пониска в сравнение с пациентките с добър яйчников отговор (т.е. 11–15 яйцеклетки) със сходна стимулация, съответно 21,7 срещу 46,5% и 12,5 срещу 26,2% (33, 34, 35). Резултатите от това проучване обаче разкриват схващането на мнозина, че успеваемостта след АРТ при пациентки с лош отговор към стимулацията в повечето случаи е силно понижена, като нивото на постигнатите бременности е > 50% в цикли с култивиране до стадий бластоцист и последващ размразен ембриотрансфер. Това потвърждава заключенията от предишни проучвания, които показват, че репродуктивните резултати от FET са по-добри в сравнение със свежите цикли при пациентки с добра прогноза (200, 201, 259).

Настоящият дисертационен труд изследва факторите, влияещи върху изхода от асистираните репродуктивни технологии. За първи път се изследва влиянието на овариалния отговор и прогностичния потенциал на качеството на ембрионите върху вероятността за развитие на извънматочна бременност.

II. ЦЕЛ

Да се изследва влиянието на овариалния отговор, качеството на ембриона и резултата от АРТ, в частност извънматочната бременност.

III. ЗАДАЧИ

1. Да се установи влиянието на вида на инфертилитета върху успеваемостта от АРТ и риска за извънматочна бременност;
2. Да се анализира ефектът на броя на трансферираните ембриони върху вероятността за извънматочна бременност;
3. Да се изследва влиянието на качеството на ембрионите върху успеваемостта от АРТ и риска за извънматочна бременност;
4. Да се оценят клиничните бременности в зависимост от трансфера на пресни и размразени ембриони;
5. Да се оцени влиянието на фактора възраст върху честотата на извънматочните бременности;
6. Да се изясни връзката между овариалния отговор и вероятността за извънматочна бременност;
7. Да се анализира ефектът на деня на ембриотрансфер върху успеваемостта от АРТ и риска за извънматочна бременност;
8. Да се предложат начини за оптимизиране на лечението с IVF/ICSI.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За изпълнение на задачите по настоящия дисертационен труд са анализирани данни, предоставени от Медицински център по асистирана репродукция „Варна“ ООД, за периода 2008 – 2018 г. За целта в процеса на изпълнение на работата е изготвена електронна база данни и е извършен ретроспективен и проспективен анализ на 1077 бременности след 2602 не-донорски IVF/ICSI свежи и размразени цикли с трансфер на 2-ри до 6-ти ден. Бременностите завършили с раждане, аборт, моларна бременност, биохимична бременност и бременност в ход, са обединени в обща променлива – вътрематочна бременност – 976 случая (91%). Тубарна и хетеротопична бременност обединихме в променлива – извънматочна бременност – 101 случая (9%) (граф. 1).



Графика 1. Изход на бременностите след АРТ в изследваната популация

Възрастта на жената е един от определящите фактори за репродуктивните ѝ възможности и изхода от лечението с АРТ. С напредване на възрастта те намаляват, като този процес е индивидуален и се ус-

корява след 35 години (210). Основен патофизиологичен механизъм е намалението на яйчниковия резерв – както в количествено, така и в качествено отношение (4, 16). Намалява броят на примордиалните фоликули в кортекса, увеличава се броят на овоцитите с генетични и структурни отклонения, а оттам и броят на ембрионите с лошо качество (212). На графика 2 е представено разпределението на пациентките по възрастови групи. Най-младата пациентка в изследваната популация е на 18 години, а най-възрастната на 43 години.



Графика 2. Разпределение на пациентките по възрастови групи

Клиничните и лабораторни методи за диагноза на инфертилитета, както и лечението с АРТ са извършени съгласно действащата в страната Наредба № 28 от 20 юни 2007 г. за дейности по асистирана репродукция.

4.1. Клинични методи за оценка на стерилитета

Важно място в лечебно-диагностичния процес заема подробно снетата анамнеза, включваща давност на инфертилитета, сегашно

състояние на двамата партньори, предишни бременности, минали заболявания, предхождащо лечение с АРТ.

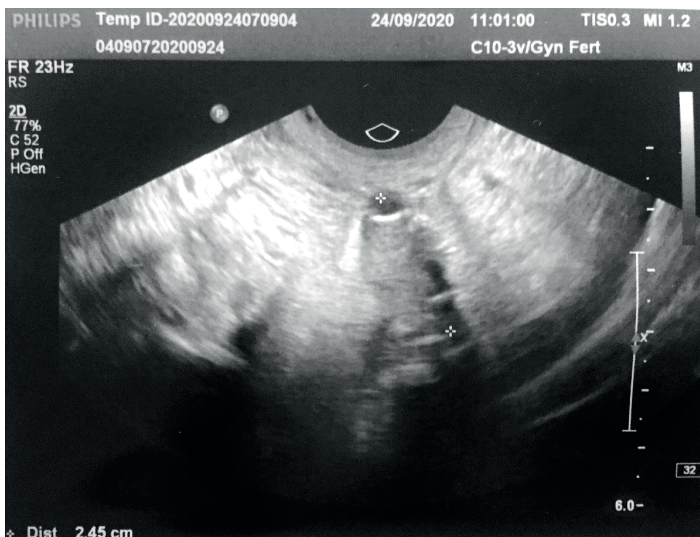
Още при първата визита се извършва първичен гинекологичен преглед с оглед на външните гениталии, оглед на влагалище и маточна шийка със спекулум за изключване на вродени аномалии и отклонения от нормалния статус и трансвагинална ехография за визуализация на матка и аднекси.

а) Трансвагинална ехография

Ехографското изследване се извършва за определяне състоянието на ендометриума, размера, формата и наличието на патологични формации на маточното тяло, измерване и документиране на размерите им, оценка на овариалния резерв, както и наличието на патологични формации в областта на аднексите. В хода на проследяване на спонтанна и индуцирана овулация, както и за целите на контролирана овариална хиперстимулация (КОХ) е извършвана фоликулометрия.

б) Оценка на яйчниковия резерв

Функционалният овариален резерв е оценяван според нивата на фоликулостимулиращия хормон (FSH) и съотношението FSH/LH на втори-трети ден от менструалния цикъл (МЦ), нивата на антимюлеровия хормон (АМН) в кръвната плазма и броя на антралните фоликули, установени при трансвагинално ултразвуково изследване (фиг. 1, 2). Оперативната намеса върху яйчниците е една от основните причини за ятрогенно намаляване на яйчниковия резерв (277, 280, 281). Установено е, че кистектомията при ендометриоми е по-травматична за яйчника в сравнение с другите доброкачествени яйчникови кисти поради дебелината капсула и плътния фиброзен слой около нея (155, 156, 157).



Фиг 1. Трансвагинална ехография– оценка на яйчниковия резерв – силно намален резерв, визуализира се един антрален фоликул



Фиг 2. Трансвагинална ехография– оценка на яйчниковия резерв – добър резерв – визуализират се около 8 антрални фоликула

в) *Оценка на проходимостта на маточните тръби*

За оценка на състоянието на маточните тръби е извършвана хистеросалпингография с контрастно вещество или диагностична лапароскопия с хромопертубация. Наличието на двустранна тубарна оклузия и/или хидросалпингс, двустранна салпингектомия и отсъствието на забременяване в продължение на една година след реконструктивна операция на маточните тръби са диагностицирани като тубарен стерилитет. Съществуват множество проучвания, които доказват негативния ефект на наличието на комунициращ с маточната кухина хидросалпингс върху резултата от ин витро процедурата (10, 193). В нашия център сме възприели оперативното лечение на хидросалпингс преди АРТ процедура. В зависимост от състоянието на фимбриалния апарат и лигавичните гънки след отваряне на фимбриалната фимоза по време на лапароскопия се преценява дали тубарната пластика е метод на избор в някои от случаите. При необратима увреда на маточната тръба е извършвана парциална лапароскопска салпингектомия в истмичния край. Този подход цели запазване на яйчниковия резерв на пациентката.

г) *Спермограма на партньора*

За състоянието на мъжката репродуктивна функция се съди въз основа на семинологичен анализ при спазени изисквания: 2 до 5 дни полово въздържание, без употреба на антибиотици през последния един месец. Определят се основните параметри спрямо критериите на СЗО от 2010 г. (275): обем на еякулата ($> 1,5$ ml), брой сперматозоиди в 1 ml от обема (> 15 млн./мл), процент подвижни сперматозоиди в целия обем ($> 40\%$), процент прогресивно подвижни сперматозоиди ($> 32\%$), процент сперматозоиди с нормална морфология ($> 4\%$). Преди 2010 г. се е използвала по-старата класификация на СЗО, според която някои от пациентите с гранични и нормални показатели спрямо новите параметри са определяни като мъжки фактор на инфертилитет (приложение 4).

д) *Офис хистероскопия*

Диагностична и/или оперативна хистероскопия е извършвана пре-

ди АРТ в следните случаи: съмнение за патологични формации в маточната кухина (вродени малформации, ендометриален полип, маточен септум, синдром на Ашерман) от ултразвуковото или контрастното рентгеново изследване, анамнеза за прекъсване на бременност чрез кюретаж, повтарящи се имплантационни неудачи.

При липса на явна причина след проведените базови изследвания инфертилитетът се определя като неизяснен. Наличието на яйчникова ендометриоза, поликистозен овариален синдром и ановулация е определяно като яйчников фактор.

Спрямо фактора диагноза на стерилитета обединихме случаите в две основни групи – група 1 – тубарен фактор, и група 2 – друг фактор, обединяваща всички останали форми на стерилитет.

4.2. Медикаментозно лечение

4.2.1. Контролирана овариална хиперстимулация (КОХ) с гонадотропни хормони със или без употребата на аналози на гонадолиберина.

Използвани протоколи за стимулация (приложение 1–3)

- А) Дълъг протокол („long protocol“)
- Б) Къс протокол („short protocol“) с антагонист
- В) Къс протокол с микродоза агонист (microdose „flare up“)
- Г) Протокол с мека стимулация („mild stimulation“)

Всички протоколи за КОХ са провеждани с рекомбинантни или високопречистени уринарни FSH препарати:

- ароматазни инхибитори – Letrozole (Femara 2,5 mg, Novartis Pharma GmbH, Germany);
- рекомбинантни FSH препарати – Folitropin alfa, PEN (Gonal F®, Merck Serono Europe Ltd, UK);
- пречистени уринарни препарати с комбинирана FSH/LH активност – amp 75 IU или 150 IU (Merional, Fostimon, IBSA Farmaceutici Italia, Italy), Menotropin (Menopur®, Ferring GmbH, Germany);
- Triptorelin acetate (Decapeptyl® 0.1 mg, Decapeptyl depot® 3.75 mg; Ferring, Germany);

- Cetorelix (Cetrotide® , Merck Serono Europe Ltd,UK) amp. 0,25 mg s.c. веднъж дневно

Късият протокол за контролирана овариална хиперстимулация (КОХ) се провежда с антагонист на гонадотропин-рилизинг хормона (GnRH). Ежедневно се инжектира рекомбинантен фоликулостимулиращ хормон (Gonal-F, Merck Serono S.A., Darmstadt, Германия, или Puregon, N.V. Organon, Oss, Холандия) и/или менопаузални гонадотропини (Menopur, Ferring GmbH, Kiel, Германия), като се стартира на 2–3 ден от менструалния цикъл. GnRH антагонист (Cetrotide, Merck Serono S.A., Darmstadt, Германия или Orgalutran, N.V. Organon, Oss, Холандия) е прилаган на 5–6 ден от КОХ в при документирани на поне 2 фоликула с размер 12–13 мм.

При ултракъсите протоколи се започва с микродози антагонист (0,025 mg Decareptyl) от първи ден на МЦ, който се продължава до последния ден на КОХ. От трети ден на МЦ се започва стимулация с рекомбинанти FSH препарати със стартови дози 400–450IU с възможност за намаление на дозировката (step-down режим). Този вид протоколи се препоръчват при пациентки с очакван незадоволителен отговор от КОХ и слаб яйчников резерв.

При дълъг протокол с GnRH агонист (Decareptyl, Ferring, Германия) протоколът започва от 19–21 ден на предшестващия менструален цикъл.

Меката стимулация се провежда с ниски дози гонадотропини (75–150 IU) или приложението на лутеинизиращ хормон (LH), или човешки хорионгонадотропин (ЧХГ) в късната фоликуларна фаза на МЦ.

4.2.2. Индукция на овулацията

При наличие на минимум два фоликула с диаметър над 18 мм и ниво на естрадиола над 0,7 нмол/л 36–37 часа преди фоликуларна пункция се назначава апликация на тригерна доза човешки хорион гонадотропин (ЧХГ) – 1 или 2 ампули Choriomon 5000 IU (IBSA Farmaceutici Italia), или Pregnyl 5000 IU (N.V. Organon, N.V. Organon, Холандия). или Ovytrellle (Merck Serono) амп. 250 микрограма/0,5 ml (еквивалентни на 6500 IU). (276) При наличие на висок риск от ОХСС тригерирането се извършва чрез апликация на агонист (Decareptyl –

0,2 мг) без ЧХГ или т. нар. двойно тригериране с малки дози ЧХГ (1000 – 1500 IU) и GnRH агонист (11, 283).

Трансвагиналното ултразвуково извличане на овоцити се извършва 35–37 часа след аплицирането на тригерна доза ЧХГ. Аспирираните яйцеклетки се оплождат 3–6 часа след събирането чрез конвенционална или ICSI фертилизация в зависимост от показателите на спермограмата.

След пункция се назначава прогестерон за лутеална поддръжка (Crinone 80[®] mg/g vaginal gel Merck Serono, Central Pharma Ltd, UK) в доза 1 апликатор дневно p.v. до две седмици след последващ ембриотрансфер при свежи цикли и Estrofem табл. 2мг. (Novo Nordisk, Дания).

При FET на спонтанен или стимулиран с Летрозол цикъл (при жени с ановулация) се проследява овулацията и дебелината на ендометриума. При настъпила овулация се назначава Кринон гел за 5 дни и се извършва последващ размразен ембриотрансфер (трансферният прозорец е в диапазона 19-ти до 23-ти ден от менструалния цикъл).

4.3. Материали и методи, използвани за осъществяване на биологично-лабораторните процедури за целите на ART

4.3.1. Обработката на семенна течност се извършва по метода на градиентната плътност (Percoll gradient).

При този метод са използвани градиентни разтвори с различна концентрация (45% и 90%), които разделят клетките спрямо тяхната плътност с цел концентриране на най-подвижната фракция сперматозоиди и премахване на клетъчния детрит, клетки от сперматогенезата и клетки на имунната система (левкоцити, лимфоцити, еритроцити) от еякулата. Активно подвижните сперматозоиди се отлагат като утайка, а неподвижните сперматозоиди и другите клетки се задържат на границата между двата градиентни разтвора.

След първичното центрофугиране на 1600 оборота за 20 минути следва обработка на утайката с хранителна среда Sperm Preparation Medium на 1600 оборота за 10 минути.

Получената утайка е инкубирана в епруветка в подходящо разреждане спрямо последващия метод на оплождане.

4.3.2. Фоликулната пункция е провеждана под ултразвуков контрол 36 часа след инжектирането на ЧХГ. Използвана е система с трипътник за аспирация и вакуум помпа (Labotect 4014), която позволява промиване на аспирираните фоликули със специална среда. Пункционната игла, използвана за процедурата, е 17G, 30 см. Яйцеклетките с прилежащите им кумулусни клетки са изолирани от фоликуларните аспирати под стереомикроскоп, след което са култивирани в хранителна среда в инкубатор, поддържащ 5% CO₂ и 37° C в продължение на около 4 часа преди оплождането в IVF Medium. В нашата клиника практикуваме т.нар. „flushing“ на фоликулите по време на пункцията с цел добиване на яйцеклетка при липса на такава в първоначалния аспират.

Обработка на яйцеклетките е извършвана или не в зависимост от последващия метод на инсеминиране. Преди ICSI процедура кумулусните клетки и клетките на корона радиата са отстранявани ензимно с хиалуронидаза и механично. Интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди е прилагано в случаите на мъжки фактор на стерилитета, неуспешно оплождане на яйцеклетките в предхождащ цикъл на лечение чрез стандартна IVF процедура, както и някои морфологични особености на яйцеклетките, които се предполага, че биха могли да възпрепятстват нормалното оплождане. За ICSI оплождането е използван инвертен микроскоп Nikon Narishige с микроманипулатор.

Използвани са хранителни среди на търговската марка Origio, Дания.

4.3.3. Оценка на оплождането

Проверка за настъпило оплождане и формиране на пронуклеуси (PN) е извършвана на следващия ден под инвертен микроскоп.

4.3.4. Култивиране на ембриони

Култивацията на ембрионите е извършвана в хранителна среда (SAGE 1-Step), покрита с Liquid paraffin в инкубатор, поддържащ 5%

CO₂ и 37° C до деня на ембриотрансфера и/или замразяването на висококачествени ембриони. Морфологичен анализ на ембрионите е извършван всяка сутрин през периода на култивирането им чрез микроскопско наблюдение под инвертен микроскоп.

А) Оценка на 1-ви ден (пронуклеарен стадий)

През 2000 г. Скот и сътрудници разработват система за оценка на ембрионите в пронуклеарната фаза (Scott et al., 2000). Оценката се извършва 16–18 часа след оплождането и се основава на следните критерии: (1) размер и симетрия на пронуклеусите, (2) размер, брой, симетрия и разпределение на ядрата и (3) поява на цитоплазма (фиг. 3) (148).



Фиг. 3. Ембрион на първи ден – пронуклеарен стадий с добро качество

Б) Оценка на 2-ри и 3-ти ден

Оценката се извършва на база системата на Van Royen и сътр. (1999 г.), според която ембрион с високо качество е наличен при (1) отсъствие на многоядрени бластомери, (2) наличие на 4 или 5 симетрични бластомери на 2-ри ден, (3) наличие на 7 или повече симетрични бластомери на 3-ти ден и (4) $\leq 20\%$ ануклеарни фрагменти (фиг. 4).



Фиг. 4. Ембрион в стадий на делене (cleavage stage) на втори ден с добра морфология

В) Оценка на 5-ти ден

Оценка на стадий бластоцист се извършва според критериите на Gardner и сътр. (2000г.), която включва три отделни оценки – степен на експанзия и делене и оценка на клетките на вътрешната клетъчна маса (ICM) и трофоектодермата (TE). Следователно първото число от 1 до 6 въз основа на степента на експанзията и излюпването от zona pellucida. ICM резултатът е посочен на второ място (А съответства на множество клетки, образуващи кохезивен епител, Б – няколко клетки, образуващи рехав епител, и С – малък брой големи клетки). Крайният резултат е оценката на трофоектодермата (А. плътно опаковани, множество клетки, В. свободно групирани няколко клетки и В. много малко клетки). Следователно висококачествен ембрион би имал следната характеристика BL4-5/AA (фиг. 5).



Фиг. 5. Ембрион в стадий бластоцист на 5-ти ден с добра морфология

За сравнение на качеството на ембрионите ги класифицирахме в две основни групи – с „топ“ качество и с „не-топ“ качество според критериите на Van Royen и Gardner, възприети за оценка в нашия център.

5.3.5. Селекция на ембриони и ембриотрансфер

Трансфер на ембрионите в маточната кухина на пациентката е извършван от втори до шести ден след фоликулната пункция. В зависимост от качеството на ембрионите, стадия на развитие, възрастта на пациентката, резултата от предишни цикли на лечение чрез АРТ и броя получени ембриони са трансферирани 1, 2 или 3 ембриона (в изключителни случаи до 4 ембриона) според изискванията по Наредба 28 от 2007 г. (трансфер на до 3 бластоциста или повече от 3 ембриона в стадий на делене при жени над 38 години). Селекция на ембрионите е извършена чрез неинвазивна оценка на морфологията към момента на трансфер. Не е извършвано асистирано излюпване и предимплантационна диагностика (PGS).

4.3.6. Брой на трансферираните ембриони и ден на ембриотрансфер

За определяне на влиянието на деня на ембриотрансфер върху вероятността за извънматочна бременност са анализирани 353 трансфе-

ра на 2-ри и 3-ти ден срещу 705 трансфера на 5-ти и 6-ти ден. В анализа са изключени 19 цикъла с трансфер на 4-ти ден поради неточното определяне на качеството на ембриона в тези случаи и извършването на трансфер на 4-ти ден по изключение. На графика 3 е представена честотата на извършваните ембриотрансфери спрямо деня на култивация.

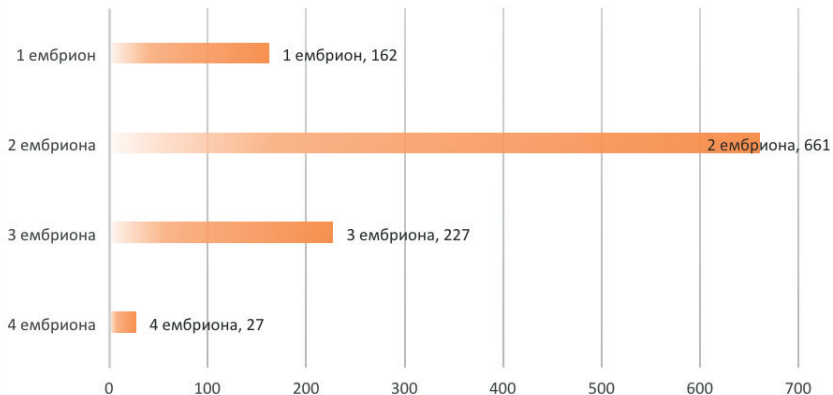


Графика 3. Честота на извършваните ембриотрансфери спрямо деня на култивация на ембрионите в изследваната популация

По отношение на броя на ембрионите в нашия център практикуваме ембриотрансфер на до 2 ембриона, в изключителни случаи (при поредица от неуспешни АРТ процедури, възраст на пациентката > 40 г., след изричното желание и съгласие на пациентката) 3 ембриона, а в минало време и единични трансфери на 4 ембриона. След 2018 г. стремежът на екипа ни е single ET на най-висококачествения ембрион. На графика 4 е представена честотата на извършваните ембриотрансфери.

Трансферът на ембриони е извършван под ултразвуков контрол на разстояние до 2 см от фундус утери с катетри на Braun-Wallace и Cook, без използване на тенакулум, след предварителен лаваж на цервикалния мукус. Средата с ембриони се аспирира в следната последователност: балонче въздух, капка среда без ембриони, балонче въздух, капка среда с ембриони, балонче въздух, капка среда.

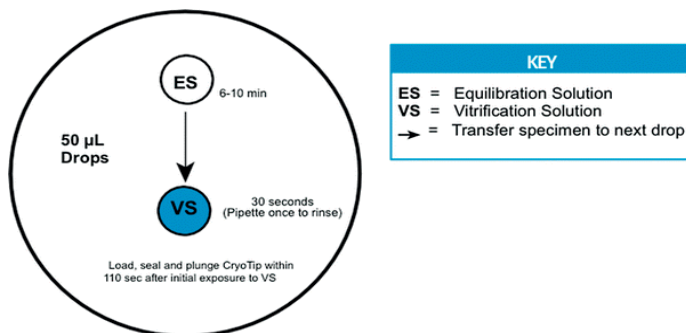
БРОЙ ТРАНСФЕРИРАНИ ЕМБРИОНИ



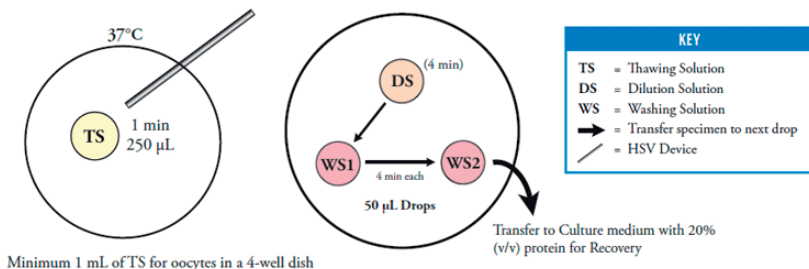
Графика. 4. Честота на извършваните ембриотрансфери спрямо броя върнати ембриони в изследваната популация

4.3.7. Криоконсервация на ембрионите

В нашия център се извършва криоконсервация чрез витрификация само на ембриони в стадий бластоцист. Протоколите за замразяване и размразяване са спрямо указанията на производителя, като са използвани среди на Kitazato (Cryotop) и Irvine Scientific (VitKit – Freeze/Thaw) (фиг. 6 и 7). След размразяване ембрионите се култивират поне 4 часа преди ембриотрансфер.



Фиг. 6. Протокол за замразяване на ембриони (Irvine Scientific)



Фиг. 7. Протокол за размразяване на ембриони (Irvine Scientific)

4.4. Ранна диагностика на бременността

На всички пациентки с положителен тест за бременност е провеждан кръвен тест за изследване на серумните нива на ЧХГ, 14 дни след ЕТ и 48 часа по-късно. На 21-ви ден от ЕТ пациентките са изследвани чрез трансвагинална ехография за установяването на клинична бременност (наличие на плоден сак в маточната кухина). В случаи на неясна локализация на бременността пациентките са проследени допълнително след 1–2 седмици. При наличие на стойности на ЧХГ над 1500 IU/ml и липса на вътрематочна бременност е извършвана диагностична лапароскопия за диагноза на ектопична бременност. В нашата клиника е възприета лапароскопската салпингектомия при хемодинамично стабилни пациентки.



Фиг. 8. Случай на интерстициална бременност – визуализира се децидуална реакция в празната маточна кухина и наличие на гестационен сак в интерстициума на ляв маточен рог, без ембрионални структури

4.5. Използвани статистически методи

За настоящия дисертационен труд сме използвали описателна (дескриптивна статистика), която включва статистически методи за събиране, табулиране и обобщаване на данни с цел описание на извадката. Анализите са извършвани чрез t-тест (за непрекъснати променливи) или chi-square анализ (за категорийни/номинални променливи) за проверка на асоциацията на изследваните фактори спрямо вероятността за извънматочна бременност.

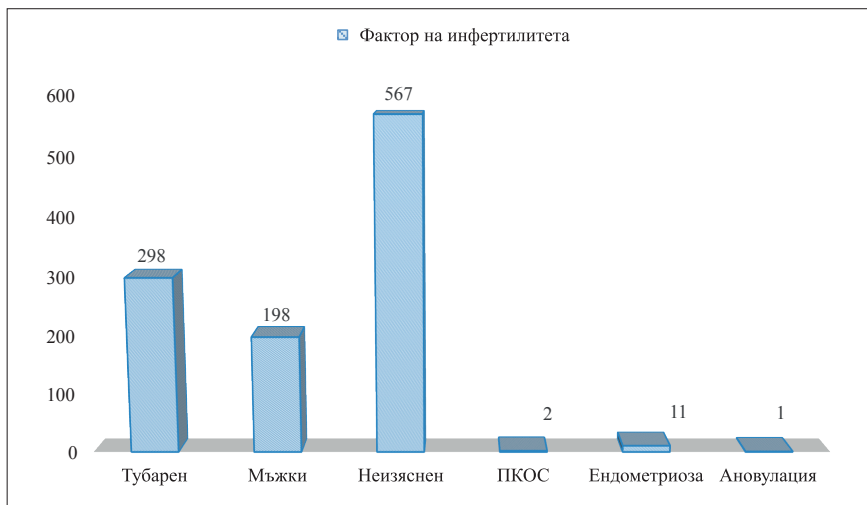
Получените след анализа сигнификантни фактори са включени в многовариантен логистичен регресионен модел (multivariate logistic regression model), чиято валидност е оценена с тест на Hosmer-Lemeshow. Анализите са извършени със софтуера IBM SPSS (Статистически пакет за социални науки), версия 26. Като за граница на значимост е взета стойност от $P < 0,05$.

V. РЕЗУЛТАТИ

За анализ на вероятността за извънматочна бременност спрямо изследваните фактори, а именно: фактор на инфертилитета, брой върнати ембриони, възраст на пациентката, ден на ембриотрансфер, свеж срещу размразен ембриотрансфер, качество на ембрионите, разделихме случаите в две основни групи според изхода от АРТ – Група 1 – Вътрематочна бременност и Група 2 – Извънматочна бременност.

5.1. Анализ на ефекта на диагнозата инфертилитет върху вероятността за извънматочна бременност

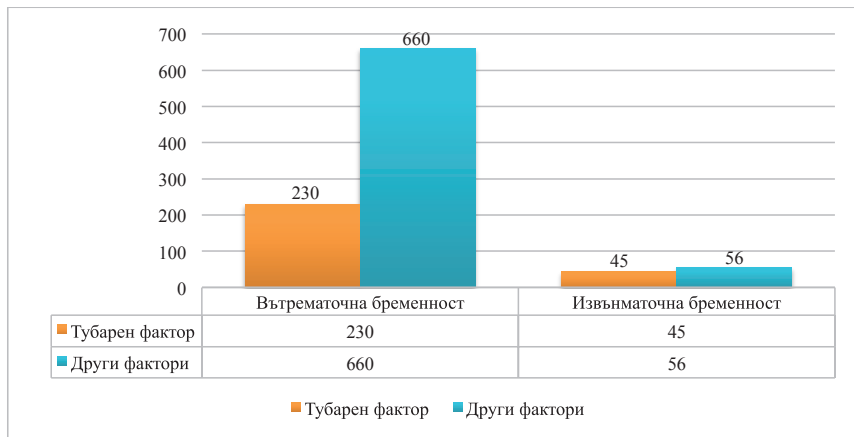
На графика 5 е представена честотата на факторите на инфертилитет в изследваната популация.



Графика 5. Честота на факторите на инфертилитет в изследваната популация

Най-висок е дялът на неизяснения инфертилитет – 567 случая, следван от тубарния фактор – 298 случая, следван от мъжки фактор – 198 случая, ендометриоза – 11 случая, ПКОС – 1 случай, ановулация – 1 случай.

За оценка на влиянието на тубарния фактор, обединихме в група „друг фактор“ останалите диагнози на инфертилитет, съответно: поликистозен овариален синдром, ендометриоза, ановулация, неизяснен и мъжки фактор на инфертилитета. Сравнихме тубарен срещу друг фактор на инфертилитета спрямо фактора изход – вътрематочна и извънматочна бременност. (граф. 6)



Графика 6. Честота на извънматочните бременности спрямо наличието и липсата на тубарен фактор ($p < 0,0001$)

Изследователският въпрос е: „Има ли статистически значимо различие в нивото на извънматочната бременност между жените с тубарен и друг фактор? Ако да, то каква е силата на различието?“

Научната (експерименталната) хипотеза H_1 е: „Има различие между нивото на извънматочната бременност и жените с тубарен и друг фактор.“

С цел да се провери нулевата хипотеза H_0 , че няма връзка/асоциация между нивото на извънматочната бременност и жените с тубарен фактор, е проведен Хи-квадрат χ^2 тест за независимост (табл. 1).

Табл. 1. Валидност и сигнификантност на изследването

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	15,840 ^a	1	,000		
Continuity Correction^b	14,921	1	,000		
Likelihood Ratio	14,602	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	15,825	1	,000		
N of Valid Cases	991				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 28,03.

Първо се проверява дали не е нарушена една от предпоставките за хи-квадрат χ^2 теста относно минимално очакваната честота (бройка) за всяка клетка, която трябва да е 5 или повече. Според анализа 0 клетки (0.0%) имат очаквано ниво, по-малко от 5. Статистическата значимост на изследването е $< 0,0001$.

Извод: Асоциацията/връзката между нивото на извънматочната бременност и жените с тубарен фактор на инфертилитет е **статистически значима**: $\chi^2(1) = 15,84$; $p < 0,001$. Тъй като р-стойността е по-малка от 0,05, се отхвърля нулевата хипотеза H_0 , че няма връзка/асоциация между двете променливи. Големината на ефекта $\phi = 0,126$ е определена като малка или по-малка от типичната съгласно интерпретацията на Коен (Cohen, 1988).

5.2. Влияние на фактора брой върнати ембриони върху вероятността за извънматочна бременност

На графика 7 е представена честотата на извършваните ембриотрансфери по брой върнати ембриони в двете анализирани групи, като най-висок е делът на трансферите на 2 ембриона.



Графика 7. Честота на бременностите според броя върнати ембриони ($p = 0,02$)

Ограничихме извадката до трансфер на не повече от два ембриона и сравнихме вероятността за извънматочна бременност при трансфер на 1 и на 2 ембриона, без да вземаме в предвид качеството на ембрионите.

С логистичната регресия се тестват следните хипотези:

- $H_0 \beta_i = 0$ независимата променлива X (брой ембриони) не е свързана с вероятността за извънматочна бременност, или Y равно на 0;
- $H_1 \beta_i \neq 0$ независимата променлива X е свързана с вероятността за извънматочна бременност, или Y равно на 1.

Ако $\beta_i = 0$, означава, че няма логистична връзка между независимата променлива X_i и вероятността на събитието p (извънматочна бременност). Ако $\beta_i \neq 0$, означава, че независимата променлива X_i има роля при прогнозирането на вероятността на събитието p (извънматочна бременност).

Установихме, че тестът е статистически значим с $p = 0,02$ (за модела), съответно за константата $p < 0,0001$ за променливата $p = 0,046$. Отхвърлихме нулевата хипотеза и установихме, че броят на трансферираните ембриони е свързан с вероятността за извънматочна бременност.

менност. За да проверим каква е зависимостта, изведохме формула за изчисляване на вероятността:

$$\text{Logit}(p) = -1,105 + 0,560 \cdot [\text{брой}]$$

$P = e^{-1,105 + 0,424 \cdot [\text{брой}]} / (1 + e^{-1,105 + 0,424})$ – изчисляване на вероятността за извънматочна бременност, променливата брой се замята с 1 и 2.

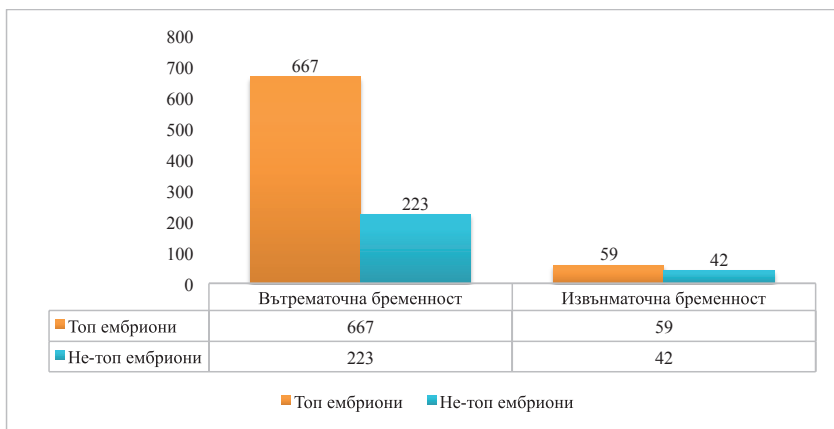
За 1 ембрион вероятността за извънматочна бременност е $0,157227931 = 15,72\%$.

За 2 ембриона вероятността за извънматочна бременност е $0,285075848 = 28,51\%$.

В съответствие с литературните данни установихме, че с **увеличаване на броя** на трансферираните ембриони **нараства и вероятността** за извънматочна бременност.

5.3. Влияние на качеството на ембрионите върху вероятността за извънматочна бременност

На графика 8 е представено разпределението на ембриотрансферите по качество на трансферираните ембриони спрямо изхода от АРТ, съответно не-топ за ембриони с лоша морфология и топ – за ембриони с високо качество, независимо от броя и деня на трансфер.



Графика 8. Честота на вътрематочна и извънматочна бременност според качеството на трансферираните ембриони ($p < 0,0001$)

Изследователският въпрос е: „Има ли статистически значимо различие в нивото на извънматочната бременност и трансфера на ембриони с лошо качество? Ако да, то каква е силата на различието?“

Научната (експерименталната) хипотеза H1 е: „Има различие между нивото на извънматочната бременност и трансфера на ембриони с лошо качество.“

С цел да се провери нулевата хипотеза H0, че няма връзка/асоциация между нивото на извънматочната бременност и трансфера на ембриони с лошо качество, е проведен Хи-квадрат χ^2 тест за независимост (табл. 2).

Табл. 2. Валидност и сигнификантност на изследването

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	12,649 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	11,819	1	,001		
Likelihood Ratio	11,678	1	,001		
Fisher's Exact Test				,001	,000
Linear-by-Linear Association	12,636	1	,000		
N of Valid Cases	991				

Извод: Асоциацията/връзката между нивото на извънматочната бременност и трансфера на лоши ембриони е **статистически значима**: $\chi^2(1) = 12,649$; $p < 0,001$. Големината на ефекта $\phi = 0,113$ е определена като малка или по-малка от типичната съгласно интерпретацията на Коен (Cohen, 1988).

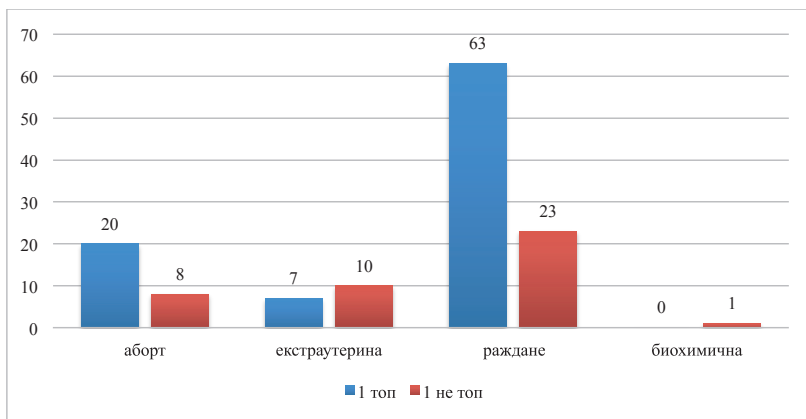
Проведохме допълнителен анализ на фактора качество, като разгледахме само случаите 2 топ срещу 1 топ/1 не топ. Анализирахме ефекта на качеството на ембрионите върху вероятността за извънматочна бременност чрез логистична регресия.

Извод: **установена е статистическа значимост** на фактора качество на ембрионите. Логистичната функция има вида:

$$\text{logit}(p) = 1,934 + 0,842 \cdot (\text{качество})$$

Повишаване на качеството на ембрионите, т.е. 2 топ срещу 1 топ, 1 не топ води до повишаване на вероятността за втрёматочна бременност с 2,32 пъти.

Обединихме случаите в две основни групи – А) с добро качество, Б) с лошо качество, и ги сравнихме по показателя „изход“. С цел да ограничим влиянието на фактора брой на върнатите ембриони ограничихме анализа само за случаите с трансфер на 1 ембрион (граф. 9).



Графика 9. Сравнение на групите с добра и лоша морфология при трансфер на 1 ембрион спрямо изхода от АРТ ($p = 0,01$)

Коефициентът на Пирсън $R = 0,223$ показва слаба корелация. Стойността е статистически значима ($p = 0,01$).

Установихме, че по-голям брой раждания е постигнат при трансфер на висококачествен ембрион, а по-голям брой извънматочни бременности е постигнат при трансфер на ембрион с лоша морфология. Ембрионите с лошо качество водят до по-ниско ниво на имплантация и живо раждане.

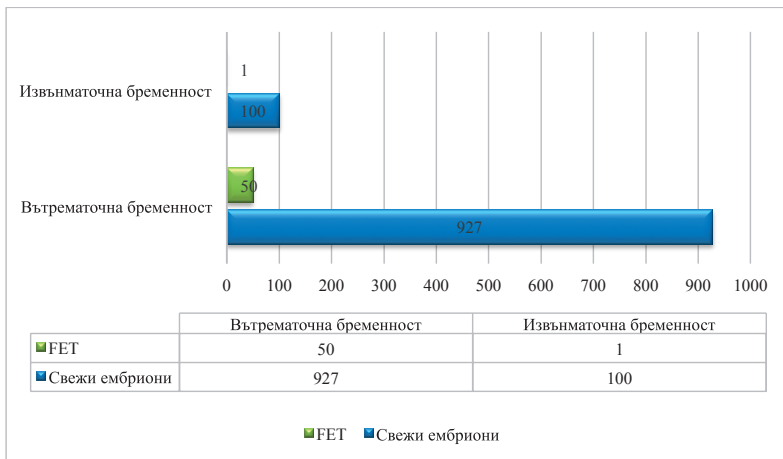
Обикновено трансфер на ембриони с лоша морфология се инициира при липса на висококачествени ембриони след оплождането в настоящия цикъл, независимо от възрастта на пациентите.

5.4. Влияние на трансфера на свежи (IVF/ICSI) и размразени (FET) ембриони по отношение честотата на извънматочна бременност

Изследователският въпрос е: „Има ли статистически значимо различие в нивото на извънматочната бременност между трансфера на свежи (IVF/ICSI) и размразени (FET) ембриони? Ако да, то каква е силата на различието?“

Научната (експерименталната) хипотеза H1 е: „Има различие между нивото на извънматочната бременност и трансфера на свежи (IVF/ICSI) и размразени (FET) ембриони.“

С цел да се провери нулевата хипотеза H0, че няма връзка/асоциация между нивото на извънматочната бременност и трансфера на свежи (IVF/ICSI) и размразени (FET) ембриони, е проведен Хи-квадрат χ^2 тест за независимост (граф. 10).



Графика 10. Честота на вътрематочна и извънматочна бременност в свежи и размразени цикли ($p = 0,4$)

Извод: Асоциацията/връзката между нивото на извънматочната бременност и трансфера на свежи (IVF/ICSI) и размразени (FET) ембриони **не е статистически значима**: $\chi^2(1) = 0,691$, $p = 0,4 > 0,05$.

Големината на ефекта $\phi = 0,026$ е определена като малка или по-малка от типичната съгласно интерпретацията на Коен (Cohen, 1988).

Поради малкия брой постигнати бременности от размразен ембриотрансфер спрямо изследвания период, смятаме, че получената корелация не може да се интерпретира.

В нашия център витрификация на ембрионите се извършва само на ден 5, следователно не може да се оцени влиянието на деня на ембриотрансфер при свежи и размразени цикли.

5.5. Влияние на фактора възраст върху честотата на извънматочните бременности

С логистичната регресия се тестват следните хипотези:

- $H_0 \beta_i = 0$ независимата променлива X (брой ембриони) не е свързана с вероятността за извънматочна бременност, или Y равно на 0,
- $H_1 \beta_i \neq 0$ независимата променлива X е свързана с вероятността за извънматочна бременност, или Y равно на 1.

Ако $\beta_i = 0$, означава, че няма логистична връзка между независимата променлива X и вероятността на събитието p (извънматочна бременност). Ако $\beta_i \neq 0$, означава, че независимата променлива X има роля при прогнозирането на вероятността на събитието p (извънматочна бременност). Според направените анализи възрастта е статистически значимо свързана с извънматочната бременност. Регресионният модел е статистически значим. Регресията е около 0,017, което е ниска стойност.

Възрастта и константата в логистичното уравнение са **статистически значими** ($p = 0,004$ OR 1,07 (95% 1,02–1,13). $\text{Exp}(B) > 1$, което означава, че всяко увеличаване на стойността на независимата променлива ще увеличава шанса зависимата променлива да има стойност 1, т.е. увеличението на възрастта с единица увеличава шанса за извънматочна бременност 1,073 пъти. Уравнението е:

$$\text{logit}(p) = -4,539 + 0,071.(age)$$

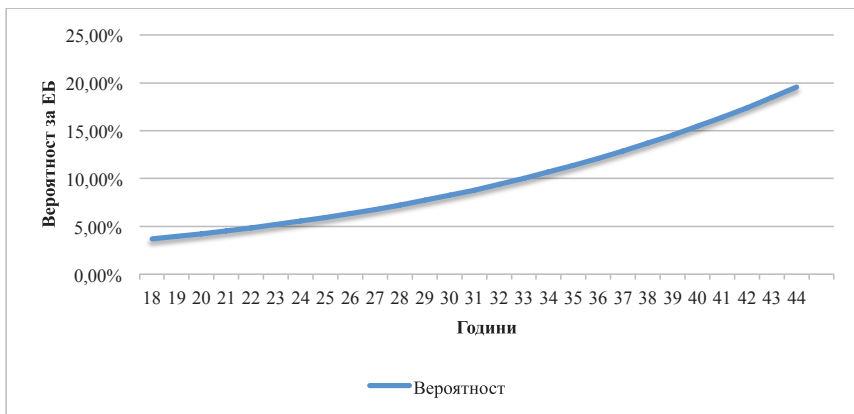
По това уравнение може да се изчисли каква е вероятността за жена на определена възраст да има извънматочна бременност.

$$p = \frac{e^{-4,539 + 0,071 \cdot \text{age}}}{1 + e^{-4,539 + 0,071 \cdot \text{age}}} \cdot 100, \%$$

Резултатите за вероятността за извънматочна бременност в зависимост от възрастта са представени в табл. 3 и графика 11.

Таблица 3. Изчислена вероятност за настъпване на извънматочна бременност спрямо възрастта на жената

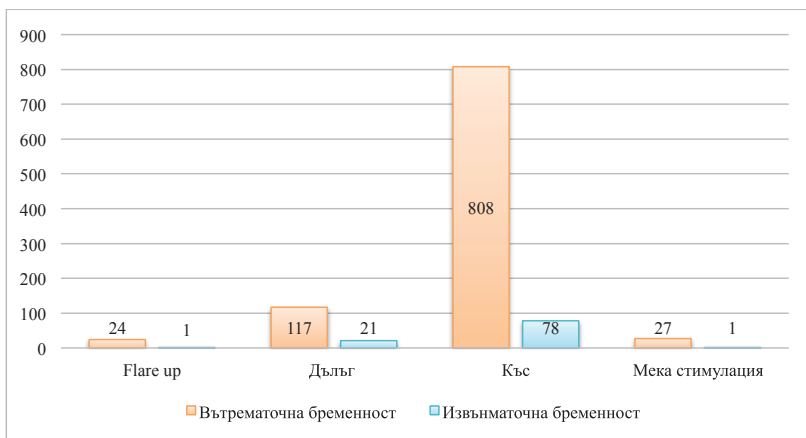
Години	Вероятност	Години	Вероятност
18	3,69%	32	9,39%
19	3,95%	33	10,01%
20	4,23%	34	10,67%
21	4,53%	35	11,36%
22	4,85%	36	12,10%
23	5,19%	37	12,88%
24	5,55%	38	13,69%
25	5,93%	39	14,55%
26	6,34%	40	15,46%
27	6,77%	41	16,41%
28	7,24%	42	17,41%
29	7,73%	43	18,45%
30	8,25%	44	19,54%
31	8,80%		



Графика 11. Крива на вероятността спрямо годините

5.6. Влияние на овариалния отговор върху вероятността за извънматочна бременност

Най-широко използваният протокол за овариална стимулация е късият протокол от ранна фоликуларна фаза на менструалния цикъл (граф. 12).

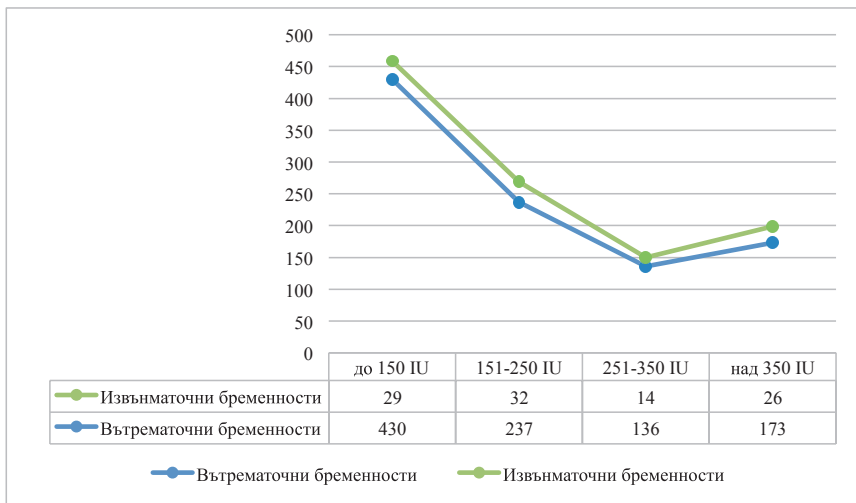


Графика 12. Разпределение на случаите по вид на стимулационния протокол ($p = 0,2$)

При сравнение на честотата на вътрематочна и извънматочна бременност спрямо използвания протокол за КОХ не е установена статистически значима разлика ($p = 0,2$).

Съгласно консенсусната дефиниция за слаб яйчников отговор на Европейската асоциация по човешка репродукция (ESHRE) в нашия център сме класифицирали пациентките с лош отговор при добиване на до 5 яйцеклетки при аспирация, както и при необходимост от използване на високи дози гонадотропини за яйцеклетка > 350 IU на ден.

Характеристика на изследваните цикли е представена на графика 13. Случаите са обединени по групи спрямо използваната доза гонадотропини за добиване на една яйцеклетка при пункция, като са сравнени резултатите при извънматочни и вътрематочни бременности. Средната доза използвани гонадотропни хормони при пациентките с извънматочна бременност е 272,72 IU, а при вътрематочна бременност е 250,78 IU ($p = 0,02$). Най-ниската доза гонадотропни хормони, използвана за добиване на 1 яйцеклетка в групата с извънматочни бременности, е 45 IU, а най-високата – 1143 IU (за вътрематочни бременности са съответно – 29,8 и 3000 IU).



Графика 13. Разпределение на случаите според приложената доза гонадотропни хормони, необходима за добиване на една яйцеклетка, ($p = 0,2$)

За да оценим ефекта на овариалния отговор върху вероятността за извънматочна бременност, разделихме случаите на 4 групи спрямо дозата на приложените гонадотропни хормони за добиване на една яйцеклетка при всяка пациентка, съответно: група 1 (до 150 IU), група 2 (151 – 250 IU), група 3 (251 – 350 IU), група 4 (над 350 IU).

Изследователският въпрос е: „Има ли статистически значимо различие в нивото на извънматочната бременност в зависимост от овариалния отговор? Ако да, то каква е силата на различието?“

Научната (експерименталната) хипотеза H1 е: „Има различие между нивото на извънматочната бременност и овариалния отговор.“

С цел да се провери нулевата хипотеза H0, че няма връзка/асоциация между нивото на извънматочната бременност и овариалния отговор, е проведен Хи-квадрат χ^2 тест за независимост.

Извод: Асоциацията/връзката между нивото на извънматочната бременност и овариалния отговор **не статистически значима**: $\chi^2(1) = 7,344$; $p = 0,07$. Тъй като р-стойността е по-голяма от 0,05, се приема нулевата хипотеза H₀, че няма връзка/асоциация между двете променливи. Големината на ефекта $\phi = 0,086$ е определена като малка или по-малка от типичната съгласно интерпретацията на Коен (Cohen, 1988).

Разделихме случаите на 5 подгрупи спрямо броя добити яйцеклетки, съответно: група 1 (1–5 яйцеклетки), група 2 (6–10 яйцеклетки), група 3 (11–15 яйцеклетки), група 4 (16–20 яйцеклетки), група 5 (> 20 яйцеклетки). Във всяка една от групите изчислихме дозата гонадотропни хормони, използвани за добиване на една яйцеклетка, и сравнихме вероятността за извънматочна срещу вътрематочна бременност (табл. 4.).

Табл. 4. Брой добити яйцеклетки и доза гонадотропини за яйцеклетка при извънматочна и вътрематочна бременност

Брой яйцеклетки	Вътрематочна бременност	Извънматочна бременност	P value
1–5	542,7	485,3	0,4
6–10	234,9	264,6	0,2
11–15	130,4	152,5	0,1
16–20	86,2	98,2	0,2
> 20	63,3	56,6	0,3

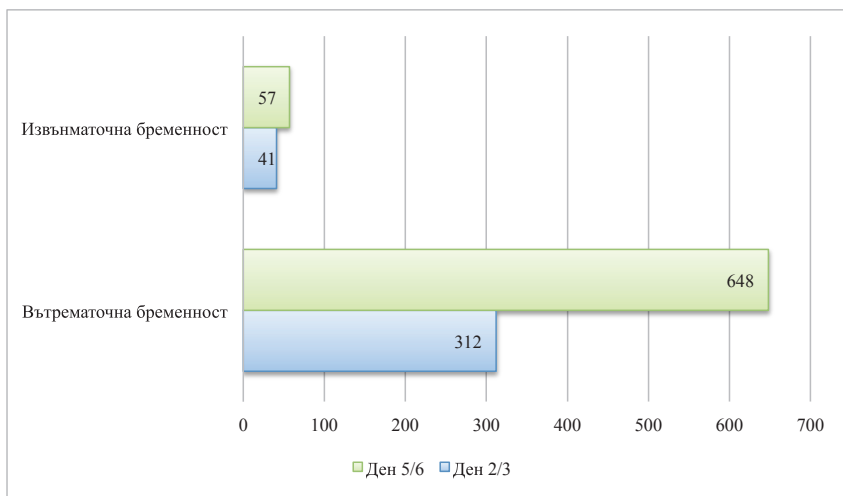
В нито една от изследваните групи не установихме статистически достоверна разлика. Според получените резултати става ясно, че **овариалният отговор не влияе** върху вероятността за извънматочна бременност след АРТ.

5.7. Влияние на деня на ембриотрансфер (ден 2,3 срещу ден 5,6) върху вероятността за извънматочна бременност

Изследователският въпрос е: „Има ли статистически значимо различие в нивото на извънматочната бременност в зависимост от деня? Ако да, то каква е силата на различието?“

Научната (експерименталната) хипотеза H1 е: „Има различие между нивото на извънматочната бременност и деня.“

С цел да се провери нулевата хипотеза H0, че няма връзка/асоциация между нивото на извънматочната бременност и деня, е проведен Хи-квадрат χ^2 тест за независимост (граф. 14).



Графика 14. Честота на извънматочните и вътрематочните бременности спрямо деня на ембриотрансфер ($p = 0,1$)

Извод: Асоциацията/връзката между нивото на извънматочната бременност и деня **не е статистически значима**: $\chi^2(1) = 1,961$, $p = 0,1$. Тъй като p -стойността е по-голяма от $0,05$, се приема нулевата хипотеза H_0 , че няма връзка/асоциация между двете променливи. Големината на ефекта $\phi = 0,045$ е определена като малка или по-малка от типичната съгласно интерпретацията на Коен (Cohen, 1988).

5.8. Проверка на значимостта на факторите в мултивариантен регресионен модел

Извършихме допълнителен анализ на всички фактори, свързани с АРТ чрез мултивариационен анализ, за да проверим кои от тях запазват сигнификантно значение върху вероятността за ЕБ (табл. 5).

Табл. 5. Мултивариантен регресионен анализ на влиянието на факторите на АРТ върху вероятността за ЕБ

	P value	Odds ratio	95% confidence interval
Фактор на инфертилитета	< 0,0001	0,42	0,28 – 0,65
Ден на ЕТ	0,5	1,10	0,81 – 1,50
Брой върнати ембриони	0,02	0,46	0,06 – 3,61
Възраст	0,02	0,94	0,89 – 1,0
Овариален отговор	0,3	0,7	0,42 – 1,28
Качество на ембрионите	0,002	0,5	0,31 – 0,76

Извод: със самостоятелна статистическа значимост в настоящото проучване са 4 фактора: **тубарен фактор, възраст, брой върнати ембриони и качество на ембрионите**. При анализ на всички независими променливи същите фактори **запазват** статистическата си значимост. Логистичната функция има вида:

$$\text{logit}(p) = 5,366 - 0,860 (\text{тубарен фактор}) - 0,062 (\text{възраст}) - 0,52 (\text{брой ембриони}) - 0,728 (\text{качество})$$

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Общият **процент на извънматочна бременност** в настоящото проучване е 9%. Вероятността за високия процент наблюдавани усложнения в изследваната извадка може да се дължи на недостатъчен брой анализирани случаи, както и на промяна в политиката на работа на центъра през последните години от трансфер на повече ембриони със задоволително качество към eSET на висококачествени ембриони, което значително подобри изхода от АРТ и понижи честотата на усложненията. Въпреки че ембрионите се трансферират директно в маточната кухина при АРТ, честотата на ЕБ в литературата все още варира между 2,1 и 8,6% след АРТ като може да достигне до 11% при пациентки с тубарен инфертилитет (190, 212, 216, 268).

Според направените анализи **тубарният фактор** увеличава риска за ЕБ след IVF-ET. Подобни резултати са докладвани и в проучване на Малак и сътр., което изследва рисковите фактори за ЕБ след IVF при 712 жени с OR от 3,99 (95% CI: 1,23 до 12,98) за жени с тубарен фактор в сравнение с тези с други причини за безплодие (176, 178). Друго проучване също така описва, че вероятността за ЕБ при 900 жени, планиращи забременяване, е била 8,81 (95% CI: 1,68–21,21) за тези с анамнеза за тубарна патология в сравнение с 5,82 [95% CI: 3,47, 9,78] за безплодие с друга етиология (163). Пациентките с анамнеза за тазово-възпалителна болест, тубарна хирургия и предшестваща извънматочна бременност са изложени на повишен риск за ЕБ след естествено зачеване и IVF / ICSI (41, 91, 128, 231). Възпалението във фалопиевата тръба в резултат на инфекция (по-специално *Chlamydia trachomatis*) засяга ембрио-тубарния транспорт чрез нарушаване на контрактилитета на гладката мускулатура и цилиарната активност (12, 24). Една от най-честите сексуално трансмисивни инфекции е именно инфекцията с хламидия, която засяга непропорционално жени в репродуктивна възраст с преобладаване на 4,0% в сравнение с 2,8% при мъжете (18). Въпреки спонтанния клирънс на инфекцията с *C. trachomatis*, антителата срещу патогена и неговия топлинен шок протеин (CHSP60) остават откриваеми в продължение на много години (250). Наличието на тези антитела е силно асоциирано с лош

репродуктивен резултат, включително ранен спонтанен аборт и ЕБ след АРТ. Наличието на IgA антитела срещу *Chlamydia trachomatis* е свързано с по-ниски нива на имплантация и бременност сред 235 пациентки, подложени на IVF (204, 205). Установено е също, че нивото на живо-раждания след IVF е по-ниско при жени с цервикални антихламидиални и анти-CHSP60 IgA антитела в сравнение с тези, които са били отрицателни (250). Подобни резултати са наблюдавани и за ефект върху скоростта на имплантация при 253 инфертилни пациентки с антитела срещу CHSP60 във фоликуларна течност (123, 124). Проучванията показват, че 10 – 30% от жените развиват повече от един епизод на инфекцията, като до 70% протичат асимптомно, което е причина за развитие на последици от инфекцията във връзка с тазово-възпалителна болест (3,0 – 30,0%), риск от извънматочна бременност (0,2 – 2,7%) и безплодие, свързано с тубарен фактор (0,1 – 6,0%) (35, 57, 58, 154, 170, 171, 215, 267).

Хидросалпинксът е основна причина за тубарен фактор на инфертилитета и е свързан с отрицателно въздействие върху резултата от лечението с IVF. Съобщава се, че рискът за ЕБ е около 9% при пациентки, подложени на ин витро оплождане след тубарна хирургия за лечение на хидросалпинкс. Анамнеза за тубарна / тазова хирургия е друг основен рисков фактор за развитието на ЕБ след ин витро оплождане, като нивото на риска зависи от степента на увреждане и степента на последващи анатомични изменения (56). Вероятността за развитие на ЕБ е 8,52 (95% CI: 5,91–12,27) за предходна операция на аднексите, 11,02 (95% CI: 5,49, 22,15) след реконструктивна тубарна хирургия, 5,16 (95% CI: 1,25–21,21) за предходна операция за ендометриоза и 17,70 (95% CI: 8,11–38,66) след абдоминална / тазова хирургия (207, 218).

През 1976 г. Steptoe и Edwards (19) предполагат липса на риск от ЕБ при пациентки след двустранна салпингектомия (64). По-късно обаче, в проучване на тубарния фактор сред пациентките, подложени на АРТ, Страндел и сътр. установяват, че в няколко от случаите се касае за пациентки с отстранени маточни тръби и последваща интерстициална бременност. Предполага се, че едностранната салпингектомия може да увеличи риска от ЕБ в контралатералната маточна тръба, съ-

ответно от 3,4% при пациентки без или с двустранна салпингектомия до 7,1% след едностранна салпингектомия (253, 254).

Тубарният фактор е непроменлив рисков фактор за извънматочна бременност, по тази причина стремежът на специалистите по репродуктивна медицина е да променят подхода при АРТ при тази специфична група пациентки с цел намаляване на рисковете от усложнения (25).

Настоящото проучване потвърди констатацията, че **трансферът на > 1 ембрион** увеличава шансовете за извънматочна бременност. Смята се, че всеки ембрион има независим потенциал за имплантиране, следователно рискът от извънматочна бременност може да се увеличи с увеличаване на броя на прехвърлените ембриони (94, 119). Според Yanaihara и колеги трансфер на два ембриона води до значително по-висок процент на извънматочна бременност, отколкото единичен ембриотрансфер (4,4 срещу 1,2%, $P < 0,05$) (280). Същата зависимост е установена и при анализ на база данни в Обединеното кралство, който показва прогресивно нарастване на честотата на ЕБ с увеличаване броя на трансферираните ембриони от 1,30 за два ембриона до 1,70 при трансфер на 3 или повече ембриони (231).

Гелбя и съавтори в систематичен анализ сравняват елективен трансфер на единичен ембрион и трансфер на два ембриона, като не установяват статистически значима разлика в процента на извънматочна бременност (относителен риск 0,39, 95% CI 0,08–1,99) (84). Това вероятно се дължи на малкия размер на извадката, тъй като в трите клинични изпитвания, включени в метаанализа, са докладвани само пет извънматочни бременности (85).

В проучване на свежи недонорски цикли, в което не се оценява морфологията на ембрионите (212), се наблюдава нарастване честотата на ЕБ от 1,6% при ембриотрансфер на един ембрион до 2,5% при трансфер на повече ембриони. По-малко проучване, оценяващо трансфера на ембриони с добър имплантационен потенциал, също установява подобни изводи (53). Авторите установяват, че при трансфер на 3 или повече ембриони рискът за ектопична имлантация е 2,4–2,5%, независимо дали е имало или не индикация за по-висок потенциал за имлантация. При трансфер на не повече от 2 ембриона честота-

та за извънматочна бременност варира в зависимост от показателите за потенциал за имплантация: 2,2% при липса на индикация, 1,6%, в случаите на налични допълнителни ембриони за криоконсервация, 1,4% при култивация на ембрионите до ден 5 и 1,4%, когато и двете условия са изпълнени ($p = 0,05$).

Тези открития могат да се обяснят с имплантационния синергизъм на ембриона, при който според математически модел вероятността за имплантация на всеки следващ ембрион се увеличава с 22% за всеки ембрион, имплантиран преди него (183).

Настоящото проучване наблюдава връзка между **морфологията** на ембрионите от най-високо качество и намаления риск от ЕБ.

Както споменахме по-рано, трансферът на > 1 ембрион увеличава шансовете на ЕБ съответно до 1,30 за трансфер на два ембриона и до 1,70 за 3 ембриона (212, 231). Следователно може да се предположи, че защитният ефект от висококачествената морфология се наблюдава само при единичен ембриотрансфер, тоест трансферът на повече ембриони, независимо че са с най-добро качество, не намалява вероятността за извънматочна бременност.

Трансферът на ембриони с лоша морфология е свързан и с вероятността от спонтанен аборт след IVF / ICSI (288).

Активирането на генома на ембриона започва от четири до осем клетъчен етап. Следователно едва след третия ден от култивацията ембрионът постепенно ще изрази своя геномен потенциал и генетичните аномалии ще започнат да оказват влияние върху развитието на ембриона (21, 77). Важно е да се подчертае, че опитът да се избере еуплоиден бластоцист само въз основа на морфологичния аспект може да бъде изключително опасен, тъй като много анеуплоидни бластоцисти са в състояние да достигнат най-високо качество (26, 27).

В различни изследвания честотата на хромозомни аномалии в ембрионите на пациентки в напреднала възраст варира от 40,4 до 64,0% в зависимост от броя на изследваните хромозоми (19). Проучване на Staessen през 2004 г. потвърждава, че пациентките > 37 години имат висок дял на генетично аномални ембриони въпреки факта, че тези ембриони са морфологично нормални на ден 3-ти от култивацията. Според авторите култивацията до стадий компактизация или бла-

стоцист може да се приеме за протективен фактор по отношение на анеуплоидиите, тъй като повечето абнормални ембриони не достигат този стадий. Staessen и съавт. установяват, че култивацията до ден 5-ти увеличава шанса за селекция на хромозомно нормален ембрион от 41,3% на ден 3 до 65% на ден 5 (248).

Minasi и съавт. установяват корелация, при които еуплоидните ембриони показват по-висок процент на бластоцисти с висококачествена вътрешна клетъчна маса (ICM) и трофектодерма (TE), по-висока степен на експанзия и по-кратко време за започване на бластулацията и излюпването в сравнение с анеуплоидните. От 1730 биопсирани бластоцисти 603 са еуплоидни и 1127 анеуплоидни. Авторите установяват, че 47,2% от еуплоидните и 32,8% от анеуплоидните бластоцисти показват най-високо качество на ICM ($p < 0,001$) и 17,1% от еуплоидните и 28,5% от анеуплоидни бластоцисти показват лошо качество на ICM ($P < 0,001$). Трофоектодермален слой с най-високо качество присъства в 46,5% от еуплоидните и в 31,1% от анеуплоидните бластоцисти ($p < 0,001$), докато 26,6% от еуплоидните и 38,1% от анеуплоидните бластоцисти показват нискокачествена TE ($p < 0,001$) (187).

Провеждането на предимплантационен скрининг с цел селекция на ембрионите (PGS), изискващ биопсия на бластомер или на трофоектодерма, не е сигурно доказателство за липса на аномалии поради възможността за нараняване на ембриона, неоткрит мозаицизъм и сегментна анеуплоидия (131). Това означава, че някои нормални ембриони могат да бъдат унищожени, а някои генетично абнормални ембриони фалшиво да се диагностицират като нормални. В допълнение, метаанализ на проведени рандомизирани проучвания през 2011 г. показва, че PGS не подобрява нивото на живо-раждания в сравнение с морфологичния подбор (182).

По-късно метаанализ установи, че при пациенти с добра прогноза провеждането на цялостен хромозомен скрининг след бластоцистната биопсия е свързано с по-високо ниво на имплантация, но не и по-високи нива на раждаемост, когато се трансферира същият брой ембриони (55).

Смята се, че посоката на контрактилитета на матката е от шийката

към фонда и честотата и амплитудата на контракциите намаляват след тригериране с ЧХГ 6 или 7 дни по-късно (228). Следователно, на теория, трансферът на ден 5 може да понижи честотата на ЕБ в свежи цикли. Въпреки това, в нашето проучване не се наблюдава значителна разлика при сравнение на **свежи и FET цикли**, но са необходими допълнителни анализи, поради малкия брой извършвани FET цикли в изследваната популация.

Проучване на общо 13 261 цикъла в Bahcesci Health Group през 2019 г. установява честота на извънматочна бременност в 1,6% и 0,9% от клиничните бременности съответно след пресен ЕТ и FET ($p < 0,05$). Пациентките с тубарен инфертилитет са изключени от анализите. Резултатите от това проучване показват, че размразените ембриотрансфери водят до по-високи нива на клинична бременност и намаляване процента на извънматочните бременности. Въпреки че ембриотрансфер както на ден 3, така и ден 5 водят до подобен риск от ЕБ в свежите цикли, то ембрионите на ден 3 при FET циклите показват най-нисък риск за ЕБ (41).

Метаанализ, публикуван в 2009 г., установява малко по-висок риск за ЕБ след размразен ЕТ. Авторите предполагат, че наблюдаваното несъответствие може да се дължи на различията в общия процент на бременности след FET в различните IVF центрове. Всъщност разликите, свързани с подбор на ембриони и технически аспекти на процедурата на замразяване, която значително се подобри с течение на времето, може да повлияе на резултата (130).

Голямо американско проучване на 553 577 ART цикъла установява, че най-висок е дялът на извънматочните бременности в свежи не-донорски цикли. Въпреки това, авторите отчитат, че по-голямо влияние върху честотата на инцидентите оказват напредналата майчина възраст и броят на трансферираните ембриони (212).

В сравнение с трансфер на свеж ембрион на ден 5 вероятността от извънматочна бременност е значително по-ниска при трансфер на размразен бластоцист. Две по-ранни проучвания и един метаанализ предполагат, че процентът на извънматочна бременност в свежи цикли не е статистически значимо по-висок от FET (47, 125). Анализ на цикли с ембриотрансфер на единични ембриони в Япония устано-

ви, че размразеният трансфер води до значително по-ниска честота на извънматочна бременност както за трансфер на ембриони в стадий на разцепване, така и на бластоцисти (119). Подобно на тези резултати, ретроспективно кохортно проучване на 2 150 трансфера на бластоцисти съобщава значително намалена честота на извънматочна бременност във FET циклите, съответно 1,5% в свежите цикли срещу нито един случай на ЕБ при размразен ЕТ (238, 239, 240). Може да се очаква, че промените в маточната среда ще повлияят на нивата на извънматочна бременност при трансфер на размразени ембриони поради влиянието на естествените фактори върху възприемчивостта на ендометриума (96, 98, 100). Повишеният контрактилитет на матката при стимулирани цикли може да благоприятства миграцията на ембрионите във фалопиевите тръби и да възпрепятства имплантацията в маточната кухина (214).

Decleer и съгр. установяват по-ниска честота на ектопична имплантация при размразени ембриотрансфери, но забелязват тенденция за повишаване на инцидентите след FET, тогава когато се използва Е2 валериат (4–6 мг дневно) за подготовка на ендометриума. Смята се, че подобно на КОХ при свежите цикли, стимулираните FET цикли също променят цилиарната активност и контрактилитета на маточната мускулатура (60).

Повишаване на степента на анеуплоидия в овоцитите и ембрионите е доказано във връзка с нарастващата възраст на майката (99, 181, 191). Добре известно е, че свързаното с възрастта увеличение на степента на анеуплоидия е свързано с намалена имплантация и по-висок процент на спонтанни аборти. Staessen и съавт. обаче не установяват повишена степен на клинична бременност след приложение на предимплантационна диагностика при пациентките в напреднала възраст (> 37 г.) (248). В настоящото проучване **възрастта** е независим рисков фактор върху вероятността за извънматочна бременност, като рискът се покачва с 1,073 за всяка добавена година. В общата популация най-висока честота на извънматочна бременност е наблюдавана във възрастовата група от 35 до 44 години. Обясненията за тази зависимост включват натрупването на рискови фактори във времето с възрастта, както и промени в анатомията и функцията на фалопиевата

трѣба, които могат да предразположат ембриона към извънматочна имплантация (179).

Друг фактор, който силно влияе на резултата след IVF/ICSI, е **реакцията на яйчниците спрямо стимулацията** (32, 175). В настоящото проучване не установихме влияние на яйчниковия резерв и отговора към КОХ върху вероятността за извънматочна бременност. Ефектът, който различните стимулационни протоколи могат да имат върху молекулярните механизми на имплантацията, е слабо проучен. Установено е, че приложението на кломифен цитрат (CC) носи най-голям риск за извънматочна бременност, потенциално свързан с антиестрогенния ефект върху ендометриума с промени в морфометричните параметри, наблюдавани дори при пациентки с регулярни менструации. Смята се, че основна причина е нарушеният цилиарен поток при нарастване на прогестероновите нива (65, 233).

Няколко анализа на резултатите от АРТ при пациентки с нисък овариален отговор са показали повишена честота на ЕБ при жени с ниски стойности на изходния антимюлеров хормон (AMH) или с високи стойности на базален фоликулостимулиращ хормон (FSH) (142, 144, 166, 245, 246). Процентът на ЕБ при пациентките със слаб яйчников отговор е 10,7% срещу 2,5% в групата с нормален яйчников отговор, но влиянието на тубарния фактор и качеството на ембрионите не са отчетени в тези проучвания. Възможно обяснение според авторите е вероятността качеството на яйцеклетките да е влошено при пациентките с намален яйчников резерв. Друга причина би била субоптималната хормонална среда при пациентки с намален капацитет на яйчниковата функция (7, 28).

Ингилизова и сътр. изследват 184 ооцити, получени от 72 пациентки с нисък яйчников резерв, включени в програма за лечение на безплодие чрез ин витро оплождане от февруари 2011 г. до февруари 2014 г. Прилаганите терапевтични подходи и протоколи за КОХ са кратък протокол с микродоза агонист, кратък протокол с антагонист, лека стимулация и естествен цикъл на ин витро оплождане. Авторите не установяват статистически значима зависимост между прилагания протокол за стимулация на яйчниците и зрелостта и морфологията на аспирираните яйцеклетки (5). По-късно, през 2018 г., авторите из-

следват факторите, влияещи върху процента получени ембриони от пациентки с намален овариален резерв и установяват, че сигнификантен ефект оказват възрастта на пациентката и стойностите на АМХ (115).

Schumasher и съвт. установяват, че честотата на спонтанните аборти е два пъти по-висока при жени със силно намален яйчников резерв ($AMH \leq 0,4 \text{ ng / ml}$) в сравнение с жените с $AMH \geq 1 \text{ ng / ml}$ (OR 2,3; 95% CI 1,3–4,3).

Dracopoulos и съвт. установяват положителна корелация между яйчниковия отговор, отразен от броя на извлечените ооцити, и кумулативните нива на живо-раждания при жени, подложени на първия им IVF / ICSI цикъл, използвайки протокол с GnRH антагонист и при планиран трансфер на един ембрион. Жените със слаб отговор на КОХ демонстрират значително по-ниско ниво на живо-раждания в първия им цикъл на IVF и по-ниска кумулативна стойност на живо раждане при използването на всички ембриони в последващи трансфери. Въпреки това, значително по-интересно е, че кумулативната стойност на живо-раждания след използване на всички пресни и замразени ембриони се увеличава с броя на извлечените ооцити (61).

Sung и колеги анализират 355 цикъла с нормален отговор на КОХ (normal ovarian reserve = NOR) и 75 цикъла лош отговор на стимулацията (decreased ovarian reserve = DOR). Не се установяват значителни разлики между DOR и NOR групите по отношение на честотата на вътрематочна (съответно 74,7% срещу 83,4%) или биохимична бременност (14,7% срещу 14,1%). DOR групата е с по-висока честота на ЕБ от тази на NOR групата [10,7% (8/75) срещу 2,5% (9/355), $p = 0,004$] (146).

Настоящото проучване не наблюдава връзка между **деня на трансфера** и вероятността за ЕБ при сравнение на трансфер на делеящи се ембриони (ден 2–3) срещу бластоцисти (ден 5–6). Подобно на тези открития, Muller и сътр. също не установяват разлика в нивото на ЕБ при сравнение на трансфер на ден 3 и ден 5, както в проведеното едноцентрично проучване, така и в извършения последващ метаанализ на литературата. В свежи IVF–ET цикли честотата на извънматочна бременност е сходна след трансфер на ембриони в стадий на деле-

не (1,93%, 14/724) и след трансфер на бластоцисти (1,86%, 4/215), $p = 0,64$. От 237 FET цикли, само три са довели до извънматочна бременност (1,28%, 3/234), докато процентът на ЕБ след пресен ЕТ е 1,92% (18/939), $p = 0,52$ (190).

Според скорошно проучване трансферът на ден 3 редуцира риска за ЕБ при размразен ембриотрансфер, за разлика от метаанализ на двадесет и две проучвания, които установяват по-добър резултат при трансфера на бластоцисти (187).

При анализ на 44 102 бременности е установен най-висок процент на извънматочна бременност – 1,9% за бременности след трансфер на свежи ембриони в стадий на делене, последвано от трансфер на размразен ембрион на ден 3 (1,7%), свеж бластоцист (1,3%) и размразен трансфер на ден 5 (0,8%) (60). Едноцентрови проучвания съобщават противоречиви резултати при анализ на деня на ембриотрансфер по отношение на честотата на извънматочна бременност (47).

По-ранно проучване на 956 клинични бременности установява, че вероятността за извънматочна бременност не намалява след трансфер на бластоцисти в сравнение с трансфер на ембриони в стадий на разцепване (3,9 срещу 3,5%, $P = 0,8$) (185, 186). Две американски проучвания (140, 226), базирани на данни от едни център по асистирана репродукция, съобщават за значително увеличение на честотата на извънматочна бременност при трансфер на бластоцисти в сравнение с трансфер на ембрион в етап на разцепване (1,6 срещу 0,5%, $P = 0,006$; и 1,3 срещу 0,4%, $P = 0,002$, съответно).

Ретроспективен анализ на данните от Японския регистър по асистирана репродукция установява, че трансферът на бластоцисти води до намален процент на извънматочна бременност в сравнение с трансфер на ембриони в стадий на разцепване (119). Предложени са множество хипотези, които обясняват понижения риск от извънматочна бременност при трансфер на бластоцисти. Те включват по-големия диаметър на бластоциста и контрактилитета на матката, който намалява прогресивно в лутеалната фаза и почти липсва по време на трансфера на бластоцист, което би подпомогнало имплантацията в маточната кухина.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клиничните и лабораторните процедури непрекъснато се подобряват и в днешно време около 30–35% от ембриотрансферите водят до бременност. Ето защо IVF/ICSI е важен метод за коригиране на неблагоприятните демографски показатели въпреки свързаните с тях разходи (188).

Отлагането на репродуктивните планове и свързаните с това напредване на възрастта на двойките и повишаване честотата на рисковите фактори създава предизвикателства пред специалистите по асистирана репродукция относно успеваемостта от АРТ и свързаните с процедурата усложнения.

Целта на дисертационния труд е да анализира влиянието на факторите, свързани с лечението на инфертилитета и изхода от АРТ, в частност развитието на извънматочна бременност.

При пациентките с данни за висок риск от ектопична бременност е от изключително значение влагането на усилия в посока на оптимизиране на всички етапи от процедурата, които биха довели до успешен изход.

Урбанизацията и напредъкът на технологиите, стресовият и нездравословен начин на живот оказват неблагоприятни последици върху организма във връзка с оксидативния стрес и ДНК-метилацията. Това от своя страна се отразява върху фертилитета и качеството на образуваните зрели полови клетки, както и на получените ембриони.

Целта на контролираната овариална хиперстимулация за целите на АРТ е добиването на максимален брой зрели яйцеклетки с добра морфология, което е важен фактор за изхода от лечението. Подборът на подходящия протокол за стимулация е от решаващо значение за успеваемостта на процедурата, тъй като определящ фактор е очакваният овариален отговор. Броят на добитите яйцеклетки не влияе върху риска за извънматочна бременност.

Качеството на ембрионите, стадият на култивация и броят на трансферираните ембриони влияят върху нивото на постигнати бременности и живо-раждания, както и на честотата на усложнения след АРТ.

При пациентки с риск от усложнения, каквито безспорно са жените с тубарен инфертилитет, е уместно предлагането на протоколи за оптимизиране на всеки етап от АРТ за намаляване на вероятността за ЕБ, каквито са редуциране броя на трансферираните ембриони, а в най-добрия случай – трансфер на един ембрион с най-добра морфология.

VIII. ИЗВОДИ

1. Асистираните репродуктивни технологии са независим рисков фактор за развитие на усложнения, като рискът за извънматочната бременност е 4 пъти по-висок в сравнение с естествената концепция;
2. Тубарният инфертилитет е неоспорим рисков фактор, който повишава вероятността за извънматочна бременност след АРТ;
3. Броят на трансферираните ембриони повишава вероятността за ектопична имплантация, като зависимостта нараства с всеки следващ ембрион;
4. Трансферът на ембриони с лошо качество повишава вероятността за извънматочна бременност и води до по-висока честота на аборти и биохимични бременности;
5. Трансферът на пресни или замразени ембриони не оказва влияние върху вероятността за извънматочна бременност;
6. С напредване на възрастта се повишава шансът за ектопична бременност, като зависимостта е линейна с всяка добавена година;
7. Яйчниковият отговор, оценен като брой добити яйцеклетки и обща доза приложени гонадотропини за цикъл, няма сигнификантен ефект върху вероятността за ЕБ;
8. Денят на ембриотрансфер не влияе върху риска за извънматочна бременност;
9. С цел оптимизиране на лечението с IVF / ICSI предлагаме да се обсъди трансфер на един ембрион с най-добра морфология при пациентките с повишен риск от извънматочна бременност, свързана с тубарен фактор.

IX. ПРИНОСИ

ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР

1. Доказана е ползата от редуциране броя на трансферираните ембриони за намаляване риска за ЕБ и е предложена формула за изчисление на вероятността;
2. Принос е доказването на достоверни различия в шанса за извънматочна бременност според възрастта на пациентката и предложението за модел за изчисление на риска;
3. Доказана е липсата на влияние на яйчниковия отговор върху вероятността за ЕБ при изследване на групи пациентки според броя добити яйцеклетки и доза приложени гонадотропини за яйцеклетка;
4. Предложен е подход за оптимизиране на процедурата при пациентки в риск и минимизиране на усложненията.

ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР

1. За първи път в България е извършен анализ на факторите, свързани с АРТ, и влиянието им върху изхода от лечението;
2. За пръв път у нас е разработен проблемът за прогнозиране на вероятността за извънматочна бременност след АРТ, отчетени са факторите, предразполагащи към усложнението, и са предложени стратегии за управление;
3. Доказан е ефектът на висококачествената морфология за успеваемостта от АРТ и за редуциране на риска за ЕБ, като е анализирано качеството на ембрионите при единичен ембриотрансфер.

Х. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Е. Ковачев, **С. Анжел**, Я. Корновски, С. Кисьов, К. Цветков – „АРТ-проблеми и решения“, Акушерство и гинекология, suppl. 1, vol. 56, ISSN 0324-0959, 2017, 48-54;
2. Е. Ковачев, А. Цветкова, **С. Анжел**, К. Александров, С. Кисьов, „Усложнения при АРТ – торзия на яйчник и кръвотечения след IVF процедура“, Акушерство и гинекология, брой 3, 2017, 49-53;
3. **С. Анжел**, Е. Ковачев, С. Кисьов, Индукция на овулацията с Летрозол след едностранна оофоректомия – клиничен случай, Репродуктивно здраве бр. 30/2019, 22-24;
4. **С. Анжел**, Е. Ковачев, С. Кисьов, Случай на хетеротопична бременност след размразен ембриотрансфер, Репродуктивно здраве, брой 28, 2018, 16-19;
5. **S Anzhel**, S Makinen, H Tinkanen, T Mikkila, A Haltia, A Perheentupa, C Tomas, H Martikainen, A Tiitinen, J Tapanainen, Z Veleva, Transfer of two non-top quality embryos increases the risk of ectopic pregnancy after fresh and frozen-thawed embryo transfer, Hum Repr, 33/2018, 123-123;
6. **Anzhel S.**, Kovachev E., Tsvetkov K., Zhekov Z., Kisyov S., Aleksandrov A., Cervical ectopic pregnancies after spontaneous conception: Case reports, Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, 1(1): 95-99 (2018).

XI. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

КЪС ПРОТОКОЛ ОТ 1÷2 ДЕН НА МЕСЕЧНИЯ ЦИКЪЛ С АНТАГОНИСТ

Име на пациентката..... Години.....

Ден 1-ви на FSH стимулацията с Gonal F.
Старт през 2-ри ден от цикъла.

Ден 6-ти от FSH стимулацията с Gonal F.
Включва се Cetrotide.

Ден 10-ти на FSH стимулацията с Gonal F.
Инжектира се Pregnyl®.

1-ви ден	2-ри ден	3-ти ден	4-ти ден	5-ти ден	6-ти ден	7-ми ден	8-ми ден	9-ти ден	10-ти ден	11-ти ден	12-ти ден
9:00 Gonal F	9:00 Gonal F	9:00 Gonal F	9:00 Gonal F	9:00 Gonal F	9:00 Gonal F	9:00 Gonal F	9:00 Gonal F	9:00 Gonal F			
					9:00 Cetrotide	9:00 Cetrotide	9:00 Cetrotide	9:00 Cetrotide	9:00 Cetrotide		
21:00 Gonal F	21:00 Gonal F	21:00 Gonal F	21:00 Gonal F	21:00 Gonal F	21:00 Gonal F	21:00 Gonal F	21:00 Gonal F		22:00 Pregnyl®		
<p>NB! Риск за преждевременна лутенизация съществува от 6-ти ден на стимулацията при показатели на LH≥10 IU/ml и серумен прогестерон ≥ 1 ng/ml</p>					УЗ фолику- лометрия (наличие на поне 1 фоликула > 12-13 мм)		УЗ фолику- лометрия	УЗ фолику- лометрия (наличие на поне 3 фоликула > 18 мм)	УЗД	08:00, 15:00, 22:00 Utrogestan или Progesteron	08:00, 15:00, 22:00 Utrogestan
					LH Progesteron		E ₂		E ₂		

Приложение 2

КЪС ПРОТОКОЛ С МИКРОДОЗИ АГОНИСТ ОТ 1 ДЕН НА МЕСЕЧНИЯ ЦИКЪЛ
(ПОДХОДЯЩЕ САМО ЗА ЖЕНИ С ПРЕДПОЛАГАЕМ ИЛИ ДОКАЗАН ЛОШ ОТГОВОР НА ЯЙЧНИЦИТЕ)

Дата: Decareptyl 0.025 (една четвърт от ампулата)	Дата: Decareptyl 0.025	Дата: Decareptyl 0.025 + GONAL F (1 ден от стимулацията)	Дата: Decareptyl 0.025 + GONAL F 2 ден	Дата: Decareptyl 0.025 + GONAL F 3 ден	Дата: Decareptyl 0.025 + GONAL F 4 ден	Дата: Decareptyl 0.025 + GONAL F <i>ВИДЕОЗОН</i> 5 ден
Дата: Decareptyl 0.05 (половин ампула) + GONAL F 6 ден	Дата: Decareptyl 0.05 (половин ампула) + GONAL F 7 ден	Дата: Decareptyl 0.05 (половин ампула) + GONAL F 8 ден	Дата: Decareptyl 0.05 (половин ампула) + GONAL F 9 ден	Дата:	Дата:	Дата:
Дата:	Дата:	Дата:	Дата:	Дата:	Дата:	Дата:
Дата:	Дата:	Дата:	Дата:	Дата:	Дата:	Дата:

Приложение 3

Дълъг протокол от 21-ден на предходния МЦ

Дата: Desareptyl 0.1 <i>21 ден на МЦ</i>	Дата: Desareptyl 0.1 <i>22 ден</i>	Дата: Desareptyl 0.1 <i>23 ден</i>	Дата: Desareptyl 0.1 <i>24 ден</i>	Дата: Desareptyl 0.1 <i>25 ден</i>	Дата: Desareptyl 0.1 <i>26 ден</i>	Дата: Desareptyl 0.1 <i>27 ден</i>
Дата: Desareptyl 0.05 (половин ампула от 0.1) + <u>GONAL F</u> <u>1 ден от стимулацията</u> при Естрадиол < 50 pg/ml	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <u>2 ден</u>	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <u>3 ден</u>	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <u>4 ден</u>	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <u>5 ден</u> Видеозон за броя фоликули	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <u>6 ден</u>	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <u>7 ден</u>
Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <i>8 ден</i>	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <i>9 ден</i>	Дата: Desareptyl 0.05 + <u>GONAL F</u> <i>10 ден</i>	Дата:	Дата:	Дата:	Дата:

Приложение 4

МЕДИЦИНСКИ ЦЕНТЪР ЗА АСИСТИРАНА РЕПРОДУКЦИЯ "ВАРНА" ООД

Варна 9000, бул. Цар Освободител № 150

VARNA MEDICAL CENTER FOR ASSISTED REPRODUCTION

Bulgaria, Varna 9000, 150 Tzar Osvoboditel Str.

Телефон за контакти: + 359 52 613 805

GSM: 0889 535 743

Website: www.ivfcentre-varna.com

E-mail: alexandrov_md@abv.bg

Дата:

Име на пациента:

ЕГН:

Адрес:

ПАЦИЕНТ

Време на
продуциране:

Време на
получаване:

Време
на анализ:

Място на
продуциране:

Метод на
колекция: Мастурбация

Възбържание:

Затруднение при
отделянето:

Употребявани
лекарства:

Цялост
на еякулата:

СЕМЕННА ТЕЧНОСТ

НОРМА

Обем: mL

≥ 1,5 mL

Втечняване: минути

до 60 минути

Вискозитет:

нисък

Цвят:

белезникав

Частички:

минимално

Аглутинации:

минимално

pH:

≥ 7,2

СПЕРМАТОЗОИДИ

Концентрация: x 10⁶/ mL

≥ 15 x 10⁶/ mL

Общ брой: x 10⁶

≥ 39 x 10⁶

Подвижност
(прогресивно + непрогресивно): %

≥ 40%

Прогресивно подвижни %

≥ 32%

Не-прогресивно подвижни: %

%

Неподвижни: %

< 60%

МОРФОЛОГИЯ

Нормални форми: %

≥ 4%

Кръгли клетки: x 10⁶/ mL

< 1 x 10⁶/ mL

Коментар:

Диагноза:

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам сърдечни благодарности на научния ми ръководител проф. д-р Емил Ковачев, д.м.н., за предоставената ми възможност и безрезервната подкрепа през целия път на научното и професионалното ми развитие. Благодаря за указаната подкрепа и съдействие в процеса на разработване на настоящия дисертационен труд.

Благодаря на проф. Иван Козовски и екипа на Медицински център по асистирана репродукция „Варна“ ООД – гр. Варна за съвместната ни работа и предоставените данни за осъществяване на проучването.

Дълбоко признателна съм на проф. Емил Ковачев, д-р Кателия Александров и доц. Стефан Кисъв, които ме въведоха в изкуството на асистираната репродукция, поставиха основите на моите познания в областта и запалиха любовта ми към тази благородна и красива част от професията.

Благодаря на д-р Здравка Велева, д.м., (Хелзинки) за цялостната ни дейност върху проблема извънматочна бременност и АРТ, професионалните консултации и помощ в работата ми с научна литература и статистическата обработка на данните.