



**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

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II.	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	8
III.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	51
IV.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	53
V.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	78
VI.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	143
VII.	ИЗВОДИ.....	145
VIII.	ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	147
IX.	ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	149
X.	БИБЛИОГРАФИЯ.....	151

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- ESHRE - Европейска Асоциация по Човешка Репродукция и Ембриология
- PRP - Platelet -rich plasma
- IVF - ин витро фертилизация
- КОХ - контролирана овариална хиперстимулация
- FSH - фоликуло симулиращ хормон
- LH - лутеинизиращ хормон
- МII - метафаза II
- aGnRH - агонист на гонадолиберина
- ЧХГ - човешки хориогонадотропин
- ФП - пункция на фоликули
- ICSI - intracitoplasmic sperm injection
- ET - ембриотрансфер
- ART - асистирани репродуктивни технологии
- KPI - Key Performance Indicators
- СОС - кумулузно-ооцитни комплекси
- IVM - ин-витро матурация
- GV - герминален везикул
- PV - полярно телце
- PVS - перивителинно пространство
- ZP - зона пелуцида
- MI - метафаза I
- FI - фертилизационен индекс
- RI - Roundness index
- CLGC - централна цитоплазмена гранулация
- sRECs - клъстери гладък ендоплазмен ретикулум
- CZP - cracked zona pellucida
- KB - клинични бременности
- EZP - празна зона пелуцида

- ИТМ - индекс на телесната маса
- MOMS - metaphase II oocyte morphology score
- OLS - oocyte literature score
- ИИ - изкуствен интелект
- СПКЯ - синдром на поликистозните яйчници
- ПЯО - преждевременно яйчниково отпадане
- ОХСС - овариален хиперстимулационен синдром
- ТВБ - тазово възпалителна болест
- ROS - reactive oxygen species
- VOCs - volatile organic compounds
- ФП - Фоликулярна пункция
- NM - нормална матурация
- ПАВ - полицикличните ароматни въглеводороди
- SV - Spindle view
- SR - Survival rate
- ChatGPT - Chat Generative Pre-trained Transformer
- ОХРНOS - митохондриално окислително фосфорилиране
- АТФ - аденозин трифосфат
- БАСРЗ - Българска асоциация по стерилитет и репродуктивно здраве

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 1978 г. 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 2023 г. 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 гаметети, които могат да се добият в един стимулационен цикъл. Именно повишаващата се средна възраст на жените, търсеци 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 гаметети за репродукция е предизвикателство, което ще бъде основният актуален фокус през следващите години от развитието на съвременната репродуктивна медицина и ембриология.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Човешката яйцеклетка – исторически преглед

В днешни дни добиването и извършването на разнообразни по своя характер манипулации върху човешки яйцеклетки е рутинна практика за всяка клиника по асистирана репродукция. До преди няколко десетилетия назад обаче малък брой клиницисти и биолози са виждали жизнена женска гамета, принадлежаща към нашия вид. За разлика от почти всички тъкани, органи и системи, внимателно проучени и описани през вековете, репродуктивните клетки, оплождането и първите етапи на живота оставали загадка. (R. Gosden & Lee, 2010) Началото на този забележителен процес на открития е поставено с фундаменталния труд на Karl Ernst von Baer от 1827 г. „Ovi Mammalium et Hominis genesi,, (Von Baer, 1827) който открил яйцеклетка посредством микроскопско изследване на съдържанието на овариален фоликул. Това иницирирало множество проучвания по процесите на оплождането и развитието на ембрионите в следващите десетилетия. Редица поколения доктори и биолози, разпознавайки овоцита като единична клетка, развили клетъчната теория, ядрото било проучено и мейозата описана като уникален процес, протичащ единствено в гаметите (Антонова и съавт., 2020).

В статия от 1919 година, A. Thomas публикува снимки със забележително за времето си качество на кумулулно-ооцитни комплекси в различен стадий на мейотичното делене. Овоцитите са получавани от трупни донори и съхранявани във формалин (Thomson, 1919).

Жизнени яйцеклетки са изолирани и описани в началото на 30те години. През 1944г. Hamilton WJ прави едни от първите снимки на изолирани витални човешки яйцеклетки, както и детайлен опис на всички предишни успешни процедури по добиване и съхраняване на свежи овоцити и стадия, на който са се намирили (Hamilton, 1944).

От края на 50те години до наши дни, след като R. Edwards започва своите проучвания върху възможностите за оплождане в лабораторни условия, историята на човешката яйцеклетка е неразривно свързана с историята на ин витро и асистираната репродукция като цяло. В края на 60те години той развива редица методи за добиване, съхраняване, матуриране и оплождане на яйцеклетки. През 70те години, в колаборация с P. Steptoe успяват да отгледат човешки ембриони до различен стадий в ин витро условия и започват с опитите да ги връщат обратно в матката (Lui Yovich, 2020).

Епохалният пробив и венецът на неговите дългогодишни усилия е раждането на първото ин витро бебе Луиз Браун през 1978г (Brinsden & Brinsden, 2009). За този принос към науката R. Edwards получава през 2010г Нобелова награда.

2. Хронология на един ин витро цикъл

Всеки цикъл на ин витро фертилизация (IVF) протича в 2 основни етапа – гинекологична част и ембриологична част.

2.1 Гинекологична част

По време на гинекологичната част от процедурата се извършва контролирана овариална хиперстимулация (КОХ), целяща вербуване, активация и растеж на възможно най-оптимален брой фоликули (Daforoulos & Tarlatzis, 2023). Този етап започва с прилагане на фоликуло стимулиращ хормон (FSH) съдържащи препарати по различни схеми – стимулационни протоколи. Общ принцип на овариалната хиперстимулация е чрез повишаване нивата на FSH да се вербуват и развиват повече от един доминантни фоликули, като същевременно се поддържа ниско нивото на лутеинизиращия хормон (LH) с цел предотвратяване на преждевременната лутеинизация на яйцеклетките или овулация на фоликулите (Dugan, 2020). Основните видове стимулационни протоколи са: дълъг протокол, протокол с антагонист на гонадолиберина, полуспонтанен цикъл или т.нар. минимална стимулация, къс протокол (Devroey et al., 2009; Verberg et al., 2009). FSH препаратите, които се използват, биват две основни групи: уринарни FSH препарати, добити от урина на менопаузални жени (те имат и LH активност) и чисти рекомбинантни FSH и LH. Приложението на FSH започва в ранната фоликуларна фаза, интервалът и дозата са строго индивидуални според характеристиките на пациентката и прилагания протокол. Овариалната стимулация продължава до достигане големина на кохортата зреещи фоликули, отговаряща на зрял Граафов фоликул – 18-20 мм диаметър, измерена с вагинален ултразвуков трансдюсер, и нива на серумния естрадиол, отговарящи на 250-300 мг/мл за един зрял фоликул (Kosmas, Kolibianakis, & Devroey, 2004). Краят на овариалната хиперстимулация е предизвикването на изкуствен LH пик имитиращ естествения такъв, с който яйцеклетката завършва метафаза II (MII) на второто мейотично делене. За целта се използват човешки хориогоадотропин (ЧХГ) препарати или агонисти на гонадолиберина (aGnRH). Между 34 и 36 часа след администрацията на препарата за тригериране на овулацията се извършва фоликуларна пункция (PF). Тя е инвазивна манипулация, извършва се под обща венозна анестезия. Под ултразвуков контрол с трансвагинален достъп се извършва аспирация на фоликуларната течност от доминантните фоликули на двата яйчника и се предава в ембриологичната лаборатория.

2.2 Ембриологична част

Ембриологичната (лабораторната) част на ин витро цикъла се състои от няколко етапа, които са от ключово значение за изхода от лечението (Prasath, 2023). Той започва от постъпване на епруветките, съдържащи фоликуларната течност в IVF отделението.

Ден 0 – Оплождане: В деня на фоликуларната пункция, отбелязван в ембриологичните протоколи като ден 0 се прави анализ и оценка на добитите яйцеклетки и сперматозоиди и

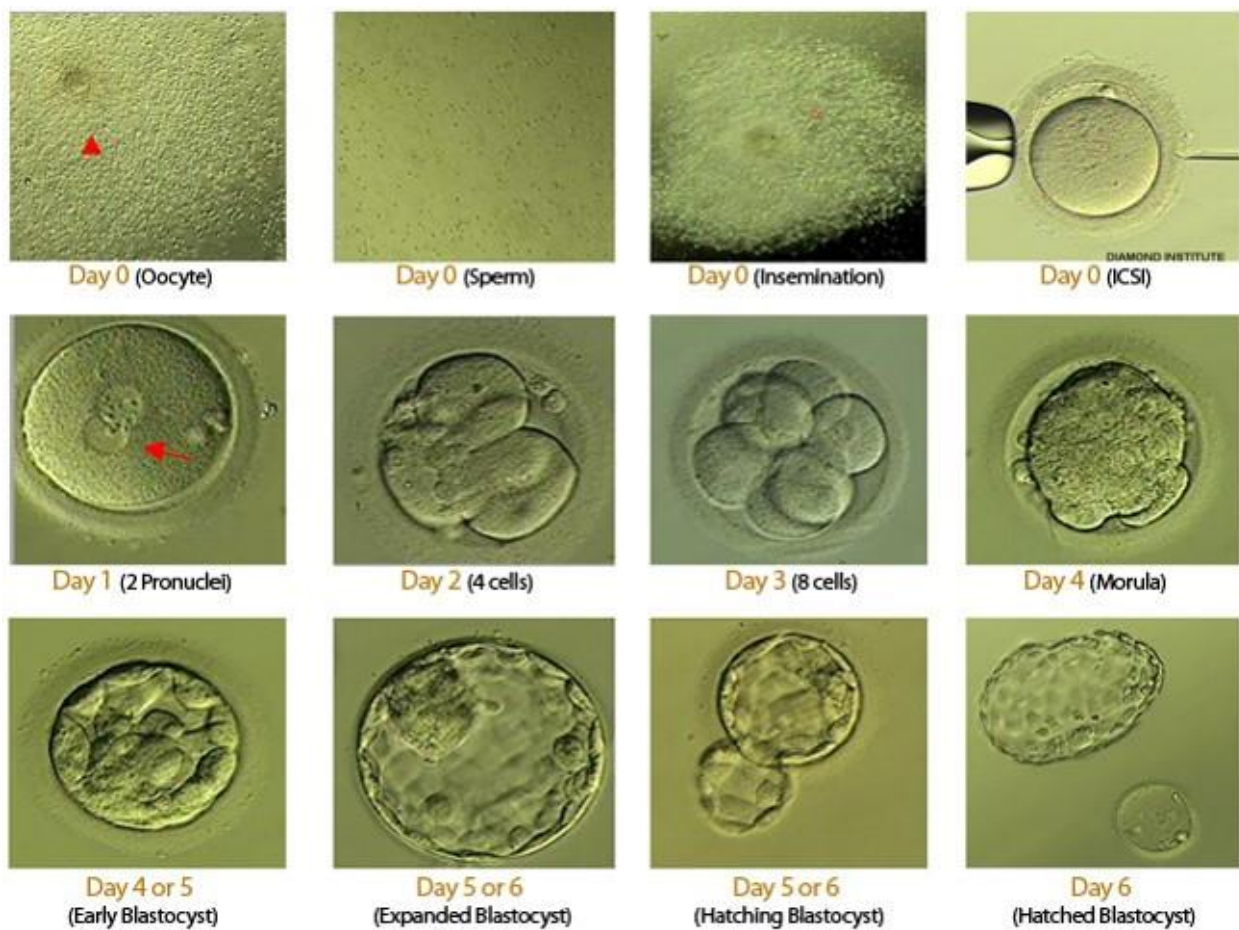
се извършва оплождане чрез класическа IVF (Stephoe & Edwards, 1978) процедура, или чрез инжектиране на всяка яйцеклетка с единичен сперматозоид - ICSI (intracytoplasmic sperm injection)(Palermo, Joris, Devroey, & Van Steirteghem, 1992).

Ден 1 - Зиготен стадий: На този ден, след 16-18 часа инкубиране се отчита наличие или липса на оплождане чрез наблюдение на пронуклеуси в инсеминираната яйцеклетка (Nagy et al., 2003).

Ден 2-4 Клетъчен стадий: През следващите няколко дни се мониторира развитието на получените ембриони, които преминават през няколко поредни етапа на клетъчно делене (Prados, Debrock, Lemmen, & Agerholm, 2012).

Ден 5 Стадий бластоцист: Само част от изходната кохорта ембриони достигат до бластоцистен стадий и това е един от най-добрите индикатори за еуплоидния характер на ембриона и неговия имплантационен потенциал (Caralbo et al., 2014).

Ембриотрансфер (ЕТ) , криоконсервация, изтегляне и унищожаване: Трансферът на ембриони обратно в матката може да бъде извършен между ден 2 и 5, като най-популярни дни за трансфер са 3ти и 5ти ден (Glujovsky et al., 2022; Neblett et al., 2021). Тези от останалите нетрансферирани ембриони, които са с добри морфологични параметри могат да бъдат замразени и съхранявани в течен азот за неопределен срок от време. Всички останали гамети, неоплодени яйцеклетки, стационари или дегенерирали ембриони се подлагат на унищожаване (фиг. 1).



Фиг. 1. Хронология на ин витро цикъла (Източник: Embryo atlas ESHRE)

На всеки един от тези етапи има създадени и утвърдени критерии за анализ и оценка, благодарение на които може да се създаде една цялостна картина на ин витро цикъла – т. нар. embryo history (фиг. 2).

Нива на оценка “Embryo history”



Фиг. 2. Нива на оценка

3. Методи за оценка и селекция на яйцеклетки

В последните две десетилетия се работи много активно по темата кои външни прояви на яйцеклетката имат отношение към генетичния ѝ статус, оплодителната и способност, качеството на генерирания ембрион и неговия имплантационен потенциал. Многобройните публикации и изследвания са разгледани и обобщени в 2 мащабни проекта –ESHRE за добра лабораторна практика от 2015 г. (Labs et al., 2016) и Истанбулския консенсус Alpha scientists за оценка на ембриони от 2011 г. (Medicine & Embryology, 2011). Основните изводи на двете работни групи специалисти до голяма степен се припокриват относно критериите за оценката на овоцитите като предиктивен фактор за изхода от асистирани репродуктивни технологии (АРТ).

В следствие на това, през 2017 г. се съставя нова работна група и се публикува ново споразумение – под формата на Виенски консенсус ("The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators†‡," 2017). Освен като своеобразен обединител на първите 2 проекта, се създават и нови термини и стандарти, позволяващи да се измери качеството на работа в ембриологичната лаборатория. Като изводи са обособени общо 19 индикатора за минимални и топ резултати, 12 от тях са KPI (Key Performance Indicators) – Ключови индикатори за резултатност – те измерват резултатите на всички най-важни процедури, извършващи се в ин витро лабораторията, 5 са PI (Performance Indicators), които трябва да се документират и съхраняват, дори да не се рапортуват или правят рутинно и 2 RI (Reference Indicators) –

референтни индикатори – отнасят се за яйцеклетките, постъпващи в ин витро лабораторията и могат да служат като оценка на овариалната стимулация.

3.1 Оценка и селекция на кумулулно-ооцитни комплекси

Още по време на фоликуларната пункция започва откриването и експертизата на кумулулно-ооцитните комплекси (COC). В ламинарен бокс с постоянен поток на стерилен въздух фоликуларното съдържимо се прехвърля от епруветката в петриеви съдове и под стерео микроскоп се откриват яйцеклетките с прилежащите им кумулулни клетки.

Морфологична оценка

Компактността на кумулулните клетки и клетките на корона радиата служат като морфологичен маркер с който да се определи зрелостта на яйцеклетката. Във Виенския консенсус, приет от ESHRE ("The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators†‡," 2017) пропорцията на кумулулно-ооцитни комплекси с диспергиран кумулулен комплекс е отбелязан като един от важните индикатори за качеството на яйцеклетките. Овулацията задвижва и тригерира кумулулната експанзия чрез медиране на синтеза на хиалуронова киселина и организацията на стабилен целуларен матрикс. Зрелите яйцеклетки имат добре експандирани клетки на корона радиата подредени в няколко слоя и разделени чрез екстацелуларния матрикс. С отдалечаване от короната, кумулулните клетки стават все по-малко компактни. Яйцеклетката е ясно видима през слоевете гранулозни клетки (Magli, Jones, Lundin, & van den Abbeel, 2012) (фиг. 3). Този индикатор дава информация за качеството на комуникация между яйцеклетката и нейните кумулулни клетки.

При висока степен на незрялост, особено в цикли с ин-витро матурация (IVM), при които добитите яйцеклетките най-често са на стадий герминален везикул (germinal vesicle, GV) (Pietroforte et al., 2023), кумулулните клетки са плътно подредени една до друга, а корона радиата е многослойна и не позволява ясна видимост на яйцеклетката (P. Goud et al., 1998).

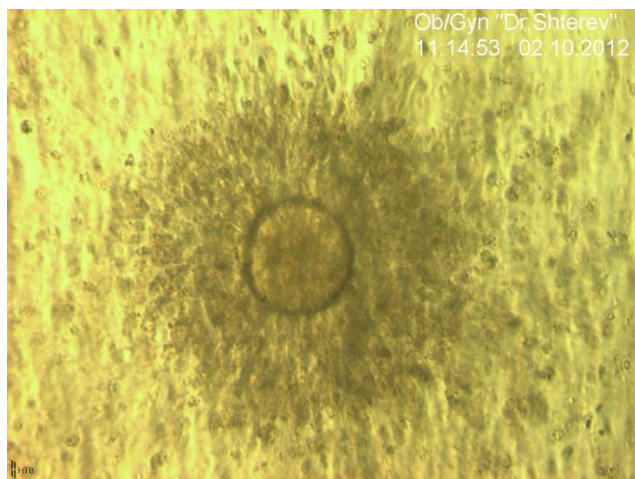
Лутеинизираните яйцеклетки, получени най-често от кистични фоликули се характеризират с широко диспергирани кумулулни маси (Regan et al., 2018), които образуват отделни клъстери помежду си, единични клетки на короната, голям екстрацелуларен матрикс и ясно видим овоцит (Goldman et al., 1993).

През 2011г. Истанбулският консенсус на Alpha scientists предлага въвеждането на бинарна оценка (Medicine & Embryology, 2011). Кумулулно-ооцитни комплекси, оценени като „добри“ получават 1 точка. Това са тези, които имат експандиран кумулулус и лъчиста корона радиата. Специалистите в тази среща се обединяват около становището, че

оценката на СОС няма предиктивна стойност за потенциала на получения ембрион, но може да служи като маркер за евентуален проблем с матурацията.

Генна експресия на гранулозните клетки

Още от въвеждането на ин витро методиката за оплождане при човека започва изследването на редица биохимични маркери на кумулусните клетки, които биха имали отношение към компетентността на яйцеклетката (Byskov, Andersen, Hossaini, & Guoliang, 1997; Jackson Wu, Wang, & Wan, 1993). Създаването на транскриптомен профил е метод за неинвазивна оценка, който има добра предиктивна стойност за оплождането, качеството на получения ембрион и имплантационният му потенциал. (Uyar, Torrealday, & Seli, 2013). През годините са изследвани експресията на редица маркери (Q. Liu et al., 2023), но този тип оценка на овоцитите така и не се е наложил в рутинната лабораторна практика, най-вече поради необходимостта от допълнителна специализирана апаратура за генетичен анализ (фиг. 3).



Фиг. 3. Зряла яйцеклетка с широко диспергиран кумулус и корона радиата

3.2 Оценка и селекция на яйцеклетки

При класическата ин витро процедура след 2 до 4 часова инкубиране, към кумулусно-ооцитните комплекси се добавят обработени, изолирани и капацитирани прогресивно подвижни сперматозоиди в концентрация между 0.1 и 0.5×10^6 . Кумулусните комплекси се коинкубират заедно със сперматозоидите за 17 ± 1 h период от време, след което се извършва проверка на оплождането. Приложението на тази методика не позволява оценяването на яйцеклетките по морфология и зрялост поради присъствието на гранулозните клетки.

Когато като метод за оплождане се използва ICSI, яйцеклетките се денудират, като гранулозните клетки се премахват ензимно чрез добавяне на хранителна среда, съдържаща

хиалуронидаза, след което механично посредством пипетиране се прави фино отстраняване на клетките на корона радиата, които са най-плътни и силно прикрепени към зона пелуцида (ZP). След като процеса на денудация приключи и всички съставни компоненти на яйцеклетките са ясно видими, се оценява зрелостта и качеството им чрез визуализация с инвертен микроскоп на увеличение x200.

3.2.1 Зрялост на яйцеклетките

Според препоръките на Европейската Асоциация по Човешка Репродукция и Ембриология, единствено зрелите, метафаза II яйцеклетки трябва да се подлагат на оплождане (Labs et al., 2016). Те имат ясно отдиференцирано интактно полярно телце, разположено в перивителинното пространство. По данни на ESHRE, около 85% от добитите след КОХ яйцеклетки са на стадий MII (Magli et al., 2012). Останалите около 15% са на стадий GV или метафаза I (MI).

Според Виенския консенсус ("The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators†‡," 2017), процентът на зрелите спрямо общият брой добити яйцеклетки (Maturity rate) е един от двата най-важни референтни индикатора. Заедно с пропорцията добити яйцеклетки спрямо броя фоликули (Recovery rate) дават добра информация за отговора на стимулацията. Като норма са въведени стойности от 80-95% Recovery rate и 75-90% Maturity rate (фиг. 4).

RIs for identifying performance of the ART laboratory.

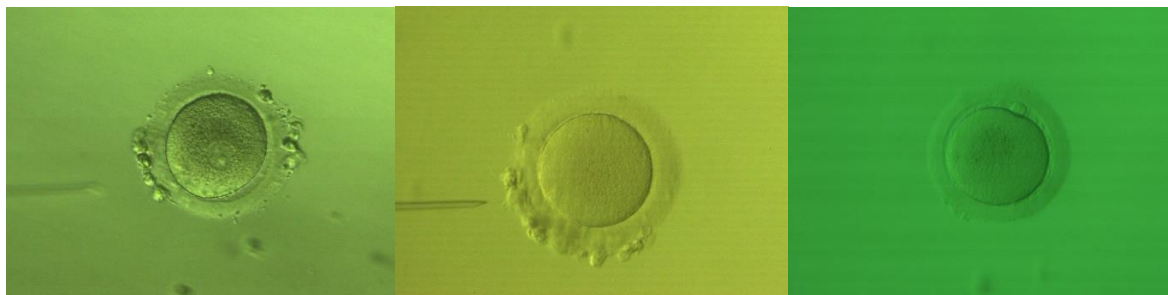
RI	Calculation	Benchmark value
Proportion of oocytes recovered (stimulated cycles)	$\frac{\text{no. oocytes retrieved}}{\text{no. follicles on day of trigger}} \times 100$	80-95% of follicles measured
Proportion of MII oocytes at ICSI	$\frac{\text{no. MII oocytes at ICSI}}{\text{no. COCs retrieved}} \times 100$	75-90%

MI, metaphase II; RI, reference indicators; COC, cumulus-oocyte complex.

Фиг. 4. Изчисляване на Recovery rate и Maturity rate според Виенския консенсус

В миналото са правени редица опити за ин витро матуриране на незрелите яйцеклетки (фиг. 5), но резултатите от тяхното оплождане и по-нататъшно развитие като ембриони са силно незадоволителни. Генетични анализи показват, че тези яйцеклетки са с много по-висок процент анеуплоидии (Smith et al., 2010) в сравнение със зрелите MII яйцеклетки, добити от същия стимулационен цикъл. Резултатите от оплождането показват занижен фертилизационен индекс (FI), а получените ембриони имат нисък имплантационен потенциал (Shu et al., 2007). С увеличаване на възрастта на лекуваните пациентки,

ефективността рязко намалява след 25-годишна възраст (Karavani et al., 2021). Ин-витро матурирането, изчакването и оплождането на незрели яйцеклетки, които са добити от класически стимулационен цикъл не повишава броя на качествените ембриони за трансфер и процентът постигнати клинични бременности (Jindal et al., 2005).



Фиг.5. Яйцеклетки в различен матурационен стадий – герминален везикул, метафаза I и метафаза II

3.2.2 Морфологични характеристики на яйцеклетките

Едно от класическите и най-често цитирани определения за „нормална“ яйцеклетка е на L. Veeck от 1988 г. и гласи: „Зрелите яйцеклетки с добро качество трябва да имат гладка до леко гранулирана цитоплазма, малко перивително пространство и светла и прозрачна зона пелуцида“ (Veeck, 1988).

За разлика от сперматозоидите, строга селекция и отпадане на някои овоцити е трудно осъществима поради силно ограничения им брой. На практика, основният подход в ембриологията е всички яйцеклетки, които покриват основния критерий (да са в стадий МII) да бъдат подлагани на оплождане, независимо от това дали имат отклонения в морфологията или не. Това от своя страна може да доведе до редица нежелани резултати, като ембриони с лошо качество, занижен шанс за бременност, повишен процент спонтанни аборти и т.н. (F. Ubaldi, Rienzi, & Vajta, 2010). Ето защо акуратното документиране, проследяване на яйцеклетки с морфологични отклонения, както и взимането им под внимание при селекцията на ембриони за трансфер е изключително важно (Nikiforov, Grøndahl, Hreinsson, & Andersen, 2022).

Според редица изследвания, повече от половината яйцеклетки, добити след КОХ показват различни отклонения от нормата (Ebner, Moser, & Tews, 2006). Те могат да са в резултат от различни причини – възраст на пациента, генетични дефекти, стимулационни протоколи, различни заболявания, но само част от тях имат значение крайния резултат от лечението (Balaban & Urman, 2006).

Като цяло научните екипи разграничават 2 основни групи морфологични особености: екстрацелуларни и интрацелуларни.

Екстрацелуларните изяви, които са изследвани, могат да се обединят в 2 основни групи: фенотипни проявления на нормата и маркери на овоцитното стареене.

Фенотипни изяви на нормата. Това са дефекти в зона пелуцида и отклонения във формата на яйцеклетката (фиг. 6).

Зона пелуцида

Зона пелуцида изпълнява редица важни функции, най-вече в процеса на оплождане, както и по време на първите деления на ембриона, където служи като морфодинамична преграда между него и заобикалящата го микро среда. В своите морфологични проявления, ZP показва широк набор от вариации, свързани с размера, формата (Xiong et al., 2018), цвета и дебелината ѝ (Azarkh, Cao, Floehr, & Schnakenberg, 2023). Докато първите 2 параметъра се считат за пациент-специфични и нямащи отношение към изхода от АРТ, то според съгласието на Истанбулския консенсус, би трябвало да се отбелязват отклоненията в цвета и дебелината. Яйцеклетките с тъмна ZP са свързани според някои изследвания с понижен фертилизационен и имплантационен потенциал (Shi et al., 2014), а дебелината е свързана с възрастта на пациента и има отношение към оплождането и крайния резултат (Ghannadi et al., 2011).

Аномална форма на яйцеклетката

След отстраняване на кумулусно-ооцитните комплекси е възможно да се открият овоцити по форма, различна от нормалната. Най-често срещаното отклонение са овоидните яйцеклетки (Balaban, 2019). Публикуваните данни не откриват съществени разлики във способността да образуват ембрио или да се имплантират (Fréour, Lammers, Splingart, & Barrière, 2013). Важен показател при елонгираните овоцити е т. нар Roundness index (RI), който се изчислява, като се раздели дължината на широчината на яйцеклетката. Ако този индекс е със стойност над 1.8, тогава би трябвало да се има предвид като маркер за понижена имплантация (Tews, Moser, Sommergruber, Shebl, & Ebner, 2007).

Маркери на овоцитно стареене – основните отклонения, които се свързват с остаряването на яйцеклетката и нейната лутеинизация, са размер и гранулираност на перивителинното пространство и фрагментирано първо полярно телце.

Перивителинно пространство

Екипите, изследвали овоцити с голямо перивителинно пространство с различни по размер включения в него, не откриват съществени разлики в последващите резултати от оплождане и имплантация. В съгласието на Истанбулския консенсус е отбелязано, че на този дефект трябва да се обърне внимание единствено ако е екстремно голям (Ferrarini

Zanetti et al., 2018), защото тогава според някои изследвания е възможно да се отрази на резултатите от оплождането (Rienzi et al., 2008).

Морфология на първо полярно телце

Въпреки че изследванията на първо полярно телце са многобройни и датират още от първите стъпки в ин витро методиката, неговото влияние върху резултатите от лечението все още са обект на дебати (Y.-L. Zhang et al., 2022). Някои автори откриват връзка между интактното полярно телце и по-високият процент на имплантация и бременност (Ebner et al., 1999), докато фрагментираното полярно телце се свързва с процеси на стареене на овоцита. В повечето изследвания обаче не се открива пряка връзка между морфологията му и основните изследвани параметри. Единствените случаи, в които се препоръчва да се вземе под внимание, са когато размерите му са многократно по-големи от нормалното. Това може да е сигнал за анеуплоидност на целия овоцит и указанията както на групата на ESHRE за добра лабораторна практика, така и на консенсуса на Alpha scientists е такива яйцеклетки да не се подлагат на оплождане (фиг. 6).



Фиг. 6. Различни екстрацитоплазмени отклонения – голяма зона пелуцида и широко PVS, овоидна форма на яйцеклетката, включения в перивителинното пространство

Интрацитоплазмени отклонения

За разлика от екстрацитоплазмените, при изследване на интрацитоплазмените отклонения, авторите са много по-обединени в изводите си и резултатите при голяма част от публикуваните статии са сравними. Още през 1995 година – едва няколко години след въвеждането на ICSI методиката, от същия екип е въведено и понятието ”интрацитоплазмен дисморфизъм” (Alikani et al., 1995).

В литературните данни се открояват няколко прояви на този дисморфизъм, които имат отношение както към еуплоидния статус на яйцеклетката, така и към нейната по-нататъшна съдба (Ozturk, 2020). Това са: наличието на вакуоли, централна гранулация, гигантски размер на яйцеклетките, агрегация на гладкия ендоплазмен ретикулум, тъмна цитоплазма. (фиг. 7).

Вакуоли

„Вакуоли“ е общото название на включения в цитоплазмата, които са отделени посредством мембрана и са виртуално идентични с течността в перивителинното пространство. Процентът яйцеклетки, съдържащи вакуоли може да варира между 3.1% до 12.4% според различни данни, докато мултвакуолизацията е относително рядко срещана (1% до 1.5%) (Balaban, 2017). Според всички литературни данни, малките вакуоли (до 5-10 μm в диаметър), изпълнени с бистро съдържимо не причиняват никакви биологични последици. Консенсусно за стойност, която има значение е определена над 14 μm . Наличието на големи вакуоли над тази стойност сигнификантно намалява процентът на оплождане, а продължителното им присъствие след сингамията понижава процентът на бластоцисти (Mayer et al., 2018).

Централна гранулация

Според данните от последните години се налага разграничаване на дифузната гранулация от централната гранулация поради различните ефекти, които причиняват (Yi, Xi, Zhang, & Yang, 2019). Леката дифузна гранулация е възможно да е вариабилна проява на цитоплазмата без съществено биологично значение (L. Zhang et al., 2022). Едрозърнестата гранулация при някои изследвания показва отношение към оплождането и качеството на ембрионите ако е в съчетание с тъмна цитоплазма (Ten, Mendiola, Vioque, de Juan, & Bernabeu, 2007; Yu, Ahn, Lee, Jee, & Kim, 2015).

При централната гранулация (CLGC – Central Located Granulation of the Cytoplasm) се наблюдава ясна граница между гранулираната зона и останалата част от яйцеклетката. Цветът на цитоплазмата също е различен – тъмен в зоната на гранулирането и светъл в останалата част от цитоплазмата. За този тип яйцеклетки консенсусно е въведено определението „organelle clustering“, което е доказано свързано с понижен имплантационен потенциал.

Гигантски яйцеклетки

По размери яйцеклетките може да варират значително и това е в границите на нормата. Съвсем различна е ситуацията с т.нар. гигантски яйцеклетки, които достигат размери до около 200 μm , колкото ембрион на стадий бластоцист и имат почти двоен обем в сравнение с нормалните овоцити. За да бъде определена една яйцеклетка като „гигантска“ е необходимо акуратно измерване – между границите на оволемата без да бъдат включвани зона пелуцида и перивителинното пространство (Lehner et al., 2015).

Този тип яйцеклетки се срещат сравнително рядко (< 1%), но генетичният им анализ показва наличие на един диплоиден или два хаплоидни сета хромозоми и съответно 1 или 2 полярни телца (Petrushko, Buderatska, Gontar, & Yurchuk, 2021). Когато проявяват оплождане, дори ако е нормално такова, анализираниите ембриони почти винаги показват различни анеуплоидии (Balakier et al., 2001).

Поради тази причина препоръките на ESHRE за добра лабораторна практика категорично препоръчват такива яйцеклетки да не се подлагат на оплождане и да не се трансферират.

Агрегация на гладък ендоплазмен ретикулум

Клъстерите гладък ендоплазмен ретикулум (sRECs - Smooth Endoplasmic Reticulum Clusters) са лесно разграничими от вакуолите по това, че не са отделени с мембрана от цитоплазмата. Точният механизъм на формиране на ендоплазмените дискове не е изяснен, но се предполага, че е свързано със структурни и функционални промени в ендоплазменния ретикулум по време на овоцитната матурация (Nikiforov et al., 2021). Честотата на срещане е 5-10% и понякога може да бъдат пропуснати поради трудна визуализация с инвертен или стерео микроскоп, особено малките по размери дискове. Ако в кохортата яйцеклетки има открита поне една, sREC, това е индикация за повторно внимателно оглеждане на всички останали, защото има голяма вероятност и други овоцити да са засегнати.

Изследванията показват силно занижен фертилизационен и имплантационен потенциал, по-лошо качество на получените ембриони (Junko Otsuki et al., 2018a) висок процент спонтанни аборти и нисък процент живи раждания в цикли, при които има открита поне една яйцеклетка, засегната от sRECs (Junko Otsuki et al., 2018b; J Otsuki, Okada, Morimoto, Nagai, & Kubo, 2004). Няколко публикации, които съобщават за фетуси с тежки генетични аномалии и родено дете с Beckwith-Wiedemann синдром (Akarsu, Çağlar, Vicdan, Sözen, & Vıberođlu, 2009) (J Otsuki et al., 2004) стават повод за оживени дискусии и становища относно това дали такива яйцеклетки да се подлагат на оплождане изобщо.

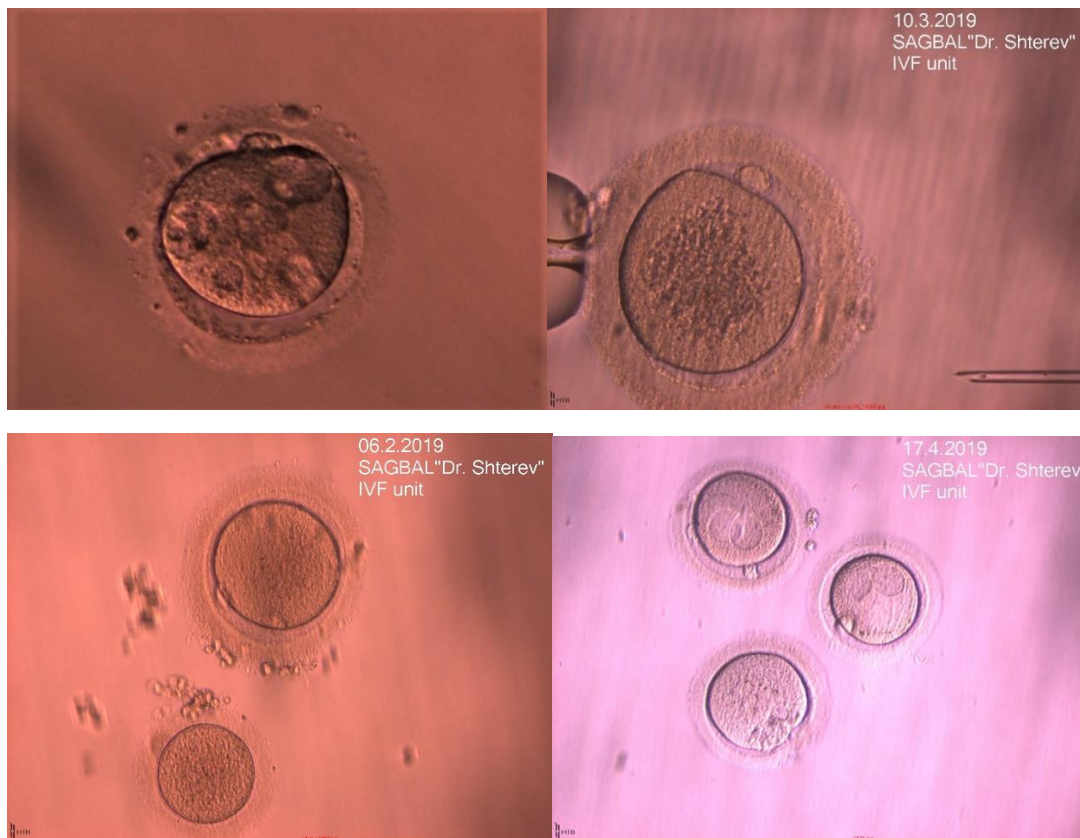
Експертният панел екипи на Alpha scientists от Истанбулския консенсус и публикуваните ръководства от ESHRE Guidelines for good Laboratory practice силно препоръчват ембриони получени от яйцеклетки, съдържащи sRECs да не се трансферират, или само в краен случай, ако липсват други подходящи за трансфер, но при настъпила бременност тя трябва да се мониторира много внимателно на всеки етап. В резултат на това, в последните няколко години се публикуват данни за родени здрави деца от оплождане на яйцеклетки с дискове sREC (Shaw-Jackson, Van Beirs, Thomas, Rozenberg, & Autin, 2014).

Към днешна дата темата е все още силно дискутабилна, но основният извод, който се налага е, че към този тип яйцеклетки трябва да се подхожда с повишено внимание.

Тъмна цитоплазма и зона пелуцида

Яйцеклетките с по-тъмно от нормалното оцветяване са познати в литературата като „brown oocytes” – кафяви яйцеклетки. Срещат се с относително ниска честота (1-5%), като в преобладаващата си част тъмния цвят засяга едновременно цитоплазмата и зона пелуцида и в по-редки случаи се наблюдава единствено тъмна ZP. Точният механизъм на формиране на този специфичен цвят не е изяснен. По време на съзряването на яйцеклетката във фоликула се предполага, че завишените нива на серумния FSH предизвикват различни промени във оцветяването. Освен това морфологично проявление,

редица изследвания показват, че кафявите яйцеклетки са с удебелена зона пелуцида и препоръчват прилагането на асистиран хетчинг ако ще се трансферират. (Н. Xu, Deng, Luo, Diao, et al., 2016). Някои автори свързват наличието на подобен тип яйцеклетки със завишени нива на FSH (Н. Xu, Deng, Luo, Chen, et al., 2016) и съответно понижени нива на имплантация на ембриони, произхождащи от тях. Други статии предполагат, че причината за появата им е ендометриозата – при оценка на аспирираните яйцеклетки на пациентки с ендометриоза се откриват голям брой яйцеклетки с тъмна и гранулирана цитоплазма, които имат нисък оплодителен потенциал (Ceviren, Ozcelik, Urfan, Donmez, & Isikoglu, 2014) (фиг. 7).



Фиг. 7. Интрацитоплазмени дисморфизми – вакуоли, централна гранулация, гигантски яйцеклетки, агрегация на гладък ендоплазмен ретикулум

Атретични яйцеклетки

Въпреки че е добре познат и често срещан феномен в рутинната лабораторна практика, атретичните яйцеклетки рядко са обект на проучвания и публикации. В научната литература се срещат под различни наименования, като атретични, дегенеративни, cracked zona pellucida (CZP), но в последните години най-често срещаното определение за този

тип яйцеклетки е empty zona pellucida (EZP) – празна зона пелуцида (фиг. 8). Във Виенския консенсус са споменати като „degenerated (or empty) zonae pellucidae“ и тяхното процентно съотношение е обсъждано като евентуален фактор за ефективност, който обаче не е включен във финалните 19 фактора.

Все още няма категорично становище за произхода на атретичните яйцеклетки. В научната литература авторите се обединяват около 2 възможни сценария: Механична травма по време на фоликуларната пункция, като от своя страна тя може да се дължи на дефекти и/или ригидност на самата зона пелуцида, или вследствие на високото налягане при аспирацията. Вторият предполагаем произход е свиване и загиване на самата яйцеклетка във зоната следствие на матурационни дефекти или влияние на външни фактори (Cordeiro, Calhaz-Jorge, Leal, Barata, & Coelho, 1993).

За връзката между атретичните яйцеклетки и резултатите от асистирана репродукция има публикувани две скорошни статии. Аки Оринде и сътр. през 2018 г. установяват сигнификантна връзка между циклите, в които има открити атретични яйцеклетки и понижен процент оплождане, по-малък брой ембриони с добро качество и занижени нива на достигнати клинични бременности (КБ) (Oride, Kanasaki, Hara, Ohta, & Куо, 2017).

Ozgur Cinar и сътр. изследват връзката между EZP и яйчниковият отговор и въвеждат понятието EZPI - empty zona pellucida index като съотношение между броя на атретичните яйцеклетки спрямо общия брой кумулусно-ооцитни комплекси, добити от пункцията на фоликулите. Като референтна граница приемат 0.17 – стойности над този индекс са свързани с понижен брой антрални фоликули, по-малък брой добити яйцеклетки, по-нисък процент оплождане и бременности (Cinar et al., 2012).

Поради слабият научен интерес към този тип яйцеклетки, все още няма ясно установени норми и граници за процентното им присъствие в рамките на един цикъл и за честотата на цикли с EZP.



Фиг. 8. Атретична яйцеклетка с кумулусни клетки, зона пелуцида и остатъци от дегенеративна цитоплазма

3.2.3 Физиологични характеристики на яйцеклетките

Оценка на специфичните физиологични качества на яйцеклетките може да се направи спрямо техните показатели по време на ICSI процедура, при която с инжекционната пипета се пробива оолемата, аспирира се част от цитоплазменото съдържимо и заедно със селектирания сперматозоид се връща обратно. По време на процедурата на инжектиране овоцитите показват различни физиологични реакции, дължащи се на вариации във вискозитета на цитоплазмата, нейната хетерогенност и еластичността на клетъчната мембрана (Shen et al., 2019). В резултат на това се образуват различни по големина и продължителност на проява инжекционни „фунийки“ (фиг.9). Тези разлики е възможно да се дължат на това, че по време на КОХ се добиват яйцеклетки от фоликули с различна васкуларизация (Van Blerkom, Antczak, & Schrader, 1997), също така има различен синхрон между нуклеарното и цитоплазменото зреене.

Цитоплазменото съзряване включва множество метаболитни и структурни изменения, които подготвят яйцеклетката за предстоящото оплождане. Кохортата от МП яйцеклетки, която се добива в един стимулационен цикъл може да покажат разлики в степента на цитоплазмена зрялост (Du et al., 2022). Поради тази причина по време на ICSI процедура се наблюдават и разлики в плътността на яйцеклетката (Tews et al., 2003).

Яйцеклетки с нормален вискозитет и еластична мембрана имат много по-добър оплодителен потенциал, докато при овоцитите с ниска цитоплазмена плътност и ригидна оволема рискът от дегенерация след ICSI е голям (Antonova, Veleva, Petkova, & Shterev, 2011).



Фиг. 9. различни прояви на цитоплазмената и мембранната еластичност при ICSI

Кумулативен ефект

През 2010г. L. Rienzi и сътрудници публикуват обширен мета анализ по темата за влиянието на овоцитната морфология и физиология върху резултатите от АРТ. Основният извод от анализираните 2165 статии потвърждава данните за разгледаните вече физиологични, екстра- и интрацитоплазмени изменения и освен това отбелязва ефектът от кумулативното въздействие, когато в една яйцеклетка се наблюдават повече от 1 дефект. Кумулативният ефект е често срещано явление и той е от ключово значение за компетентността на яйцеклетката (F. Ubaldi et al., 2010).

Един по-скорошен систематичен преглед от 2022 г. потвърждава направените изводи, като анализира 10 публикации, посветени на влиянието на кумулативният ефект на различните морфологични и физиологични характеристики на яйцеклетките върху техния потенциал за развитие (Bartolacci et al., 2022).

3.2.4 Системи за оценка на яйцеклетки

В своите препоръки за добра лабораторна практика, специалистите от ESHRE отбелязват, че при ICSI процедура морфологията на денудураните яйцеклетки трябва да бъде описана.

В статия, описваща връзката на овоцитната морфология с потенциала на получените ембриони Т. Ebner също подчертава, че качеството на яйцеклетките е силно препоръчително да се включи в общата оценка на ембрионите, за да може да се направи най-адекватна селекция (Ebner et al., 2006).

В лабораторната практика обаче не съществува обединена или унифицирана система за оценка на овоцити. Няколко авторски колектива са предложили сборни системи за оценяване, базирани на различни морфологични и физиологични особености на яйцеклетките, но на този етап нито една не е добила масова популярност и не се е наложила като рутинна процедура в ембриологичните лаборатории (Nikiforov et al., 2022). Най-често цитираните от литературата са 3 системи за оценка: Овоцитен грейд на Р. Хиа

от 1997 г., Овоцитен скор от M. Wilding 2007 г. и MOMS – Метафаза II Овоцитен Морфологичен Скор на L. Rienzi и екип от 2008 г.

Овоцитен грейд, базиран на полярното телце, перивителинното пространство и цитоплазмените включения

Това е един от първите опити за система за оценка на яйцеклетки, създадена едва няколко години след въвеждане на ICSI методиката (Xia, 1997). Тя се базира на 2 основни морфологични маркера – първо полярно телце и перивителинно пространство, според които яйцеклетките са разделени на 4 основни грейда и е проследена корелацията им с оплождането и качеството на ембрионите на клетъчен стадий, като наличието или липсата на цитоплазмени включения също е взета предвид (фиг. 10). Критериите, според които са категоризирани овоцитите са следните:

Грейд 1: Фрагментирано първо полярно телце и голямо перивителинно пространство

Грейд 2: Интактно първо полярно телце и голямо перивителинно пространство

Грейд 3: Фрагментирано първо полярно телце и нормално перивителинно пространство

Грейд 4: Нормално първо полярно телце и нормално перивителинно пространство

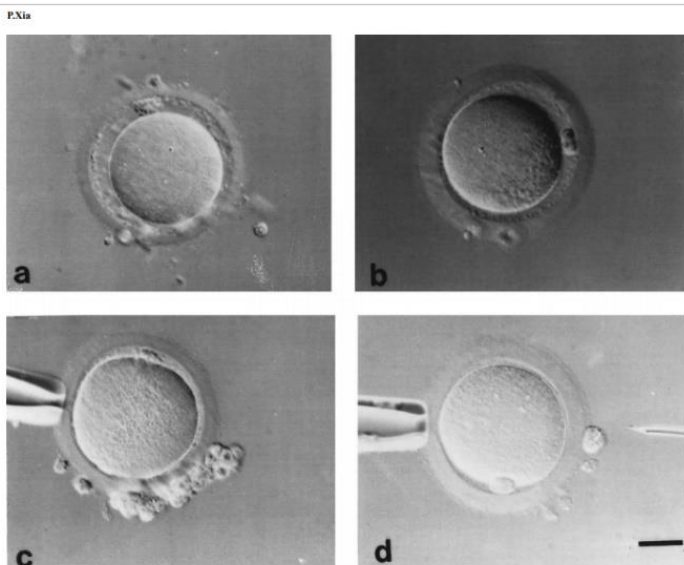


Figure 1. Human oocyte grading for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). (a) Grade 1, fragmented first polar body and large perivitelline space; (b) grade 2, intact first polar body and large perivitelline space; (c) grade 3, fragmented first polar body and normal perivitelline space; (d) grade 4, intact first polar body and normal perivitelline space. Scale bar = 25 μ m.

Фиг. 10. Овоцитен грейд по Xia

Резултатите показват, че яйцеклетките, оценени с грейд 3 и 4 (т.е. с най-добро качество) показват сигнификантно по-добро оплождане. Подобни са и данните при проследяване на дялящи се ембриони –най-висок процент топ качество ембриони е получен от яйцеклетки грейд 4. Когато овоцитите имат и цитоплазмени включения обаче, не се наблюдава

съществена разлика в оплождането между 4те групи. Статистическа разлика има при яйцеклетките с включения в цитоплазмата, които показват значително по-нисък фертилизационен потенциал в сравнение с тези без включения. Аналогични резултати се откриват при качеството на получените ембриони (табл.1).

Табл. 1 Корелация между овоцитната морфология и оплождането и развитието след ICSI

Oocyte morphology correlates with development after ICSI

Table II. Comparison of fertilization rate, embryonic development and embryonic grading in grade 1–4 oocytes without or with cytoplasmic inclusions

Oocyte grade	1st Pb	PVS	Oocyte without inclusions (n = 365)			Oocytes with inclusions (n = 96)		
			No. fertilized (%)	Embryo stages 3–8-cell (%)	Embryo grade 1–2 (%)	No. fertilized (%)	Embryo stages 3–8-cell (%)	Embryo grade 1–2 (%)
1	frag	large	45 (60.8) ^a	18 (24.3) ^a	21 (28.4) ^a	12 (60.0)	4 (20.0)	6 (30.0)
2	intact	large	70 (72.9) ^a	36 (37.5) ^a	36 (37.5) ^a	20 (71.4)	6 (21.4)	9 (32.1)
3	frag	normal	58 (84.1) ^b	38 (55.1) ^b	27 (39.1) ^a	13 (76.5)	7 (41.2)	7 (41.2)
4	intact	normal	107 (84.9) ^{b*}	76 (60.3) ^b	84 (66.7) ^{b***}	20 (64.5) [*]	13 (41.9)	14 (45.2) ^{**}
P value			< 0.01	< 0.01	< 0.01	NS	NS	NS

Frag = fragmented; 1st Pb = first polar body; PVS = perivitelline space; NS = not significant.

^{a, b}Within each column, different superscripts are significantly different.

***Two groups marked with an asterisk (*) were significantly different at $P < 0.01$ (χ^2 test) and those marked with ** were significantly different at $P < 0.05$ (χ^2).

Основният извод, който налага проведеното изследване показва, че категоризирането на яйцеклетките, базирано на три основни морфологични фактора – първо полярно телце, перивителинно пространство и включения в цитоплазмата пряко корелира с процента оплождане и качеството на ембрионите на клетъчен стадий. Яйцеклетки, оценени като грейд 4 без включения показват най-добър потенциал за оплождане и развитие.

Овоцитен скор, базиран на сумата от гранулираност на цитоплазмата, наличие на вакуоли и/или включения в цитоплазмата и еластичност на оволемата при ICSI

През 2007 г. M. Wilding предлага скорова система за оценка на яйцеклетки, базирана на 3 основни параметъра (Wilding et al., 2007). За всеки 1 от тези параметри яйцеклетките получават между 1 и 3 точки.

Фината грануляция на цитоплазмата, когато се наблюдава в хетерогенни участъци на овоцита се свързва с концентрация на митохондрии и висока АТФ активност, което е предпоставка за нормалното развитие на яйцеклетката и ембрионите. Централната грануляция от друга страна се счита за морфологичен дисморфизъм и е белег за понижен оплодителен потенциал. Липсата на каквито и да е участъци с гранулирана цитоплазма е индикация за понижена компетентност на яйцеклетката според този екип от автори.

Присъствието на вакуоли и цитоплазмени включения е аномално състояние на яйцеклетката и този дисморфизъм лесно може да бъде установен чрез стандартна техника за наблюдение в ин витро лабораторията.

Реакцията на плазмената мембрана към пенетрацията на инжекционната пипета също може да се приеме за полезна детерминанта на овоцитното качество (фиг. 11).

Скорвата система се образува чрез сумирането на точките от 3те параметъра:

Гранулирана цитоплазма:

3 точки – гранулация в хетерогенни участъци на яйцеклетката

2 точки – централна гранулация

1 точка – липса на гранулирани участъци

Вакуоли и/или включения:

3 точки – липса на вакуоли и включения

2 точки – присъствие на малки вакуоли или включения

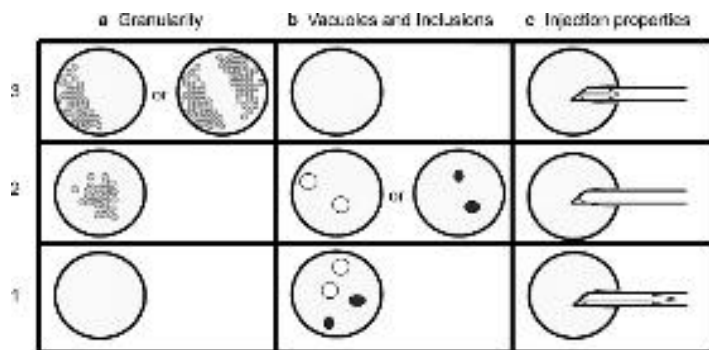
1 точка – едновременно наличие на вакуоли и включения

Еластичност на оолемата:

3 точки – нормално съпротивление на пипетата

2 точки – лесно пробиване на оолемата без никакво съпротивление

1 точка – трудно скъсване на оолемата след силно засмукване



Фиг. 11. Овоцитен скор по Wilding

Оценени по този начин, всяка яйцеклетка получава между 1 и 3 точки по всеки един параметър, като най-малкият сбор от точки е 3, а най-големият – 9. Яйцеклетките, получили максималният скор от 9 точки са тези с топ качество и те имат най-добър потенциал за оплождане и имплантация на получения ембрион (табл. 2).

Табл. 2. Резултати от бременност и имплантация при топ качество яйцеклетки

Table 3

Effect of top quality oocyte morphology on clinical results

	Embryo quality >600	All embryos
Top quality oocytes (score = 9)	63.4%** (28.3%*) n = 145	51.1% (19.6%) n = 485
All morphology-assessed oocytes	52.6%* (22.1%) n = 322	41.9% (20.0%) n = 822

Data shows pregnancy rates with implantation rates in parentheses. The z test was used to test for significant differences between proportions.

*p < 0.001

**p < 0.05

Като заключение авторите подчертават, че за да се направи прогностична оценка за очаквания резултат, е необходимо обединяването на овоцитен, пронуклеарен и ембрионален скор. Така ще се създаде една цялостна и завършена картина, даваща подробна информация за качеството и потенциала на яйцеклетките и ембрионите.

Метафаза II Овоцитен Морфологичен Скор (MOMS – Metaphase II Oocyte Morphology Score)

L. Rienzi и екип публикуват през 2008 г. ново изследване на влиянието на различните морфологични особености върху различни параметри от ин витро цикъла. В проучването си те включват всички екстра- и интрацитоплазмени отклонения, за които има данни, че повлияват крайния резултат от лечението.

Изследваните екстрацитоплазмени фактори са: фрагментирано първо полярно телце, анормално първо полярно телце, анормална зона пелуцида, голямо перивителинно пространство, анормална форма на яйцеклетката

Цитоплазмения дисморфизъм включва: гранулирана цитоплазма, централно гранулирана цитоплазма, вакуоли, кълстери от ендоплазмен ретикулум, рефрактилни телца и др.

Всички яйцеклетки, проявяващи конкретен дисморфизъм се проследяват и оценяват спрямо следните показатели: оплождане, нормална пронуклеарна морфология, ембриони с отлично и добро качество.

Крайният MOMS скор се изчислява като коефициент, при който всеки от морфологичните фактори има статистическо сигнификантно въздействие върху поне един от изследваните резултати. За екстрацитоплазмените фактори това са анормално първо полярно телце и голямо перивителинно пространство, а за цитоплазмените включения – гранулираната цитоплазма, централногранулираната цитоплазма и вакуолите (табл. 3).

Табл. 3. MOMS скор

Table 4

Metaphase II oocyte morphological scoring system (MOMS).

	Points
Extracytoplasmic features	
Abnormal I polar body	2.0
Large perivitelline space	1.4
Cytoplasmic features	
Granular cytoplasm	1.4
Centrally located granular area	2.7
Vacuoles	2.1

Където е възможно, авторите проследяват имплантацията и клинични бременности и откриват силна корелация между MOMS скората и потенциала за имплантация на яйцеклетките.

В дискусията екипът подчертава необходимостта от въвеждане на адекватна система за морфологична оценка в рутинната лабораторна практика.

Освен разгледаните системи за оценка, в по-съвременната литература има публикувани 2 модела за оценяване – литературен скор на базата на публикации, разглеждащи различните морфологични особености, които биха могли да повлияят компетентността на овоците и скорова система, базирана на оценени от изкуствен интелект снимки на яйцеклетки.

Литературен скор, базиран на систематичен преглед

През 2022 г. Bartolacci и сътрудници публикуват систематичен преглед (Bartolacci et al., 2022) на 6651 публикации, свързани с морфологичните дефекти в яйцеклетките и тяхната релевантност към оплодителния и имплантационен потенциал. За всеки един от тях те изчисляват oocyte literature score (OLS) в зависимост от броя статии, в които е открита положителна или отрицателна релевантност. Сред морфологичните отклонения, получили най-висок литературен скор и съответно най-силно негативно повлияване на резултатите са : вакуоли (7,14 OLS), агрегация на гладкия ендоплазмен ретикулум (7,78 OLS) и гранулирана цитоплазма (6,25 OLS).

Скорова система, базирана на оценка на снимки от изкуствен интелект

Публикувана е през 2021 г. в престижното списание Fertility and Sterility от Nayot и колектив (Nayot et al., 2021) и представлява оценка на овоците посредством изкуствен интелект (AI), създаден на базата на 16 373 снимки на яйцеклетки, при които е известен крайният резултат. В резултат от въведените данни софтуерът създава овоцитен скор от 0 до 10, като за яйцеклетките, които са се оплодили и достигнали до стадий бластоцист той е средно 6,74, а тези, които не са достигнали стадия на 5ти ден имат среден скор 5,70 с установена сигнификантна разлика между двете групи.

4. Фактори, оказващи влияние върху морфологичното качество и оплодителния потенциал на яйцеклетките

Едва 5% от аспирираните овоцити имат необходимата морфологична и генетична компетентност да доведат до живо раждане (Lemmen, Rodríguez, Andreasen, Loft, & Ziebe, 2016).

В литературата има описани редица фактори, външни за женската гамета, които имат отношение към нейния потенциал и генетичен статус по време и след мейотичното зреене (Chamaou, 2022). Влиянието на различните агенти би могло да се систематизира на 2 основни фактора – вътрешни, пациент-специфични и външни фактори.

Пациент-свързаните фактори са изключително разнообразни като произход и въздействие – индекс на телесната маса (ИТМ), възраст, начин на живот (лайфстайл), тип инфертилитет и т.н (Антонова и съавт., 2022). Сред външните фактори биха могли да се разграничат: КОХ, замърсеност на въздуха, химио- и лъчетерапия и др. и такива, свързани със самите лабораторни процедури по време на ин витро оплождане (денудиране, криоконсервация, ICSI), условия на култивиране (температура, CO₂), културални условия и т.н. Степента на увреждане на яйцеклетките вследствие експозицията им на определен фактор може да варира в широки граници и да доведе до дългосрочни или необратими промени в морфологичния и хромозомния им статус.

4.1 Пациент-специфични фактори

Физиологичните фактори са разнообразни по своя характер и значимост, но най-съществените от тях са: възрастта, различни заболявания, свързани с женския репродуктивен тракт, ИТМ, нивата на фоликуло-стимулиращия хормон (FSH), хранене, прием на суплементи, физическа активност, стрес, качество на съня.

Възраст

Още през осемдесетте години, веднага след първите успешни ин-витро опити резултатите сочат, че именно възрастта на лекуваните пациентки е с най-съществено значение не само за количеството (Moghadam, Moghadam, Hemadi, & Saki, 2022), но най-вече за качеството на добитите яйцеклетки и може да се използва като водещ предиктивен фактор за изхода от АРТ (R. G. Gosden, 1985). В следващите няколко десетилетия тези резултати многократно биват потвърждавани от различни екипи (Юнакова и съавт., 2018), работещи в сферата на асистираната репродукция (Crawford & Steiner, 2015).

Стареещият овоцит преминава през редица молекулярни и целуларни промени (X. Wang, Wang, & Xiang, 2023), които имат негативно влияние върху оплодителния потенциал и последващото развитие на ембриона - дигиния, партеногенеза, анеуплоидии, апоптоза, структурни промени и втвърдяване на зона пелуцида, епигенетични промени и др. (Miao, Kikuchi, Sun, & Schatten, 2009).

Основните предполагаеми механизми, нарушени от процеса на стареене и водещи до понижена компетентност на овоцита са няколко (Cimadomo et al., 2018):

Митохондриална дисфункция: Митохондриите имат изключително съществено значение, особено за деликатните първи фази от предимплантационното развитие (Милачич, 2009) (Милачич и сътр, 2020)), декомпозицията на герминалния везикул, микротубулната асоциация и последваща десоциация при формирането на мейотичното делене – процеси, при които балансираната консумация на енергия е от ключово значение за правилното им протичане.

Скъсяване на теломерите: Функцията на теломерите е есенциална за фазите на мейотичното и митотичното делене, най-вече за ранната профаза, когато се осъществява удвояването на хомоложните хромозоми. Теломерите в овоцитите започват да се скъсяват още по време на феталната овогенеза и този процес продължава в яйчника, най-вероятно вследствие на оксидативния стрес. Късното излизане на яйцеклетката от стадия и на мейотичен арест води и до понижена теломеразна активност.

Нестабилност на мейотичното вретено: Структурата на делителното вретено е есенциална за правилното разделяне на сестринските хроматиди. Различни аберации по време на неговото сформирание водят до по-висока честота на анеуплоидии при жени в напреднала репродуктивна възраст.

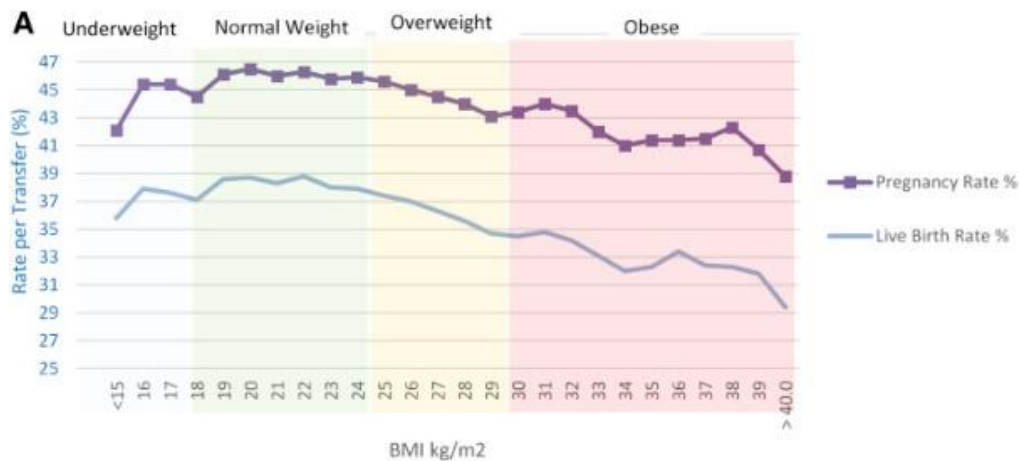
В наши дни възрастовият фактор продължава да бъде едно от най-големите предизвикателства пред специалистите по асистирана репродукция (Тимева, 2007). Въпреки търсенето на различни решения, съвременната медицина не предлага терапии за обръщане на процесите на стареене в яйцеклетките на този етап. Експериментални методики, по които се работи активно са: хромозомна терапия посредством генни редактори като CRISPR-Cas9, създаване на изкуствени гамети ин витро, нуклеарен трансфер (F. M. Ubaldi et al., 2019).

Индекс на телесна маса (ИТМ)

Наднорменото тегло и затлъстяването през последните години се налагат като едно от най-големите предизвикателства за общественото здравеопазване. По данни на СЗО, над 50% от населението в Европа е с наднормено тегло, а 23% от жените и 20% от мъжете са с различна степен на затлъстяване. Освен множеството негативни здравословни ефекти, като сърдечно-съдови нарушения, метаболитни промени (Lainez & Coss, 2019), дихателни проблеми, карциноми, психо-емоционални смущения, излишното тегло е свързано и с

редица репродуктивни затруднения (Creanga, Catalano, & Bateman, 2022). При жените повишеното количество мастна тъкан повлиява негативно фертилитета, независимо от статуса на яйчниковия резерв. Установен е по-нисък шанс за настъпване на спонтанна бременност, овулаторна дисфункция, по-висока консумация на гонадотропини при КОХ (Romualdo Sciorio, Bellaminutti, Tramontano, & Esteves, 2022), удължена стимулация, по-нисък процент на имплантация и по-висок риск от спонтанни аборти след АРТ (Pandey, Maheshwari, & Bhattacharya, 2010).

Едно от най-мощните проучвания за това как обездитетът влияе върху резултатите от лечение чрез асистирана репродукция е от 2016 г. върху приблизително половин милион цикли, като данните са взети от националния регистър на САЩ (Kawwass et al., 2016). Резултатите категорично потвърждават, че жените със затлъстяване имат сигнификантно по-нисък шанс както за постигане на клинична бременност, така и за живо раждане, тъй като рискът от спонтанен аборт при тях е статистически по-висок в сравнение с останалите групи (фиг. 12).



$p < 0.0001$ for both pregnancy and live birth trends



$p < 0.0001$ for miscarriage trend

Фиг. 12. Корелация между ИТМ и процент клинични бременности, живи раждания (А) и спонтанни аборти (В)

Въпреки че има открити в някои публикации връзка между повишения ИТМ и качеството на яйцеклетките (Gonzalez, Robker, & Rose, 2022), директното негативно влияние върху яйцеклетките е с неизяснен механизъм на този етап. В последните години има публикации, които установяват връзка между обезитет и възпалителни процеси (Snider & Wood, 2019) и повишен оксидативен стрес (L. Wang et al., 2021) в яйчника, което повлиява качеството на продуцираните яйцеклетки. Установено е също така понижено количество на добити яйцеклетки на единица консумирани гонадотропини и технически затруднения при извършване на фоликуларната пункция. Предполага се, че най-вероятно понижените резултати от лечение чрез асистирана репродукция се дължат повече на изменения в

генната регулация на ендометриума, отколкото на влошеното качество на овоцитите (Comstock et al., 2017).

Тютюнопушене

Тютюнопушенето е широко разпознаваем риск за здравето фактор, който повлиява женския фертилитет и способността за спонтанно забременяване. Редица публикации анализират ефекта от тютюнопушенето върху фертилността при жените, като някои не откриват връзка между пушенето и репродуктивните способности, други поддържат становището, че тютюнопушенето има значителен негативен ефект (Galanti et al., 2023), трети демонстрират резултати, при които пушенето на 1 до 10 цигари дневно няма влияние върху изхода от АРТ, за разлика от пристрастените пушачи (Soares, Simon, Remohí, & Pellicer, 2006). Въпреки че не е изяснен механизъм, по който тютюнопушенето повлиява фертилитета, се предполага, че химическите вещества в цигарите вероятно увеличават фоликуларната деструкция и загубата на репродуктивна функция. Акуратното определяне на точния ефект на пушенето е труден, поради факта, че трябва да се вземат предвид и други фактори, допринасящи за увреждането на яйчниковата функция, като консумация на алкохол, кафе, социо-икономически статус и т.н. (Wright, Trimarchi, Allsworth, & Keefe, 2006).

По отношение на яйцеклетките, някои екипи откриват статистическа разлика както в броя на добитите овоцити, така и в процента оплождане при жени, които са активни пушачи спрямо непушачите (Crha et al., 2001), други изследвания установяват влияние върху морфологичното качество, но не и върху броя на яйцеклетките и изхода от лечението (Ozbakir & Tulay, 2020).

Синдром на поликистозните яйчници (СПКЯ)

Като едно хетерогенно заболяване, СПКЯ се характеризира с вариации на фенотипните изяви на репродуктивни и метаболитни аномалии и води до различия в компетентността на яйцеклетките. При някои жени, подлагащи се на асистирана репродукция, резултатите показват нормално развитие на ембрионите и бременности, съпоставими с общата популация (Heijnen et al., 2005). Докато при други се наблюдава влошено качество на яйцеклетките. Това от своя страна неразривно е свързано с нарушено развитие на фоликулите. Овариалният хиперандрогенизъм, хиперинсулинемията и паракринната дисрегулация на растежните фактори променят интрафоликуларната среда, повлияват комуникацията яйцеклетка – гранулозни клетки (Yang et al., 2021) и нарушават цитоплазменото и мейотично съзряване на овоцитите. За развитието на СПКЯ имат роля както генетични, така и външни фактори (Goodarzi, Dumesic, Chazenbalk, & Azziz, 2011).

Поради понижения фертилитет, жените със СПКЯ представляват съществен процент от пациентите на клиниките по асистирана репродукция (Nikbakht, Mohammadjafari,

Rajabalipour, & Moghadam, 2021). През 2018г. ESHRE публикува препоръки за оптимална оценка и подход при лечението на тази група.

Преждевременно яйчниково отпадане (ПЯО)

За преждевременно яйчниково отпадане се приема, когато менопаузата настъпва преди 40 годишна възраст (Юнакова, 2016). Диагнозата се поставя въз основа на базалните стойности на FSH над 40 IU/l в поне две последователни изследвания през 2 – 3 седмици и много ниски или неуловими нива на анти-мюлеровия хормон. Жените с ПЯО страдат от ановулация, хиперестрогемия и се проявява с първична или вторична аменорея, инфертилитет (Ковачев и сътр., 2003), дефицит на полови хормони и завишени гонадотропини. Разстройството засяга приблизително 1% от жените в репродуктивна възраст (De Vos, Devroey, & Fauser, 2010) като за това се посочват и епигенетични причини (J. Wang et al., 2023). ПЯО настъпва посредством 2 основни механизма – яйчничкова дисфункция и яйчниково отпадане (Hong et al., 2022). Дисфункцията показва, че фоликулите остават в яйчника, но патологични процеси пречат на тяхната нормална функция (като мутации в FSH рецептора например), което рефлектира върху качеството и количеството на яйцеклетките (Юнакова и сътр., 2017). Яйчниковото отпадане показва, че в яйчника липсват примордиални фоликули. Това състояние може да е резултат от цялостното отпадане на пула примордиални фоликули, ускорено изчерпване на фоликулите или разрушаване на яйчника вследствие на автоимунно заболяване или излагане на токсини (De Vos et al., 2010).

Влияние на ендометриозата

Категорично влиянието на ендометриозата върху качеството на яйцеклетките не е доказано. Публикациите, разглеждащи наличието на тази връзка са противоречиви и от клинична, и от биологична гледна точка (B. Xu et al., 2015). Изследвани са различни механизми, по които наличието на ендометриоза може да влияе върху качеството на яйцеклетките: нарушения в стероидогенезата (Dumesic, Meldrum, Katz-Jaffe, Krisher, & Schoolcraft, 2015), промяна в състава на фоликуларната течност, оксидативен стрес на фоликулите, неблагоприятна възпалителна среда (Sanchez et al., 2016). От биологична гледна точка са изследвани редица характеристики на яйцеклетките, добити от жени с ендометриоза, като са намерени редица отклонения в сравнение с яйцеклетките на жени без ендометриоза. Яйцеклетките на жени с ендометриоза показват повишена загуба на кортикални гранули, нарушение на зона пелуцида, тъмен цвят на цитоплазмата и централна гранулация. При опит за ин витро матурация незрелите яйцеклетки от жени с ендометриоза показват намалена способност за матуриране до МII. Наблюдава се по-често наличието на тъмна централна гранулация в клетките от ендометриозни цикли, както и различни екстрацитоплазмени дефекти. Някои публикации отбелязват по-висока честота на аномално делително вретено при яйцеклетки, добити от жени с ендометриоза, в сравнение с такива, добити от стимулационни цикли с мъжки фактор. Досегашните

публикувани статии сочат, че броят на добиваните зрели яйцеклетки от жени с ендометриоза е сигнификантно понижен в сравнение с такива с друг фактор на инфертилитет (Sanchez et al., 2017). При някои изследвания се отчита негативно влияние върху резултатите (Магунска, 2016) в зависимост от степента на ендометриоза (Sedighe et al., 2022).

Възпалителни заболявания

При жени с тазово възпалителна болест (ТВБ) се експресират редица проинфламаторни цитокини и са установени завишени нива на реактивни кислородни радикали (reactive oxygen species, ROS), свързани с оксидативен стрес (Demir, Guven, Guvendag Guven, Atamer, & Gul, 2009). В яйцеклетките завишените нива на ROS причиняват мутации, инактивация или загуба на митохондриална ДНК и синтез и натрупване на оксидирани протеини. Тазовата възпалителна болест влияе негативно върху композицията на мембранните липиди, намаление на цитоплазмените антиоксиданти и повишено количество на Ca²⁺ йони в цитозола. Тези промени нарушават функцията на яйцеклетката (A. P. Goud, Goud, Diamond, Gonik, & Abu-Soud, 2008). В лабораторни условия е установено влиянието на проинфламаторния цитокин IL-6 върху делителното вретено на яйцеклетка във фаза М II (Banerjee et al., 2012).

Серумни нива на фоликуло-стимулиращия хормон (FSH)

Високите стойности на серумните нива на FSH измерени в ранна фоликуларна фаза независимо от възрастта на жената (3-5 ден от менструалния цикъл) влияят негативно върху качеството на яйцеклетките – наблюдават се по-често тъмна гранулирана цитоплазма и вакуоли (H. Xu, Deng, Luo, Chen, et al., 2016). Вероятно високата стойност на FSH е индикативна за „остаряването“ на яйчника, което е свързано с влошаване качеството на яйцеклетките (Buratini et al., 2021) (Santos, Cordts, Bianco, Barbosa, & Christofolini, 2015).

Овариален хиперстимуляционен синдром (ОХСС)

Прекомерната овариална хиперстимулация, крайната степен на която преминава в хиперстимуляционен синдром влошава качеството на добитите яйцеклетки (Duraker et al., 2021), които обикновено са в голямо количество (над 15). Установено е, че при сравнение на рандомизирани групи по възраст и яйчников резерв пациентки, при които е проведена овариална хиперстимулация с различни дози FSH, които водят съответно до добиване на до 5, 6-10 и над 10 яйцеклетки, честотата на хромозомните аномалии при тестване на полярното телце на яйцеклетки подложени на ICSI се повишава до над 50 % (Haaf et al., 2009).

4.2 Външни фактори

Контролирана овариална хиперстимулация

Методите за овариална стимулация се развиват активно още от първите клинични опити *in vitro* в търсене на най-оптималния протокол. Въпреки множеството публикации, има публикувани само няколко големи мултицентрични проучвания и дори те не са взели предвид цели групи пациенти, които са „извън стандарта“. Като резултат, генералният подход е универсален, без да се взема предвид индивидуалните особености на пациента, като ИТМ, възраст, ендокринни заболявания и т.н. ("The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators†‡," 2017).

Виенският консенсус на ESHRE от 2017 г. дефинира много ясно какво означава добра и какво лоша стимулация и какви могат да са последствията. Една стимулация се счита за „добра“, ако от нея се е получила хомогенна кохорта от зрели яйцеклетки без това да причини дискомфорт или да постави пациента в риск и като резултат завърши с едноплодна бременност и раждане на здраво дете. От ембриологична гледна точка, добрата стимулация би трябвало да води до получаване на добре експандирани кумулузно-ооцитни комплекси от всеки фоликул над 14 мм с висок процент на зрели МП яйцеклетки.

От друга страна, неефективна стимулация в резултат от субоптимални решения относно дозите или времето, може да доведе до получаване на голяма пропорция яйцеклетки с анормална морфология, което от своя страна да доведе до повишено анормално и/или понижено нормално оплождане на овоцитите и по-висок процент анеуплоидии в тях.

Субоптимални стимулации, проведени с изключително високи дози, несъобразени с яйчниковия потенциал и капацитет на пациентите имат негативен ефект не само върху здравето на пациента (Palomba, Costanzi, Nelson, Caserta, & Humaidan, 2023), но и върху яйчниците и ендометриума. Редица проучвания намират връзка между субоптималната стимулация и високият процент анеуплоидни ембриони (Thakre & Homburg, 2019).

Като основно заключение на експертната среща на водещите специалисти от ESHRE, публикувано като Виенски консенсус относно стимулациите и ефектът им върху ембриологичните параметри се подчертава, че най-успешни са тези клиници, в които клиницисти и ембриолози успешно комуникират помежду си и има добра обратна връзка относно резултатите, свързани със стимулационните протоколи (Geng, Xun, Hu, Lai, & Jin, 2019).

Замърсеност на въздуха

Замърсеният въздух като световно значим проблем е обект на дискусии от дълги години, но конкретно неговото влияние върху човешката репродукция е сравнително нов аспект, който набира все по-голяма актуалност поради глобализацията и пренаселването на

градовете. В последните 2-3 години расте броят на публикациите, най-вече на специалисти от Китай, където темата е особено наболяла. Всички изследвани по недвусмислен начин показват негативното влияние на различните компоненти, влизащи в състава на градския смог – както газове (NO₂, CO, O₃), така и фините прахови частици (PM 2.5 PM 2.5-10 PM10) (Carré, Gatimel, Moreau, Parinaud, & Leandri, 2017; Choe, Jun, Lee, Yoon, & Kim, 2018).

През 2018г беше публикувана ревью статия (Conforti et al., 2018), насочена конкретно към връзката замърсен въздух и женски фертилитет, която посочва, че този фактор трябва да е причина за притеснение за женското здраве и репродуктивни способности и би следвало да се подходи към него с повишено внимание.

Изследваните групи са както спонтанно забременели жени, така и пациенти, лекуващи се чрез АРТ. При втората група резултатите показват директно влияние върху яйчниковия отговор, което води до по-малко яйцеклетки или такива с по-лошо качество, в следствие на което при 4 от изследваните параметъра има понижен процент бременности/живи раждания или повишен процент спонтанни аборти. В групата на общата популация се наблюдава понижен фертилитет и висока честота на спонтанни аборти и мъртви раждания (табл. 4).

Табл. 4. Връзка между различни замърсители на въздуха и репродуктивните способности в общата популация и пациенти, подлагащи се на асистирана репродукция

From: [Air pollution and female fertility: a systematic review of literature](#)

Type of Pollutant	Population	Effect
NO ₂	IVF	Lower live birth rates
	General population	Higher miscarriage rate
CO	General population	Higher stillbirth in second and third trimester
O ₃	IVF	Lower live birth rates
PM _{2.5}	IVF	Lower pregnancy rates
	General population	Reduced fecundability ratio
PM ₁₀	IVF	Higher miscarriage rate
	General population	Higher miscarriage rate
PM _{2.5-10}	General population	Reduced fertility rate
SO ₂	IVF	No effect
	General population	Higher early miscarriage and third trimester still births.
Traffic pollutants	General population	Higher miscarriage rate; Higher infertility rates.
Coal combustion products	General population	Higher trend of miscarriage

Химио и лъчетерапия

Химио и лъчетерапията драматично променят женския фертилитет. Дори след само 1 курс се наблюдава значително отпадане на примордиални фоликули, както и директна смърт на яйцеклетките чрез соматично разрушаване (Morgan, Anderson, Gourley, Wallace, & Spears, 2012). Докладвани са случаи за опити за стимулация между курсовете химиотерапия, които завършват с липса на яйчников отговор, липса на аспирирани яйцеклетки или липса на ембриони с добро качество (Dolmans, Demylle, Martinez-Madrid, & Donnez, 2005).

По последни данни, около 5% от жените, диагностицирани с различни видове карциноми са в репродуктивна възраст. На този етап като най-добра стратегия за запазване на фертилитета (Fabiani, Guarino, et al., 2022) при тези жени е замразяването на яйцеклетки и/или ембриони преди стартиране на лечение (Bedoschi, Navarro, & Oktay, 2016).

Лабораторни процедури и манипулации

След фоликуларната пункция кумулусно-ооцитните комплекси попадат под прякото въздействие на околните фактори и всички последващи манипулации и процедури се извършват директно върху тях. Като резултат е възможно да настъпят различни промени, най-нежеланата от които е разрушаването на целостта на яйцеклетката и последваща дегенерация. Това може да настъпи вследствие на различни причини – качество на самата гамета (ригидност/дефекти на зона пелуцида, липса на еластичност на мембраната, дегенеративни участъци в цитоплазмата), външна среда, апаратура или опитност на оператора.

Най-често разрушаване на яйцеклетката се получава при ICSI процедура. В Истанбулския консенсус дегенерацията след ICSI е отбелязана като един от важните фактори. Разрушаването може да настъпи по време на 3 основни стъпки от процедурата по ICSI – при денудацията на кумулусните клетки, по време на самото инжектиране или при проверка на оплождане на ден 1. Най-често се случва по време на инжектирането, но в някои случаи, когато липсват видими белези за дегенерация, тя се установява на следващия ден при отчитане на оплождането. Поради тази причина разрушените яйцеклетки по време и след манипулацията трябва да се документират заедно, а тези от денудирането – отделно.

Друг ключов момент, свързан с висок риск от унищожение на яйцеклетки е тяхното замразяване. Криотолерантността на овоцитите зависи най-вече от потенциала и качеството им, метода на криоконсервация, средите за замразяване и размразяване, в по-малка степен от опитността на оператора и в никаква от времето за съхранение. В последните години методиката за замразяване на яйцеклетки се развива бурно и от експериментална с висок процент дегенерация след размразяване, вече е рутинна за ембриологичните лаборатории с над 98% преживяемост (Rienzi et al., 2016).

Лабораторни условия

Има данни, че лабораторните условия имат ключово значение за успеха на ин витро процедурата (X. Xu & Yang, 2021) (Wood & Cutting, 2022). Параметрите, които са обект на контрол и мониториране са светлина, влажност и качество на въздуха (Khoudja, Xu, Li, & Zhou, 2013) (Heitmann et al., 2015). Сред най-значимите фактори са летливите органични частици – volatile organic compounds (VOCs) и микроорганизмите.

В препоръките за добра лабораторна практика на ESHRE има указания за поддържането на подходящи лабораторни условия. Оборудването с HEPA филтър за VOCs контрол и поддържането на позитивно налягане, за да се избегне микробиологичната контаминация са сред задължителните елементи. По отношение на светлината се препоръчва минимална експозиция в защитена среда по време на фоликуларната пункция, денудирането, инжектирането и прехвърлянето на яйцеклетките. Температурата е препоръчително да е между 20-24 C, влажността на въздуха 40-45%. Според изискванията на Европейската директива за тъкани и клетки, помещенията за работа с гамети трябва да са клас А или най-малко D.

През 2018 г. в Кайро се провежда среща на специалисти в областта и е публикуван консенсус относно оптималните условия за чистота на въздуха и инкубаторите в ембриологичната лаборатория (Mortimer et al., 2018).

Условия в инкубатора

Поддържането на постоянни оптимални условия в инкубаторите е от критично значение за яйцеклетките (R. Sciorio, Thong, & Pickering, 2018) (Kalleas, McEvoy, Horne, Roberts, & Brison, 2022), особено в периода след манипулациите по оплождане, когато започват да протичат фини процеси на взаимодействие между мъжкия и женския геном, които са силно чувствителни към условията на околната среда (Kermack et al., 2022). Отклонение на някой от параметрите извън нормалните граници за дълго време може да окаже пагубно въздействие върху оплождането. Затова от ключова важност е мониторирането на правилната работа на инкубатора.

Higdon H Lee и сътр. в своя публикация дават препоръки за правилно поддържане и експлоатация на инкубаторите в ин витро лабораторията (Higdon, Blackhurst, & Boone, 2008). Най-важните параметри, които трябва да се следят са:

Температура. Стандартно инкубаторите в ин витро лабораториите работят на 37°C, като препоръчителния толеранс е $\pm 1^\circ\text{C}$.

Газ. Инкубаторите могат да бъдат конструирани с двойна (N₂ и CO₂) или тройна (N₂, O₂ и CO₂) газова смес, но основната функция, която изпълняват, е да поддържат осмоларитет от около 0.276 osmols.

РН. Трябва да се поддържа в границите 7.2 – 7.6 за оптимални условия.

Влажност. Трябва да е над 90%.

Вода. Резервоарите за вода се допълват периодично до определено ниво.

CODA филтри. Необходими за пречистването на въздуха в инкубатора от VOC частици, микроорганизми, плесени.

Културални условия

Хранителната среда е друг, не по-малко важен фактор за правилното протичане на процесите по оплождане на яйцеклетката. Изборът на среда за култивиране трябва да е прецизен, за да се получат очакваните от лабораторията резултати. В учебника от 2019 г. *In Vitro Fertilization* авторът на една от главите Arne Sunde пише, че различните културални среди и условия на култивиране могат да доведат до разнообразни промени в епигенома на ембрионите и вследствие във фенотипа на поколението (Sunde, 2019). Съвременните производители предлагат разнообразие от готови среди с високо качество, дълъг срок на съхранение и възможност за продължително култивиране без да се налага смяната им.

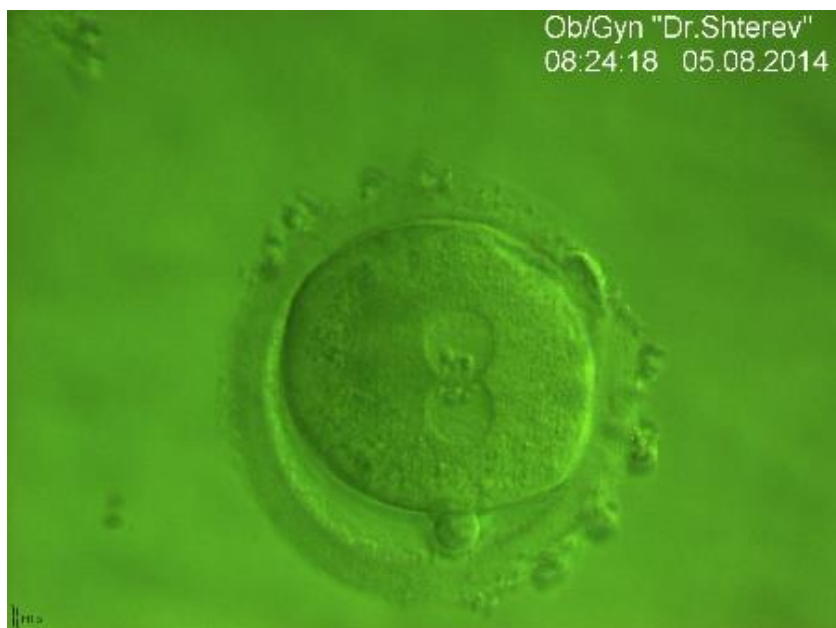
В препоръките на ESHRE има изписани правила за правилно съхранение и работа с културалните среди.

5. Критерии за оценка на оплождане

5.1 Оценка на оплождане

Проверката на оплождането и резултатите от него са една от най-критичните стъпки в целия ин витро цикъл и има пряко отношение към шансовете за настъпване на клинична бременност. Яйцеклетката се активира след навлизането на сперматозоида, независимо дали по нормален начин, или чрез инжектиране посредством пипета. Активацията е сложен комплекс от последователни събития, в резултат на които настъпва освобождаване на котрикалните гранули, активация на мембранно-свързания АТФ, подновяване на мейозата и финално формиране на мъжкия и женския пронуклеус с последваща екструзия на второто полярно телце (L. Scott, 2008).

Дефиницията за нормално оплождане е заложена в Алфа срещата от Истанбул и гласи: “Оптималната оплодена яйцеклетка трябва да има сферична форма, две полярни телца и два централно локализиращи, намиращи се непосредствено един до друг пронуклеуса, които са еднакви по размери с отчетливо видими мембрани. Пронуклеусите трябва да имат еквивалентен като брой и размери нуклеоли, които са идеално екваториално разположени в района на граничещите си мембрани” (Medicine & Embryology, 2011) (фиг. 13).



Фиг. 13. Нормално оплодена яйцеклетка (зигота)

Както Истанбулският, така и Виенският консенсус подчертават важноста от времето, в което се извършва проверката на оплождане за коректното отразяване на резултатите, също и въвеждат различни дефиниции, свързани с правилното и неправилното оплождане, както и липсата на такова.

Като оптимално време за отчитане на фертилизацията се приема 17 ± 1 h. Сингамията би трябвало да настъпи при около 50% от зиготите на 23 ± 1 h, като по това време до 20% от оплодените яйцеклетки е възможно да са разделени на 2 клетки. Ранно разделяне се проверява на 26 ± 1 h за ICSI и 28 ± 1 h за IVF (табл. 5).

Табл. 5. Времева линия за отчитане на оплождане, сингамия и ранно разделяне (Истанбулски консенсус)

Table IV

Timing of observation of fertilized oocytes and embryos, and expected stage of development at each time point.

Type of observation	Timing (hours post-insemination)	Expected stage of development
Fertilization check	17 ± 1	Pronuclear stage
Syngamy check	23 ± 1	Expect 50% to be in syngamy (up to 20% may be at the 2-cell stage)
Early cleavage check	26 ± 1 h post-ICSI	2-cell stage
	28 ± 1 h post-IVF	

Като силно нетипични и с лоши прогностични стойности се считат следните фактори при оплождане: раздалечени пронуклеуси, пронуклеуси с коренно различни размери, присъствие на допълнителен микронуклеус. Яйцеклетки с дискове агрегиран гладък ендоплазмен ретикулум трябва да се документират, проследяват и да не се трансферират по възможност. Това важи най-вече за оплождането от IVF, където морфологична оценка на Ден 0 не е възможна.

Въпреки че някои автори считат присъствието на периферна цитоплазмена транслуценция, позната като „хало“ за добър прогностичен белег, на този етап няма събрани достатъчно убедителни данни (Ebner et al., 2003).

Оплождане след IVF

При класическа IVF процедура е необходимо да се извърши денудация за фина отстраняване на останалите кумулусни клетки посредством механично пипетиране (Samus et al., 1999). Появата на пронуклеусите обикновено настъпва 1.5-2 часа по-късно, отколкото при ICSI процедурата и това трябва да се вземе предвид при отчитане на оплождането. Нормалното оплождане от IVF е един от ключовите индикатори за ефективност от Виенския консенсус и е дефиниция на броя на оплодените на ден I яйцеклетки спрямо общия брой инсеминирани кумулусно-ооцитни комплекса. Нормата за оплождане е 60%, а оптималния възможен резултат е 75%. Процентите са по-ниски в сравнение с тези от ICSI, поради невъзможността на Ден 0 да се идентифицира броя на зрелите МП овоцити (табл. 6).

Табл. 6. Ключов индикатор за ефективност оплождане от IVF (Виенски консенсус 2017г)

Table IV

KPIs for the ART laboratory.

KPI	Calculation	Competency value (%)	Benchmark value (%)
IVF normal fertilization rate	$\frac{\text{no. oocytes with 2PN and 2PB}}{\text{no. COCs inseminated}} \times 100$	≥60	≥75
Failed fertilization rate (IVF)	$\frac{\text{no. cycles with no evidence of fertilization}}{\text{no. of stimulated IVF cycles}} \times 100$	<5	

Оплождане след ICSI

Дефиницията за нормално оплождане след ICSI е: Пропорцията зиготи с 2 пронуклеуса спрямо общия брой инжектирани яйцеклетки на Ден 0. В научната литература средните стойности на фертилизацията варират в граници между 60 и 80%, но най-често срещаните стойности са 67-70%. Базирайки се на тези данни, както и на препоръките на Ембриологичната асоциация ("Association of Clinical Embryologists – Guidelines on Good Practice in Clinical Embryology Laboratories 2012," 2012), бяха установени граници от 65% норма и 80% оптимум. (фиг. 20). Важно е да се подчертае обаче, че тези резултати са приложими при еякулирани сперматозоиди и свежи яйцеклетки. Когато сперматозоидите са добити по хирургичен път, или яйцеклетките са размразени е очаквано да се получат по-ниски резултати при оплождането (Heindryckx, Van der Elst, De Sutter, & Dhont, 2005; Kashir et al., 2010).

Дегенерация след ICSI

На тази база Виенският консенсус дефинира един от ключовите си индикатори за ефективност - ICSI damage rate. Той е резултат от съотношението на броя разрушени при инжектиране и/или оплождане спрямо общия брой яйцеклетки, подложени на ICSI и би трябвало да варира в границите 5-10% (табл. 7).

Табл. 7. Оплождане и дегенерация след ICSI (Виенски консенсус 2017г.)

Table IV

KPIs for the ART laboratory.

KPI	Calculation	Competency value (%)	Benchmark value (%)
ICSI damage rate	$\frac{\text{no. damaged or degenerated}}{\text{all oocytes injected}} \times 100$	≤10	≤5
ICSI normal fertilization rate	$\frac{\text{no. oocytes with 2PN and 2PB}}{\text{no. MII oocytes injected}} \times 100$	≥65	≥80

5.2 Критерии за оценка на пронуклеарни зиготи

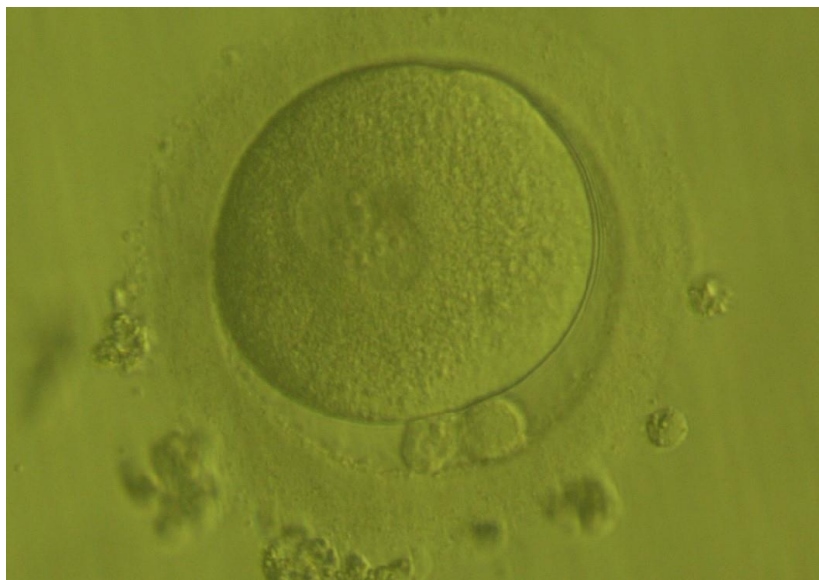
Оценката на пронуклеарните зиготи включва внимателен анализ на яйцеклетката, пронуклеусите и нуклеолите при проверката на оплождане на 17 ± 1 h след инсеминиране/инжектиране.

Пронуклеуси

Пронуклеусите са първите ясно видими белези на оплождане. Мъжкят и женският нуклеус би трябвало да се появят заедно в една и съща времева рамка. Ако не настъпи до 16-18 часа след оплождането, това може да е сигнал за нарушения в микротубулите, което от своя страна води до аномално развитие. Основните морфологични характеристики, които имат отношение към потенциала на оплодената яйцеклетка са размера и пространствената ориентация на нуклеусите.

Размери. Като норма се приема, че трябва да са сходни по размер, въпреки че женският нуклеус, който се намира в по-голяма близост до второто полярно телце е възможно да е малко по-малък. Размерите зависят от часа на проверка на оплождането, но ако се наблюдават малки по размери пронуклеуси в нормалното време за проверка, това може да е сигнал за по-късно настъпило оплождане поради недостатъчна зрялост на овоцита, или за дефект при гаметите. Случаите, при които има значителна разлика в размерите на двата нуклеуса, или фрагментирани нуклеуси (1 голям и 2 по-малки) се асоциират с висок процент хромозомни аномалии и нисък потенциал за развитие (L. Scott, 2003; L. Scott, Alvero, Leondires, & Miller, 2000; L. Scott, Finn, O'Leary, McLellan, & Hill, 2007).

Позициониране. От наблюдението на оплождането с помощта на “time-lapse” техника става ясно, че нуклеарната формация и ротация е динамичен процес и позиционирането на нуклеусите спрямо оста на полярните телца е стриктно времево-зависимо (Q. Zhang, Guo, & Li, 2016). В позиционирането на двата пронуклеуса един спрямо друг е възможно да има отклонения, като голям ъгъл или голямо разстояние между тях, което се свързва с понижен потенциал на ембриона, фрагментация, нееднакви бластомери, арест в деленето (Montag, Liebenthron, & Köster, 2011) (фиг. 14).



Фиг. 14. Оценка на пронуклеарни зиготи

Нуклеоли

Заедно с оформянето на нуклеусите, се обособяват и поляризирани участъци в хроматина, които лесно могат да бъдат наблюдавани чрез инвертен микроскоп с контрастна оптика. Това е високо динамичен процес, който е свързан с разполагането на хроматина по митотичното вретено. По време на прогресията на клетъчния цикъл, нуклеолите променят броя, размера и разположението си и накрая малко преди сингамията се дисоциират (Montag et al., 2011). Различията в морфологичните прояви на нуклеолите са свързани с възрастта на пациента и от метода на оплождане (IVF или ICSI) и през 90те години са използвани широко в системите за оценка на пронуклеусите (L. A. Scott & Smith, 1998).

Цитоплазма

Цитоплазмата на оплодената яйцеклетка се очаква да е гладка, хомогенна и ясно отдиференцирана от структурите на пронуклеусите. Някои проучвания откриват връзка между тежкия цитоплазмен дисморфизъм на зиготите (вакуоли, централна гранулация, Анормална форма, фрагментация) (фиг. 15) и имплантационният им потенциал (Balaban & Urman, 2006; Ebner et al., 2003).



Фиг. 15. Зиготи с цитоплазмен дисморфизъм – вакуоли, неправилна форма

5.3 Липса на оплождане

Липсата на оплождане се среща с честота между 1 и 5 % от всички цикли (Milachich, Shterev, Cheong, Tulandi, & Li, 2018) (Yeste, Jones, Amdani, Patel, & Coward, 2016). При отсъствие на яйцеклетки с 2 пронуклеуса на 1ви ден и потвърждаване на данните след

последваща 24 часова инкубация, целия цикъл приключва поради липса на ембриони за трансфер (Kahtaoglu et al., 2014). При отчитането на подобни резултати биха могли да се разграничат няколко типа:

Липса на нормално оплождане – когато в кохортата яйцеклетки се откриват такива с 1PN и/или 3 и повече PN, но не и с 2PN. В такива ситуации единствено трансфера на ембриони, генерирани от 1PN яйцеклетки е приемлив, но трябва да се има предвид високата честота на анеуплоидии сред този тип зиготи.

Липса на оплождане поради липса на зрели яйцеклетки – това се отнася най-вече за циклите IVF, където определянето на зрелостта на яйцеклетките на Ден 0 е невъзможно.

Виртуална липса на оплождане – когато яйцеклетките не демонстрират признаци на активация и оплождане в установения 16-18 часов прозорец, а на много по-късен етап или на следващия ден. Такива яйцеклетки със забавено оплождане обикновено са свързани с висока честота на анеуплоидии и водят до ембрионален арест.

Тотална липса на оплождане – в случаите при които всички зрели МП яйцеклетки на показват признаци на оплождане нито на 16-18-ти час, нито на по-късен етап при проверка.

В главата „When Fertilization Fails“ на учебника „Practical Problems in Assisted Conception“ авторите Т. Милачич и А. Щерев разглеждат възможните причини за настъпване на събитие от подобен характер. Като най-значими са отбелязани пациент-свързаните причини (липса или малък брой зрели яйцеклетки, тежък мъжки фактор, проблем в овоцитната активация) и условията на култивиране (чистота на въздуха, постоянни оптимални условия в инкубатора, хранителни среди) (Milachich & Shterev, 2018). Авторите препоръчват стриктното спазване на препоръките на Европейската и Американската асоциация за добра лабораторна практика.

6. Методики за неинвазивна селекция и подобряване на фертилизационния потенциал

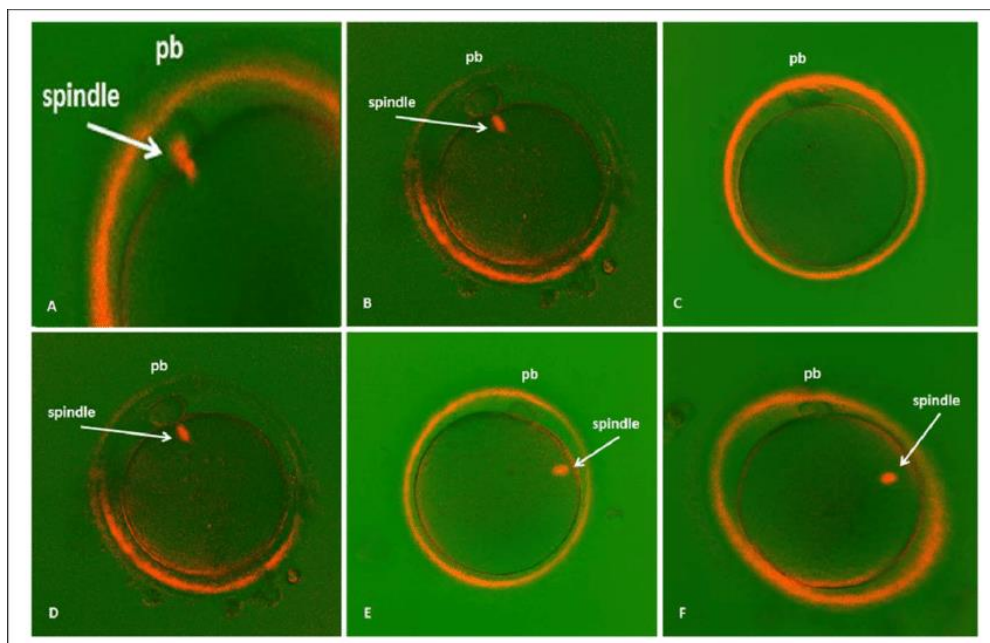
Поляризационна микроскопия

Наблюдението на яйцеклетките с поляризационен микроскоп е метод за неинвазивна оценка на матурационния им статус. В комбинация със специализиран софтуер става възможна визуализацията на делителното вретено, характерно за стадий МП. Чрез този метод на анализ е възможно да се получи по-акуратна информация за зрелостта на яйцеклетките. Възможно е, въпреки наличието на полярно телце, яйцеклетката да е незряла и да се намира в ранна Телофаза I. На този стадий на практика има разминаване между цитоплазмена и генетична зрялост и делителното вретено се намира между разделящите се яйцеклетка и първо полярно телце. Този процес продължава между 75 и 90

минути. Пълното разделяне на генетичния материал се наблюдава в късна Телофаза I. Под влияние на различни фактори е възможно изместването на делителното вретено на позиция различна от тази, в която обичайно е разположена - под полярното телце. В тези случаи визуализирането с поляризационна микроскопия позволява да се прецизира процеса на инжектиране на яйцеклетките и избягване на разрушаването на делителното вретено с инжекционната пипета (Kilani & Chapman, 2011; Oldenbourg, 1998).

Според редица изследвания, яйцеклетките с ясно видимо делително вретено, разположено под полярното телце показват сигнификантно по-висок процент оплождане, по-добро качество на ембрионите на ден 3, по-висок процент бластоцисти на ден 5. За сега няма убедителни данни за подобряване на процента постигнати клинични бременности (Petersen et al., 2009).

Благодарение на поляризационната микроскопия също така е отдиференцирана трислойната архитектура на зона пелуцида, като всеки един слой има различна способност да пречупва и отразява поляризираната светлина - т.нар. birefringence. Установено е, че най-вътрешния слой отразява най-ярко светлината, средния слой няма способност за отразяване, а най-външния има слаб birefringence (фиг. 16). Формирането на тази трислойна структура става по време на фоликулогенезата и наличието или липсата на birefringence при анализ на яйцеклетката с поляризационен микроскоп има също отношение към матурационния и статус (Pelletier, Keefe, & Trimarchi, 2004). Някои изследвания показват положителна корелация между birefringence на вътрешния слой на зона пелуцида над 3 nm и процентът на постигнати бластоцисти (Rama Raju, Prakash, Krishna, & Madan, 2007).



Фиг. 16. Резултати от анализ чрез поляризационна микроскопия: липса на визуализация на делително вретено, изместване на делителното вретено, правилна позиция спрямо полярното телце (Dib et al., 2012).

Асистирана овоцитна активация

Отчитането на оплождане на 18ти час след извършване на класическа ИВФ процедура или ИКСИ е една от ключовите стъпки в целия цикъл на лечение чрез асистирана репродукция. От броя на зиготите с 2 пронуклеуса зависи до голяма степен крайния изход от проведеното лечение. Ето защо ниският процент или тоталната липса на фертилизация са силно нежелан резултат както за пациентите, така и за екипа, извършващ манипулацията на гаметите.

Асистираната овоцитна активация с Calcium ionophore (Ca^{2+} ionophore, Calcymycin, A23187) е един от механизмите за постигане на по-добри резултати в случаите с история на ниско или липсващо оплождане. Точният механизъм на активиране на яйцеклетките все още не е напълно изяснен. Установено е, че количеството на свободните интрацелуларни калциеви йони варира постоянно и достига своя пик непосредствено преди клетъчното делене (R. G. Gosden, 1985). Тази методика започва да набира все по-голяма популярност през последните години, най-вече поради увеличаващата се средна възраст на лекуваните жени и поради занижаващите се параметри на семенната течност при мъжете.

Резултатите от мета-анализ, проведен през 2017 г. върху 14 публикации показват значително подобрене в ефективността след прилагане на Ca^{2+} ionophore, особено в случаи с предхождащи опити с нисък процент или липса на фертилизация (Murugesu et al., 2017).

Компрометираното оплождане може да се дължи както на фактори, свързани както с влошени параметри на семенната течност, така и с дефицит на активация, свързана с яйцеклетките. При проблеми с оплождането, свързани с яйцеклетките, калциевата активация също може да подпомогне за подобряване на резултатите в редица случаи (Vanden Meerschaut et al., 2012).

Едно мултицентрово проучване от 2015 г. на Т. Ebner и сътр. разкри нови перспективи за приложението на Ca^{2+} ionophore като клетъчен активатор. Установено е положителното му въздействие при пациенти със забавено или спряло развитие на ембрионите при предходни опити (Ebner et al., 2015).

Тези и други подобни проучвания утвърждават методиката като надеждна и дават добри перспективи за многостранното и приложение в лабораторната практика с цел постигане на по-добри резултати в асистираната репродукция.

Time-lapse системи за оценка на пронуклеарни зиготи

От първите данни, съобщени за използването на тайм-лапс техника за проследяване на морфокинетиката на ембрионите са изминали около 10 години (Lemmen, Agerholm, & Ziebe, 2008) и в наши дни тази апаратура е част от всяка добра ембриологична лаборатория. Този начин на мониториране разкри множество нови възможности пред ембриологичните екипи. Стана възможно да се проследява и документира точното време на преминаване на оплодената яйцеклетка от един в друг стадий без да се нарушават оптималните условия на култивиране (Akhter & Shahab, 2017; Pribenszky, Nilseid, & Montag, 2017). Ползата при оплодените яйцеклетки е да се отчете дали преминават в сингамия в правилния часови диапазон (22-24ч) и дали на по-късен етап не се появяват допълнителен 1 или повече пронуклеуси, което е ясен белег за анеуплоидност.

В заключение би могло да се подчертае, че яйцеклетките имат кардинална роля в цикъла на човешкия живот. Те са строго диференцирани единици, които преминават през уникалните процеси на мейоза и оплождане и също така изпълняват сложна молекулна програма за последващо развитие и делене на новообразувания организъм. Докато сперматозоида има само частичен принос за формиране на зиготата със своя генетичен материал, яйцеклетката е основният донор на цитоплазма и участва с всички свои органели и енергийни запаси, които са нужни за последващите високоспециализирани процеси на фертилизация. Въпреки че оплождането поставя началото на генетично нова единица, повече от ясно е, че ембриогенезата има дълбоки корени и е неразривно свързана с овогенезата.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

III.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 гамети с висока предиктивна стойност за последващото оплождане, развитие на получените ембриони и имплантация и да се изследват допълнителни техники за подобряване на фертилизационния потенциал.

III.2 ЗАДАЧИ

1. Да се изследва влиянието на пациент-специфични фактори върху броя, зрелостта, оплодителния и имплантационен потенциал на яйцеклетките: възраст, ИТМ, тютюнопушене, серумни нива на 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 – 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 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.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

IV.1. МАТЕРИАЛИ

IV.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 на 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 IVF 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 2013 г. до Декември 2021 г. 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 2017 г. до декември 2020 г. 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 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.

IV.1.2. Основни групи на работния материал

IV.1.2.1. 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 на няколко групи, в които са изследвани среден брой добити яйцеклетки след фоликуларна пункция, среден брой зрели яйцеклетки и дял на зрелите яйцеклетки от общия брой добити в проценти, като качествен маркер, процент оплодени яйцеклетки и процент клинични бременности. Изследвано е влиянието на пациент-специфични фактори свързани с начина на живот – възраст, тегло и тютюнопушене, базални нива на FSH, някои заболявания, като ендометриозната болест и прекарани възпалителни процеси, както и директни манипулации върху яйцеклетките в лабораторни условия - ICSI, криопрезервация.

Критерии за включване:

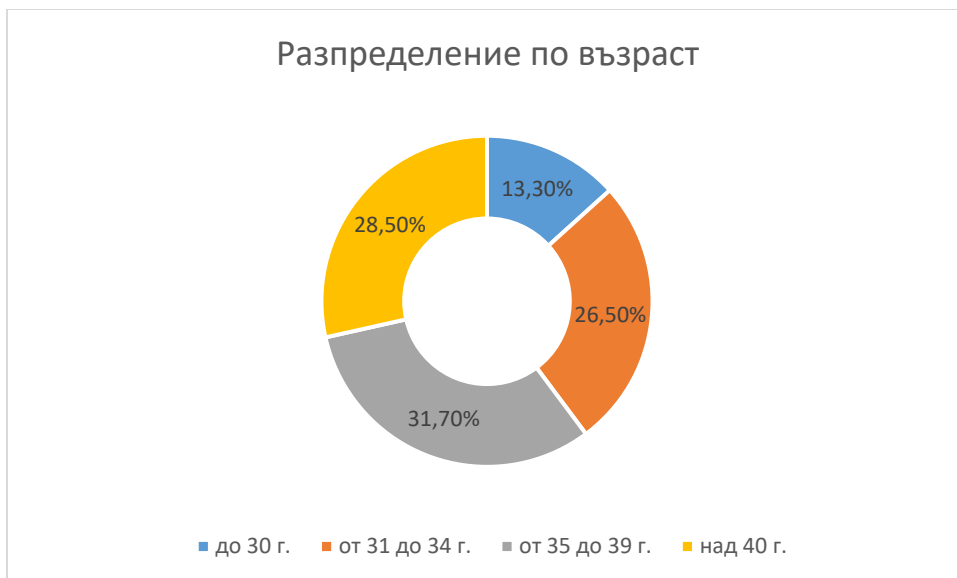
- Могат да бъдат оценени числено
- Има литературни данни за тяхното влияние
- Могат да бъдат разделени в различни категории
- Могат да бъдат сравнени с контролна група
- Имат установени референтни стойности
- Литературните данни за тяхното влияние са противоречиви или обект на дебат
- В периода на провеждане 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 олигоастенозооспемия, некроспермия, криптозооспемия) и морфология под 3% по Kruger
- Сперматозоиди, добити от тестисите по хирургичен път (PESA, TESE, MESA)
- Неподписано информирано съгласие

Възраст

Възрастта на жената е един от основните определящите фактори за нейните репродуктивни възможности и резултата от лечението на инфертилитет (Юнакова и съавт., 2015). Множество проучвания (Mikwar, MacFarlane, & Marchetti, 2020; J. J. Zhang et al., 2020) установяват пряка корелация между възрастовия фактор и яйчниковият резерв, който след 35 годишна възраст започва постепенно отпадане на своята функция. Този процес има индивидуален характер, но след преминаването на тази условна възрастова граница, негативните процеси се ускоряват. Броят на добитите яйцеклетки е тясно свързан с функцията на яйчниците и техният резерв. С напредване на възрастта, освен броя, пряко се повлиява и генетичното качество на овоцитите (Llonch et al., 2021). С цел да се анализира ефектът 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 (фигура 17) - група 1: под 30 г.; група 2: 31-34 г.; група 3: 35-39 г.; група 4: над 40 г.

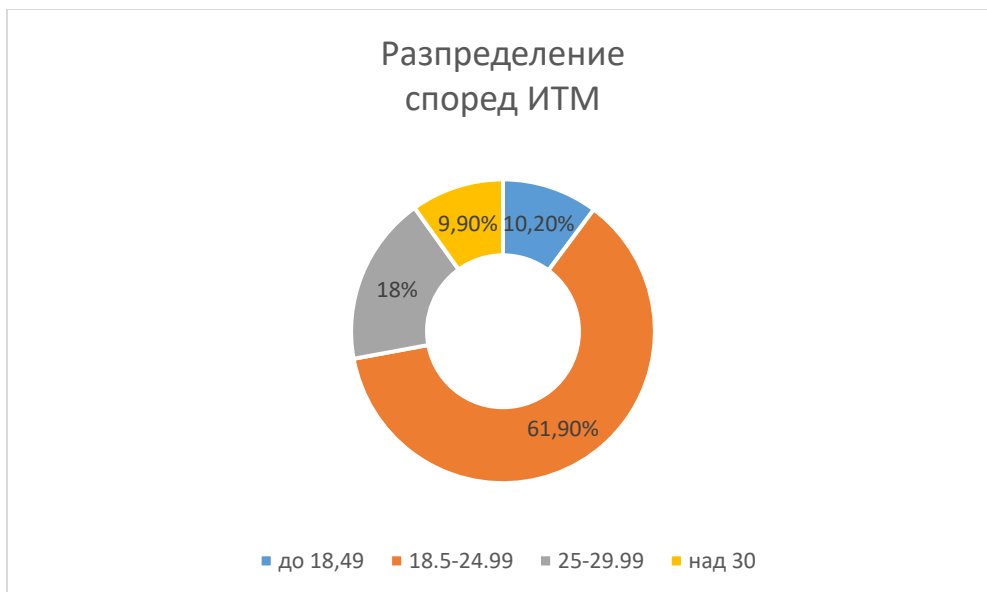


Фиг. 17. Процентно разпределение на пациентките в различните възрастови групи

Индекс на телесната маса

Наднорменото (според някои проучвания и поднорменото тегло има отношение към изхода от асистирана репродукция. Индексът на телесната маса е медико-биологичен показател, който служи за определяне на нормалното, здравословно тегло при хора с различен ръст и за диагностициране на различни отклонения от нормата, като затлъстяване и недохранване. Обезитетът/затлъстяването в последните години се налага като едно от най-големите предизвикателства за общественото здравеопазване. При жените повишеното количество мастна тъкан повлиява негативно фертилитета независимо от статуса на яйчниковия резерв (Hieronimus & Ensenauer, 2021).

За да се установи има ли отношение ИТМ към броя на добитите яйцеклетки и оплождането разделихме пациентките 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: $ИТМ = \frac{КГ}{М^2}$ (съотношение между теглото в кг и височината в метри на квадрат) (фиг. 18).



Фиг. 18. Процентно съотношение на пациентките според техния ИТМ

Тютюнопушене

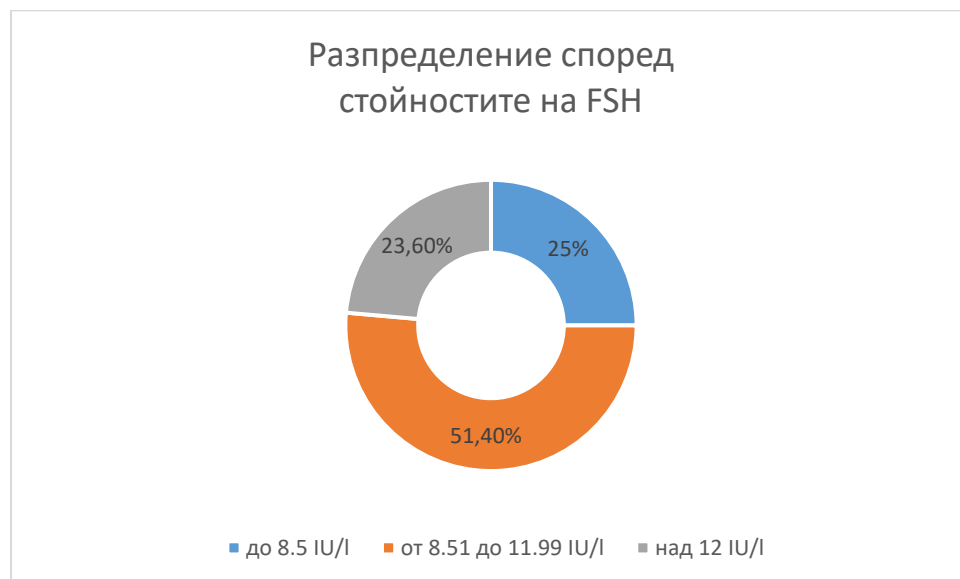
Тютюнопушенето като навик със социално и здравно значение е обект на редица изследвания (Rascola et al., 2021), включително и върху репродуктивното здраве на хората (Юнакова и съавт., 2018). За да се установи има ли отражение върху броя и качеството на яйцеклетките при български жени, целящи бременност и употребяващи никотинови изделия по време на лечебния процес, проучихме резултатите за 989 пациентки, при които са снети анамнестични данни дали пушат или не. В зависимост от това те са разделени на 2 групи: група 1: пушачи; група 2: непушачи (фиг. 19).



Фиг. 19. Процентно съотношение на жените според тютюнопушене

Базални нива на FSH

За да се установи дали високите серумни нива на фоликуло-стимулиращия хормон, изследван в ранна фоликуларна фаза влияят сигнификантно върху качеството на овоцитите (Lyu et al., 2013) и дали имат отношение към броя на аспирираните яйцеклетки, бяха екстрапулирани 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 (Юнакова и сътр., 2018), се обособяват 3 групи (фиг. 20) 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. 20. Разпределение на жените според стойностите на FSH

Влияние на ендометриозата

Ендометриозата е социално значимо заболяване, което се характеризира с прогресиращ ход. Степента на влияние и засягане на репродуктивните способности на жената зависят както от стадия, така и от локализацията (Магунска и съавт., 2016). За да установим дали патологичният механизъм на заболяването се отразява не само върху процеса на имплантация на ембриона, но и върху броя и качеството на яйцеклетките (Simoroulou et al., 2021), 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. 21) като водещ фактор за инфертилитет в двойката. За контролна група са сравнени резултатите на 573 пациентски двойки с мъжки фактор.



Фиг. 21. Процентно разпределение на жените според тип инфертилитет

Влияние на тубарния фактор

Възпалителните процеси в малкия таз, водещи до тубарна оклузия и формиране на хидросалпингси са една от водещите причини за инфертилитет (Greydanus, Cabral, & Patel, 2022), поради създаване на физическа бариера, пречатваща пътя на яйцеклетката от яйчника до маточната лигавица. 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. 22).



Фиг. 22. Процентно разпределение на жените според тип инфертилитет

Влияние на ICSI процедурата

Инжектирането на единичен селектиран сперматозоид е процедура, въведена повече от десетилетие след прилагането на IVF методиката като стандартна лабораторна процедура в световен мащаб. Първоначалните резултати са свързани с висок процент дегенерирали след манипулацията яйцеклетки. От тогава ICSI процедурата присъства неизменно в литературата като фактор, оказващ влияние върху оплождането. В последните години с усъвършенстването на апаратурата за микроманипулиране и подобряването на опитността на ембриолозите, този фактор се е превърнал в абсолютно пренебрежима величина (Farhi et al., 2019). С цел окончателно да отхвърлим неговата значимост, изчислихме резултатите от оплождане при 2897 цикъла. В 666 от тях е приложена класическа IVF процедура, а при 2231 – манипулиране чрез ICSI (фиг. 23).



Фиг. 23. Процентно разпределение на жените според начина на оплождане

Влияние на криоконсервацията

Подобно на ICSI процедурата, успешното замразяване и размразяване на овоцити е сравнително нова техника, която едва допреди няколко години се водеше за експериментална методика. Последното десетилетие обаче бележи значителен напредък след въвеждането на витрификацията в стандартната лабораторна практика, както и в усъвършенстването на протоколите и средите за замразяване и размразяване (Iussig et al., 2019). Дългогодишната практика и опитност на екипа също има изключително значение. Ето защо, едва няколко години след изваждането на криопрезервацията на овоцити от списъка с експериментални методики, вече има публикации, които отхвърлят значението ѝ като фактор за качеството на яйцеклетките и шансовете за постигане на успешна бременност.

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. 24).



Фиг. 24. Процентно разпределение на жените според вида яйцеклетки

IV.1.2.2. Управление на факторите и графично представяне

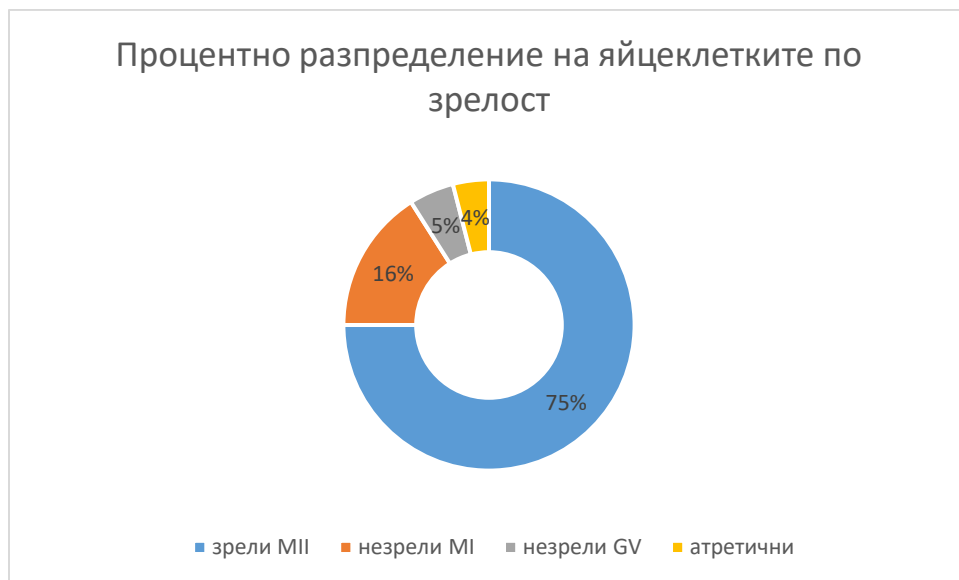
С непрекъснатото развитие на технологиите и активната работа на стотици научни екипи в областта на репродуктивната медицина, данни относно това кои фактори оказват влияние върху броя, качеството и оплодителния потенциал на яйцеклетките се публикуват с висока честота и е нужно постоянно осъвременяване на информацията.

Управлението и систематизацията на факторите, които повлияват компетентността на човешкия овоцит е от водещо значение за точното диагностициране на причините за инфертилитет при пациентите и изготвянето на акуратен терапевтичен план.

IV.1.2.3. Оценка на качеството на яйцеклетките

Според препоръките за добра лабораторна практика на ESHRE, при извършване на процедура по оплождане чрез интрацитоплазмено инжектиране, е необходимо акуратно да бъде документирано качеството на яйцеклетките. В ежедневната работа на ембриолозите обаче това не е стандартна процедура поради липсата на ясни критерии кои точно морфологични особености и отклонения да се маркират. 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, МII яйцеклетки, които подлежат на оплождане чрез ICSI са оценени. (фиг. 25).



Фиг. 25. Процентно разпределение на яйцеклетките по зрелост

Критерии за включване в изследването са:

- Проведена фоликуларна пункция с добита поне 1 яйцеклетка на стадий МII
- ICSI процедура
- Използване на собствени яйцеклетки

Исключващи критерии:

- Фоликуларна пункция с 0 извадени яйцеклетки
- Фоликуларна пункция с извадени само незрели (MI, GV) и/или атретични яйцеклетки
- IVF процедура
- Използване на донорски яйцеклетки

След извършване на морфологична и функционална оценка, зрелите яйцеклетки, които са годни за манипулиране са проследени до оплождане, качество на ембриони и в случаите, в които е възможно – до имплантация.

IV.1.2.4. Техники, повишаващи оплодителния потенциал на яйцеклетките

Освен класическото ин витро оплождане и интрацитоплазменото инжектиране, в ембриологичната лаборатория се прилагат и разнообразни допълнителни техники и процедури, целящи да подобрят резултатите от оплождане и качеството на ембрионите. Всички допълнителни методики се прилагат индивидуално в зависимост от конкретната причина за инфертилитет на двойката. Когато е налице лошо качество на яйцеклетките и ниско или липсващо оплождане, дължащо се на женските гамети, възможностите за корекция на проблема са силно ограничени. Основните методики, насочени към яйцеклетките са асистирана овоцитна активация с хранителна среда, богата на калциев йонофор и визуализация на делителното вретено чрез поляризационна микроскопия.

Асистирана овоцитна активация

Липсата на оплождане е силно нежелан резултат в циклите на асистирана репродукция, но срещащ се с относително постоянна честота. За да се избегне повторемостта при лечението на пациенти след неуспешен опит, свързан с проблеми с оплождането може да се приложат различни методики за подобряване на успеваемостта в последващ цикъл.

Асистираната овоцитна активация с калциев йонофор е един от механизмите за постигане на по-добри резултати в случаите с история на ниско или липсващо оплождане.

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 МII яйцеклетки в рамките на 74 ICSI цикъла. В 30 от циклите след подписване на информирано съгласие от двойката, е приложена активация Ca^{2+} ionophore като допълнителна методика за подобряване на резултатите. Всички пациенти, при които е приложена методиката имат история с 1 или повече неуспешни опита (1-4), при които е установено много ниско или липсващо оплождане. 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.

С цел приложение на методиката, всички яйцеклетки в цикъла с асистирана овоцитна активация са подложени на ICSI процедура независимо от параметрите на еякулата в деня на фоликуларната пункция (ФП). Проследени са резултатите от оплождане, качество на ембриони, имплантация и клинични бременности.

Визуализация на делителното вретено – Spindle view (SV)

Хромозомни грешки в човешките овоцити имат водеща роля за настъпване на спонтанни аборти и са причина за инфертилитет (So et al., 2022). Тези грешки са резултат от неправилно агрегиране на хромозомите в делителното вретено по време на матурацията на овоцитите. Често обаче човешките яйцеклетки образуват доста нестабилни делителни вретена, наблюдава се и изместване на делителното вретено от нормалната му позиция (с 30 и повече градуса), като този процес се ускорява с напредване на репродуктивната възраст и изчерпването на яйчниковия резерв и води до получаване на висок процент анеуплоидни ембриони (Oh, Jang, & Yoon, 2022). 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

В група 1 бяха отчетени резултатите от визуализацията и в случаите, при които има изместване на делителното вретено, позиционирането на инжекционната пипета беше коригирано. Сравнени са резултатите в двете групи по отношение на оплождане и постигнати клинични бременности.

IV.2. МЕТОДИ

В настоящото проучване са използвани методи, които са разпределени в няколко отделни групи, характерни за всеки един етап от цикъла по асистирана репродукция.

IV.2.1. Методи за първичен подбор на пациенти:

За да се установи дали двойката, потърсила консултация за забременяване е индицирана за провеждане на лечение чрез асистирана репродукция, се използва набор от различни диагностични методи.

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.

Първичната консултация на пациентите се извършва от акушер гинеколог репродуктивен специалист. Снема се пълна и подробна анамнеза, целяща да определи водещата причина за стерилитет при двойката - давност на опитите за забременяване, бременности, раждания, аборти, деца от други партньори, хирургични интервенции, заболявания, свързани с репродуктивния тракт, направени изследвания и предходни лечения и т.н. Цялата информация се въвежда в електронен файл-образец във вече създадената регистрация на пациентите. Към досието се сканират и прилагат копия от документация – епикризи, лабораторни изследвания, прегледи. Документират се данни за начина на живот – тютюнопушене, индекс на телесна маса, работа във вредни условия и т.н.

Диагностични методи

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

Методи за образна диагностика

Чрез ехография се извършва подробен гинекологичен преглед с ултразвуково изследване при жената за първоначална оценка на матка, маточни тръби, и яйчников резерв.

Методи за установяване на тубарна проходимост:

Извършва се основно чрез хидротубация под УЗ контрол или хистеросаплингография (HSG), за да се установи евентуална проходимост или наличие на тубарен фактор – синехии, хидросаплингс и други тазово-възпалителни заболявания.

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). Основните параметри, които се изследват са: обем [ml], рН, вискозитет, концентрация [$\times 10^6/ml$], процент активно и слабо подвижни сперматозоиди [ml], процент неподвижни [ml], брой подвижни сперматозоиди на милилитър [$\times 10^6/ml$]. Заключение се дава според критериите на СЗО, 1999 г.

IV.2.2. Методи за хормонална стимулация за целите на АРТ:

Пациентските двойки, при които чрез проведените методи за изследване е установена необходимост от асистиран репродуктивни технологии за увеличаване на шансовете за настъпване на бременност пристъпват към цикъл за лечение, който започва с хормонална стимулация на яйчниците.

Методи за провеждане на КОХ

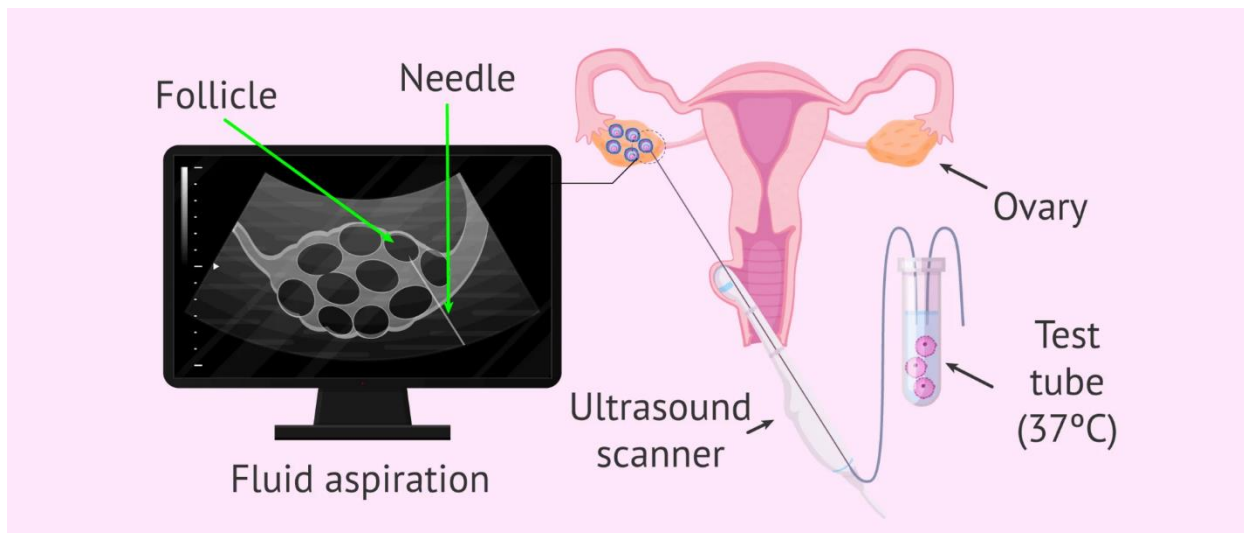
Стимулацията на овариалния цикъл включва администрация на орални и/или инжекционни форми медикаменти с цел да се индуцира суперовулация. Тя започва в ранната фоликуларна фаза, около 2ри ден от менструалния цикъл и се извършва по определен протокол спрямо очаквания отговор. Основните препарати, използвани за стимулация са няколко групи:

- Рекомбинантни FSH препарати: Gonal F[®] (Merk Serono Europe Ltd, UK), Pergoveris, Luveris, Rekovelle, Elonva
- Биоподобни - Bemfola[®] (Gedeon Richter Plc., Hungary),
- Уринарни препарати с комбинирана FSH/LH активност: Menopur[®], (Ferring GmbH, Germany), Meriofert[®] (IBSA Farmaceutici Italia, Italy)
- Перорални препарати: Femara (Novartis Pharma GmbH, Germany), Clostylbegyt (EGIS Pharmaceuticals PLS, Hungary)

Освен въвеждане на хормони за активиране на яйчниковата дейност, КОХ включва и ултразвуково мониториране, лабораторни изследвания, тригериране на овулацията във финалния стадий.

Манипулационни методи

След негативни серологични изследвания и таймиране на овулацията, пациентката подписва информирано съгласие и се пристъпва към фоликуларната пункция. Аспирацията на яйцеклетките от фоликулите се извършва в гинекологична манипулационна, която е разположена непосредствено до ембриологичната лаборатория. Пациентката се поставя в литотомично положение, прави се влагалищен тоалет и се въвежда в краткотрайна венозна анестезия. Пункцията се осъществява под ултразвуков контрол, като към вагиналния 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) (фиг. 26).



Фиг. 26. Пункция на фоликули по УЗ контрол

IV.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 кумулулно-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 кумулулно-ооцитните комплекси (фиг. 27). Тези СОС, 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). СОС, които съдържат атретичен (дегенеративен) вителус, или липсва такъв, биват блокирани, изтеглени и унищожени. В края на процедурата бройката на добитите яйцеклетки се документира в ембриологичния протокол и в електронното досие на пациентите.



Фиг.27. Идентификация на кумулулно-ооцитни комплекси под микроскоп в ламинарен бокс
Методи за оценка и селекция на зрели овоцити

След 3-5 часова инкубиране СОС, които ще се подлагат на ICSI процедура се денудират посредством хранителна среда, съдържаща хиалуронидаза (Hyase 10X, Vitrolife, Sweden) и гранулозните клетки се отстраняват чрез механично пипетиране с трансферна пипета 140 μm . Всички незрели яйцеклетки на стадий GV и MI се блокират и унищожават. 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 към яйцеклетките, без да се отстраняват техните кумулулни маси, се добавят предварително обработени, изолирани и капацитирани сперматозоиди. На всяка капка с хранителна среда, съдържаща една или няколко яйцеклетки се добавят по 100 000/ml добре подвижни сперматозоиди и се коинкубират до следващия ден, когато на 18ти час се отчита оплождането.

При ICSI оплождането всички зрели яйцеклетки се подреждат поединично в отделни капки в петри за ICSI, номерират се и всяка една се подлага на интрацитоплазмено инжектиране с единичен сперматозоид. Инжектирането се извършва на инвретен микроскоп (Zeiss

Observer a1 ax10, Germany), снабден с микроманипулатор (Eppendorff Transfer Man4, Germany).

IV.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. Всички особености и отклонения от нормата се документираха. Новата бинарна система за оценяване е наречена OVOSCORE.

След прилагане на рутинна денудация за целите на ICSI процедура, всички зрели овоцити са инжектирани и оценени от 6 опитни оператора.

Методи за морфологична оценка

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

- Централна гранулация
- Едрозърнеста гранулирана цитоплазма
- Вакуоли
- Тъмна цитоплазма (dark/brown eggs)
- Наличие на дегенеративни участъци
- Голямо перивителинно пространство
- Наличие на участъци с гладък ендоплазмен ретикулум

Методи за функционална оценка

След селекция на единичен сперматозоид с добра морфология и правилни линейарни движения, посредством микропипета всяка от яйцеклетките се подложи на пенетрация, засмукване на част от цитоплазменото съдържимо и връщане обратно в овоцита заедно с предварително обездвижения сперматозоид. По време на цялата процедура се документираха функционалните характеристики на яйцеклетката, като основно под внимание се взеха следните параметри:

- Еластичност на оволемата при пенетрация
- Съпротивление при адхезията на цитоплазма в инжекционната пипета

- Лесно или трудно скъсване на мембраната
- Вискозитет и плътност на цитоплазмата
- Наличие и продължителност на инжекционна „фунийка“

Скоринг система

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

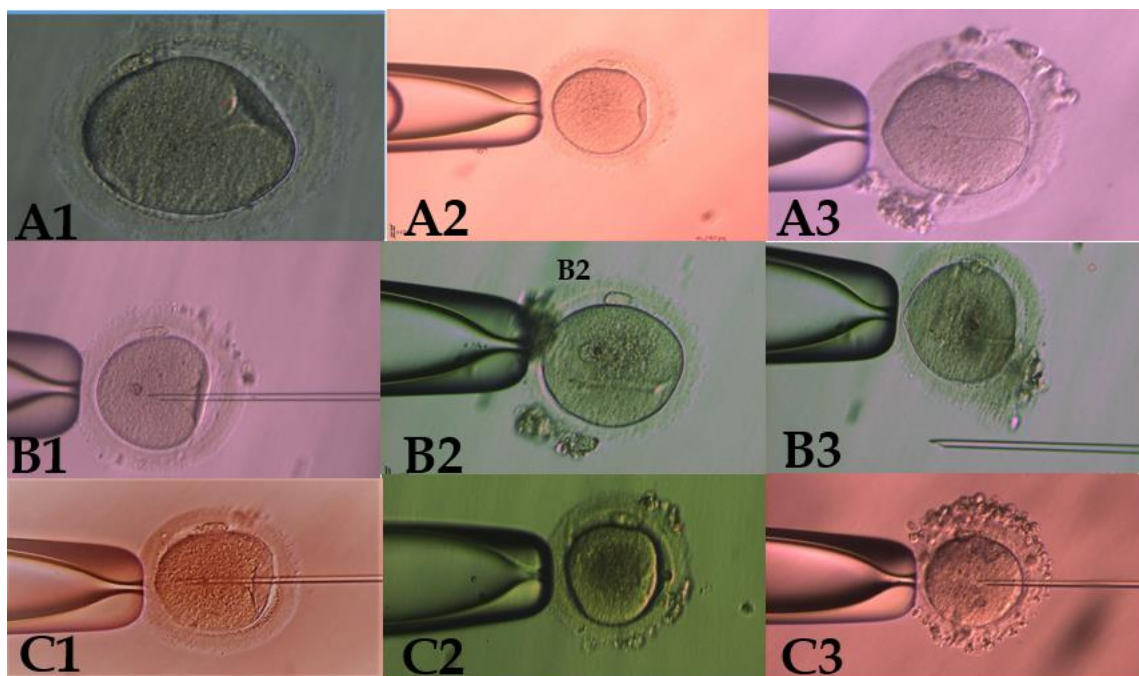
Оценка по морфологични маркери:

- **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

Обединихме двете оценки и комбинацията от тях даде обобщен двоен скор, при който яйцеклетките, оценени с най-висок скор са А1 и съответно тези с най-нисък са С3 (фиг. 28).



Фиг. 28. Морфо-физиологичен грейдинг по метода OVOSCORE

След приключване на манипулацията, инжектираните яйцеклетки се подредиха в съответния ред в петри с единични капки с хранителна среда (G-TL REF medium, Vitrolife, Sweden) и се инкубираха до следващия ден в инкубатор с тройна газова смес (Thermo Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, USA).

На 18ти час след извършване на манипулацията се отчете наличието или липсата на пронуклеуси, индициращи оплождане.

След отчитане на оплождането, зиготите се подредиха в петри (GPS embryo corral® petri dish, LifeGlobal, Denmark) с възможност за проследяване и идентифициране на всеки ембрион, получен от съответната яйцеклетка (фиг. 29). В петрито ембрионите се култивираха до деня на техния трансфер, замразяване или унищожаване.



Фиг. 29. GPS петри, при което всеки ембрион има универсални „координати“

На ден 5 се оцени качеството на добитите бластоцисти. Ембрионите са оценявани по скалата на Gardner (David K Gardner, Stevens, Sheehan, & Schoolcraft, 2007) от 1 до 5, като като B11 е ранен бластоцист, а B15 – излюпващ се (хачващ).

За отчитане на клинични бременности оценихме само тези случаи, при които има 100% имплантация – броят на трансферираните ембриони отговаря на броя на плодните сакове, или когато не се е установила бременност и не се е имплантирал нито един от ембрионите.

IV.2.5. Методи за повишаване на процента оплождане

Методите, които се приложиха върху яйцеклетките, за да се установи повишават ли се техния оплодителен потенциал са 2 – култивиране в среда с калциев йонофор и визуализация на делителното вретено чрез специализиран софтуер.

Калциева активация

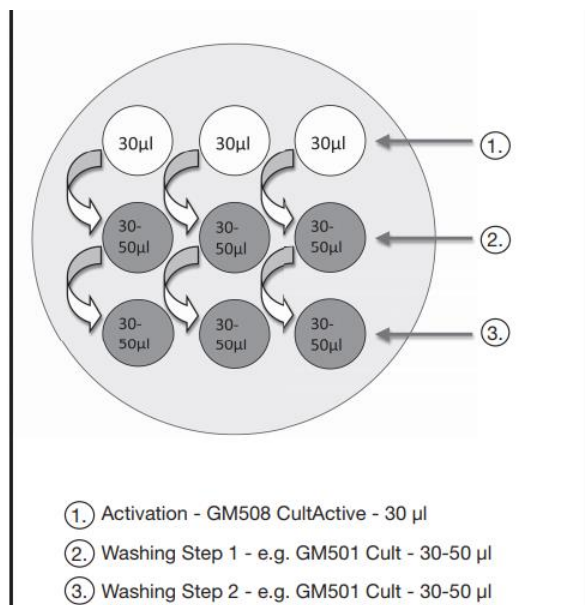
С цел постигане на по-високи нива на оплождане използвахме като допълнение към стандартните лабораторни процедури готова за употреба среда GM508 CultActive на GYNEMED, Germany (фиг. 30).



Фиг. 30. Среда CultActive с калциев йонофор.

Приготвя се по следния протокол:

В петри за всяка яйцеклетка се поставя по 1 капка (30 μ l) GM508 CultActive и по 2 капки среда без MOPS и HEPES (30-50 μ l) за промиване (фиг. 31). След денудация и извършване на ICSI процедура, яйцеклетките се поставят в предварително инкубираното петри с GM508 CultActive за 15 минути. Времето за инкубация позволява навлизане на калциевите йони в яйцеклетката и обогатяването на вътреклетъчната концентрация, която е от значение за активирането на финалната фаза от мейозата на овоцита и първите етапи от оплождането. След изтичане на времето се промиват двукратно в средата без MOPS и HEPES и се поставят в хранителна среда за инкубиране.



Фиг. 31. Протокол за култивиране на яйцеклетките в среда с калциев йонофор

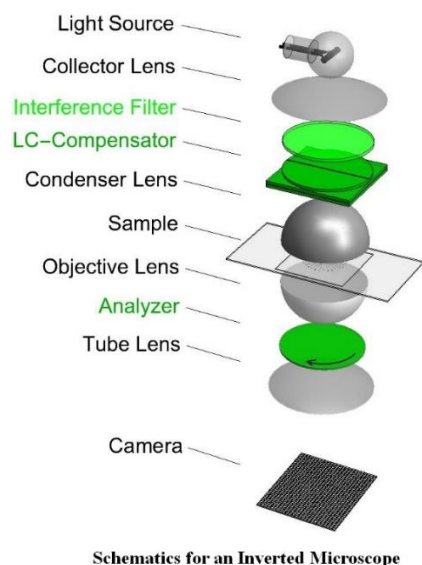
Визуализация на мейотичното вретено

За целта използвахме специализирана апаратура, снабдена със софтуер – полюскоп (Oosight™, Hamilton Thorn, USA) (фиг. 32), с който беше възможно да се наблюдава (в случаите, в които е формирано) позицията на мейотичното вретено и да се извърши процедурата по инжектиране на яйцеклетките по безопасен начин без да бъде разрушено от пенетриращата в яйцеклетката пипета.



Фиг. 32. Полюскоп Oosight за визуализация на делителното вретено

Апаратурата на полюскопа е монтирана към микроманипулатора и визуализацията се осъществява по време на ICSI процедура чрез камера със софтуер, прикрепена към инвретния микроскоп (фиг. 33).



Фиг. 33. Схема на апаратурата за визуализация на мейотичното вретено

IV.2.6. Методи за анализ и управление на факторите

Анализ на литературни източници

С цел да се създаде цялостна, задълбочена и актуална картина на най-важните фактори, които имат отношение към компетентността на яйцеклетките и да представим обобщен лесен за навигация формат, беше направен интегративен обзор на научната литература и селекция тези от тях, за които има докладвани данни за потенциално влияние върху овоцитното качество. Пет бази данни и референтни списъци (Medline, PubMed, Scopus, Cochrane Library, Scholar) бяха претърсени 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.

Поради липсата на графично представен изглед на факторите в научната литература, официалните препоръки и консенсуси, трансформирахме данните от 115 литературни източника, които показаха най-висока степен на съвпадение по търсения проблем, в табличен вид (фиг. 34).



Фиг. 34. Вид на използваните литературни източници

Методи за систематизация чрез изкуствен интелект

Изкуственият интелект (AI) в последните години навлиза все по-сериозно в медицината и в негови бъдещи разработки се залагат големи очаквания. В областта на АРТ технологиите вече се предлагат на пазара редица AI обучени софтуерни продукти и десетки са в процес на създаване.

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 (Lee, Bubeck, & Petro, 2023; Nori, King, McKinney, Carignan, & Horvitz, 2023).

IV.2.7. Статистически методи

Първична селекция на данните

Първичната информация е генерирана от болничния софтуер Joystick чрез дефиниране на типа и формата на променливите, скалата на измерването, етикетите на стойностите при качествените белези и др. След задаване на параметрите, обект на настоящото изследване, данните са трансформирани в електронни таблици Excel. Събраните в табличен вид данни са систематизирани и експортирани в статистическия пакет GraphPad 8.

Статистическа обработка на данните

Създадени са нови променливи чрез рекодиране, например: възраст на жените (години) във възрастови групи според категориите, дефинирани от ESHRE; стойността на теглото (ИТМ) – в категориите, класифицирани от СЗО и др. За целите на настоящия статистически анализ от целия масив данни са селектирани и обобщени различни видове групи и подгрупи, отговарящи на критериите, заложи в целите на това изследване. Бяха приложени методи за дескриптивна статистика; тестове за определяне нормалността на разпределението (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk); параметрични и непараметрични тестове за корелационен анализ (Pearson product-moment; Spearman rank-order); за съпоставка на средни стойности на извадки (Student's t-test; Mann-Whitney U test; Wilcoxon signed-rank test; One-way ANOVA; Kruskal-Wallis test by ranks) и за сравнение на относителни дялове (Pearson's chi-square test; Fisher's exact test). Анализите бяха проведени посредством програмен продукт GraphPad 8.

V. 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 полускоп.

V.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

С напредване на възрастта се наблюдава естествено понижаване на фертилитета при жените и шансовете за спонтанно забременяване са редуцирани. Чрез прилагане на АРТ технологии частично могат да смекчат последиците от възрастовите изменения в яйчника и яйцеклетките, но ефекта от лечението може да е неудовлетворителен.

С цел да изследваме този фактор при български пациентки, обособихме 4 възрастови групи според възприетите от Европейският IVF мониторинг към ESHRE критерии: група 1: под 30 г.; група 2: 31-34 г.; 35-39 г.; група 4: над 40 г. В изследването на влиянието на фактора са включени всички 9816 пациентки, обект на този научен труд, поради фактът, че отбелязването на възрастта е абсолютно задължителен критерий за започване на процедура по АРТ и генериране на всички документи и епикризи, свързани с лечението.

От разпределението на броя цикли в различните възрастови групи се установява, че най-голям е дялът 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-

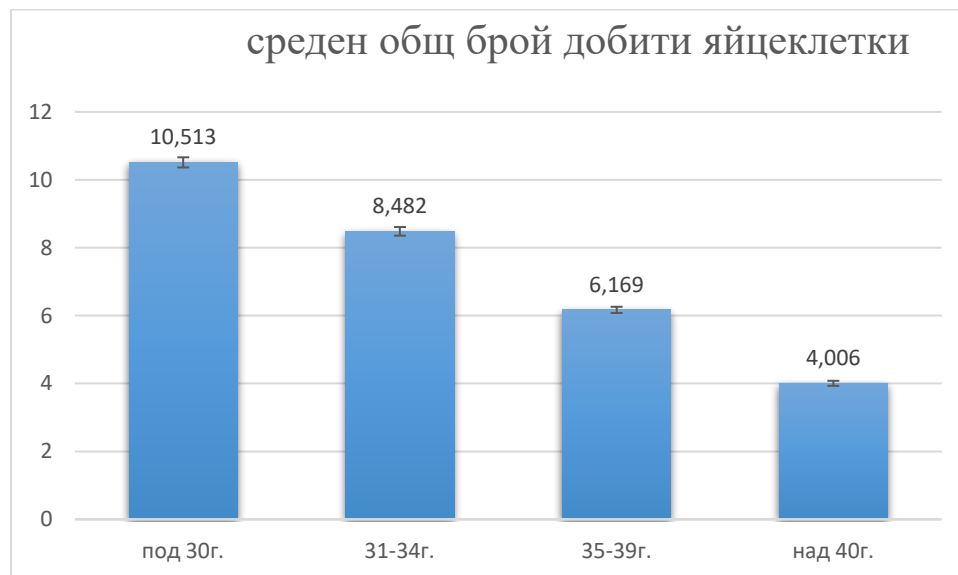
малко като брой (n= 2114) и най-малък е дялът на най-младите на възраст от 18 до 30 години (n= 1795).

След извършване на фоликуларна пункция под УЗ контрол от тези 9816 опита са добити общо 67 187 кумулушно-ооцитни комплекса. На табл. 8 е показано разпределението на всички яйцеклетки в различните възрастови категории:

Табл. 8. Основни статистически показатели на общия брой яйцеклетки по възрастови групи

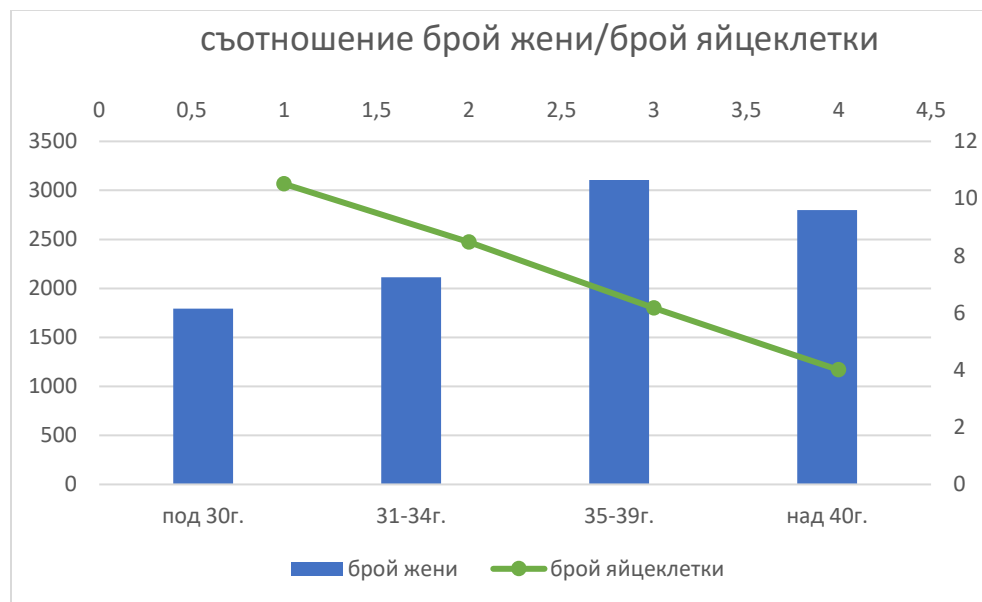
общ брой яйцеклетки					
възраст (години)	n	мин.	макс.	среден брой	SE
до 30	18871	0	42	10,513	0,149
31 - 34	17930	0	45	8,482	0,127
35 - 39	19168	0	43	6,169	0,0911
над 40	11218	0	34	4,006	0,0739

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. 35).



Фиг. 35. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните възрастови групи

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. 36, показваща броя на пациентките в различните възрастови групи и данните за средния брой яйцеклетки в съответните групи:



Фиг. 36. Брой на жените във възрастовите групи и средния брой добити яйцеклетки във всяка група

В различните възрастови групи броят на пациентките е съпоставим и достатъчен за сравнителна репрезентативна извадка.

От сравнителния анализ се открива статистически зависима разлика във всяка една група. При множествено сравнение по метода на Dunn се доказва различия между всички двойки възрастови групи ($p < 0.05$).

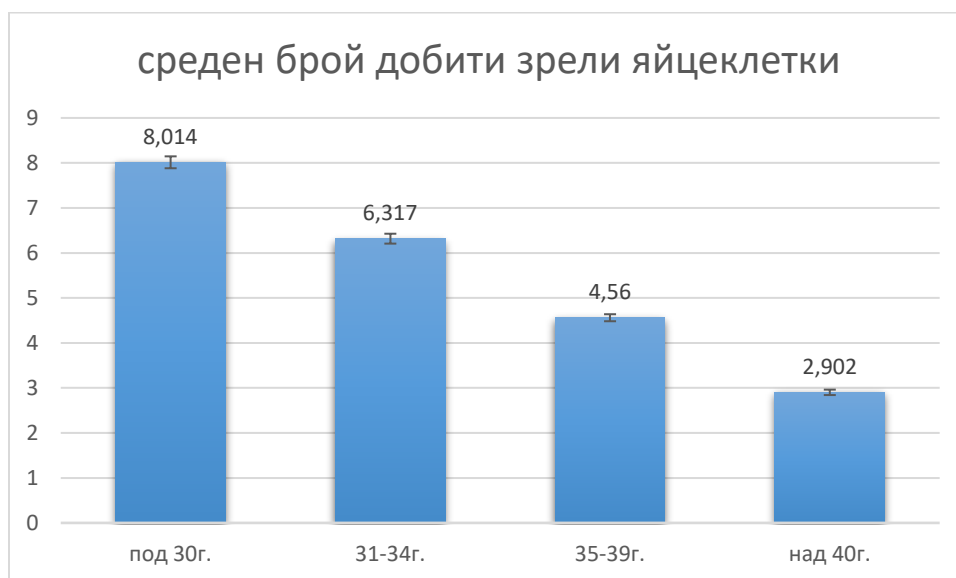
За успешния изход от лечението чрез АРТ обаче от съществено значение е не само количеството, но и качеството на добитите яйцеклетки. Първият критерий за селекция на овоцитите е тяхната генетична зрялост. Само зрелите, МII овоцити могат да се подложат на оплождане и циклите, в които няма извадена нито 1 яйцеклетка, или тези, при които нито една от получените яйцеклетки не е с нормална матурация (NM) на стадий МII се канселират и опита приключва до ФП. При анализ на циклите, в които няма годни за оплождане яйцеклетки отново се откриват значителни различия в отделните възрастови групи. (табл. 9).

Табл. 9. 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

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 ПЯО в тези групи.

На фиг. 37 са отразени броя на зрелите яйцеклетки в различните възрастови групи:



Фиг. 37. 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 (табл. 10).

Табл. 10. Основни статистически показатели за средния процент зрели яйцеклетки

среден % добити зрели яйцеклетки				
група	под 30г.	31-34г.	35-39г.	над 40г.
%	74,839	72,817	72,184	71,668
SE	0,546	0,565	0,532	0,641

От направения сравнителен анализ установихме, че не само средния брой зрели овоцити е с намаляваща тенденция с покачване на възрастта, но и пропорцията им прямо 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 35-35 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. 11:

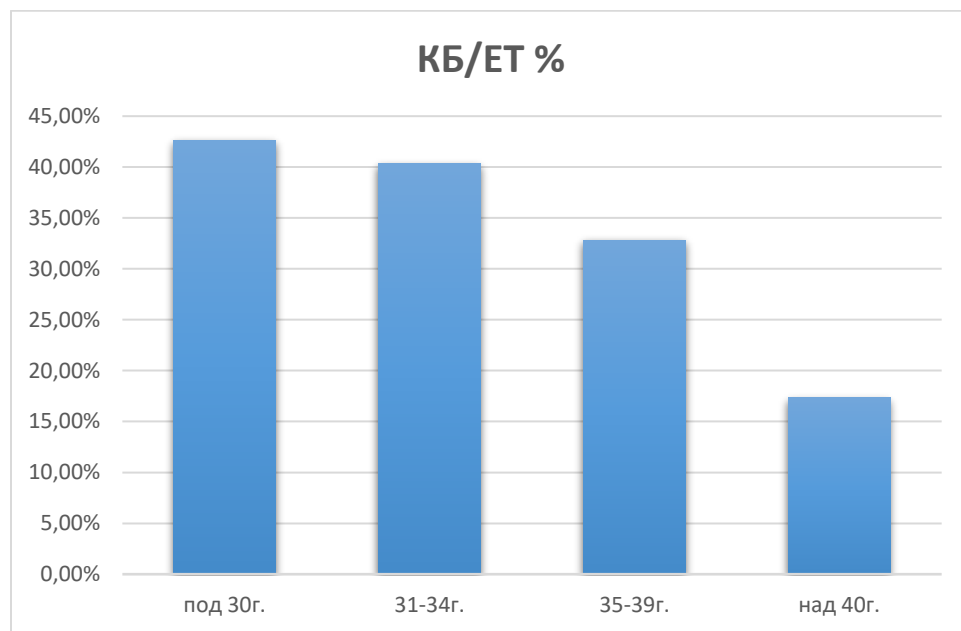
Табл. 11. Основни данни за изхода от лечението

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 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. 38).



Фиг. 38. 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:

Влиянието на възрастта върху броя и качеството на човешките яйцеклетки е може би най-доказано категоричният и най-изследваният фактор още от първите години, в които се започват масово да се извършват ин витро процедури в световен мащаб. Интересът и изследванията обаче не намаляват и до наши дни, поради фактът, че не винаги възрастта корелира с яйчниковия резерв – друг съществен фактор и не винаги репродуктивната възраст отговаря на физическата такава (266). Отчита се и тревожна тенденция за увеличаване на броя на жените с преждевременно изчерпан яйчников резерв във все по-млада възраст.

Съвременните условия за живот съществено се различават от тези преди 40 години и постоянно се променят, усъвършенстват се и техниките в полето на асистираните репродуктивни технологии. Поради тази причина възрастта като фактор ще продължи да е обект на бъдещи изследвания и анализ.

Разпределението на пациентите като относителен дял в различните възрастови групи при българките затвърждава една не само европейска, но и световна тенденция за все по-увеличаваща се средна възраст на жените, търсещи лечение чрез асистирана репродукция и желание за забременяване за първи или пореден път на по-късен етап от живота си.

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.

Изводите, които наложи анализът на крайните резултати от лечението са, че при 1/3 от опитите, които провеждат жени над 40 годишна възраст се достига до канселиране на целия цикъл. Високият cancellation rate се дължи на няколко съществени фактора: липса на яйцеклетки, липса на зрели яйцеклетки, липса на оплождане, липса на развиващи се ембриони за трансфер/замразяване, бавно делящи се ембриони, ембриони с много висок процент фрагментация, липса на бластоцист на ден 5, липса на еуплоиден ембрион след извършена генетична диагностика.

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

Голямото количество излишна мастна тъкан повлиява негативно всеки един етап от лечението чрез АРТ – от стартирането на КОХ до акушерски усложнения и последици за плода. Редица литературни данни показват занижена успеваемост при силно завишен

ИТМ, но дебатът дали високото тегло повлиява негативно качеството на яйцеклетките или рецептивността на маточната лигавица остава все още отворен.

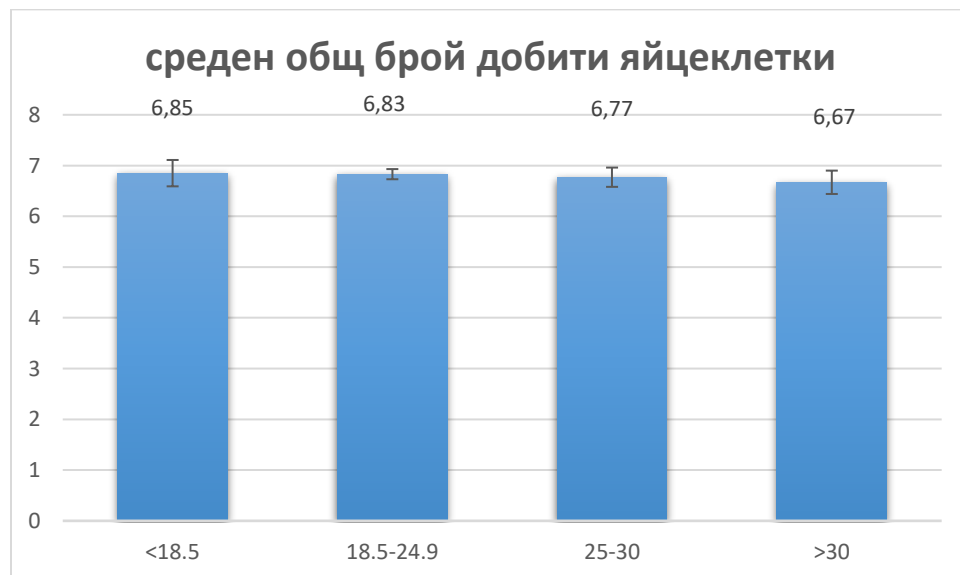
С цел да бъде изследван какъв е конкретният ефект върху яйцеклетките, тяхното качество и фертилизационен потенциал анализирахме резултатите на общо 4882 жени от партньорски двойки, провели лечение чрез АРТ, за които има въведени данни за ръст и тегло при започване на процедура по ин витро оплождане. 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. 12).

Табл. 12. 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. 39).



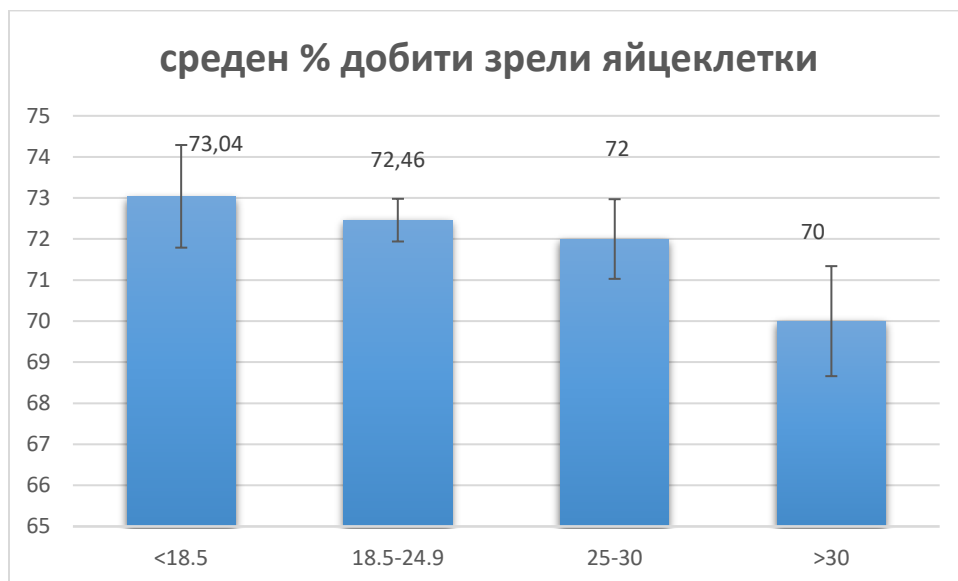
Фиг. 39. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните възрастови групи

По отношение на средният брой МП яйцеклетки, подходящи да бъдат подложени на оплождане, чрез анализ на множествено сравнение с теста на Dunn също не са установени достоверни разлики (табл. 13).

Табл. 13. Основни статистически данни за добитите яйцеклетки с NM в различните категории ИТМ

NM					
ИТМ	n	мин.	макс.	среден брой	SE
<18.5	2509	0	28	5,04	0,21
18.5-24.9	15239	0	36	5,05	0,09
25-30	4291	0	28	4,88	0,15
>30	2333	0	25	4,82	0,19

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. 40), но не се установи статистически значима разлика.



Фиг. 40. Дял на добитите МП яйцеклетки спрямо общия брой добити яйцеклетки

При сравнение на cancellation rate 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%.

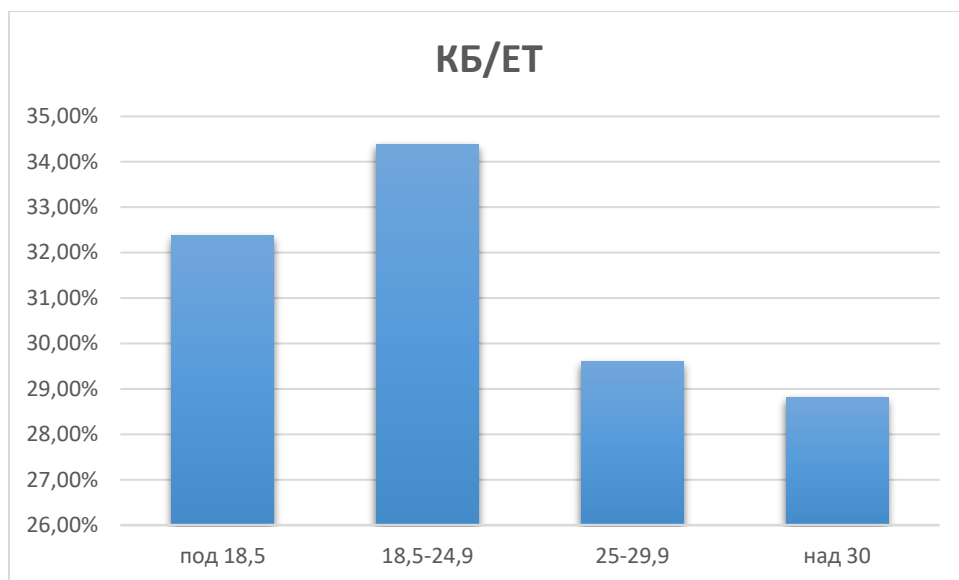
Анализът на крайните резултати от ин витро цикъла са демонстрирани в табл. 14:

Табл. 14. Основни данни за изхода от лечението

Група ИТМ	под 18,5	18,5-24,9	25-29,9	над 30
канселирана след пункция				
брой	113	595	175	106
%	23%	20%	20%	22%
приключила с трансфер				
брой	292	1825	535	293
%	58%	60%	61%	60%
приключила с трансфер и замразяване				
брой	45	342	83	51
%	9%	11%	9%	11%
приключила със замразяване				
брой	48	259	86	34
%	10%	9%	10%	7%

Данните показват сходно разпределение в процентите на изхода от циклите в различните групи. При анализ на честотата на постигнати бременности (фиг. 41) 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. 41. 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:

При анализ на числените пропорции на пациентите, попадащи в различните категории според ИТМ се забелязва, че по-голямата част от българските пациентки поддържат оптимално тегло. Това е положителна тенденция, различаваща се от данните, публикувани от СЗО, които тревожно алармират, че през 2022г. 39% от световното население над 18 годишна възраст е с наднормено тегло (1.9 милиарда души) и 13% са със затлъстяване (650 милиона души). Това е важен показател за българското население, като се има предвид, че данните за Европа относно наднормено тегло и затлъстяване са още по-високи (60% с наднормено тегло и затлъстяване) (Organization, 2022). Сред жените, лекуващи се чрез АРТ също има разлики в сравнение с българската кохорта – над 40% от пациентките в най-мощното американско проучване (Kawwass et al., 2016) са с наднормено тегло и обезитет, докато в настоящото проучване под 30% от българските пациентки попадат в тези категории.

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 (263). 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

Консумацията на тютюневи изделия е една от най-големите заплахи за общественото здравеопазване. Негативното влияние е установено във всички аспекти от човешкото здраве, включително репродуктивното. Все още е отворен дебатът по какъв конкретен начин се повлиява женският репродуктивен тракт и няма общ консенсус по въпроса. Целта на настоящото проучване е да се изследва влиянието на тютюнопушенето върху броя и оплодителната способност на овоцитите.

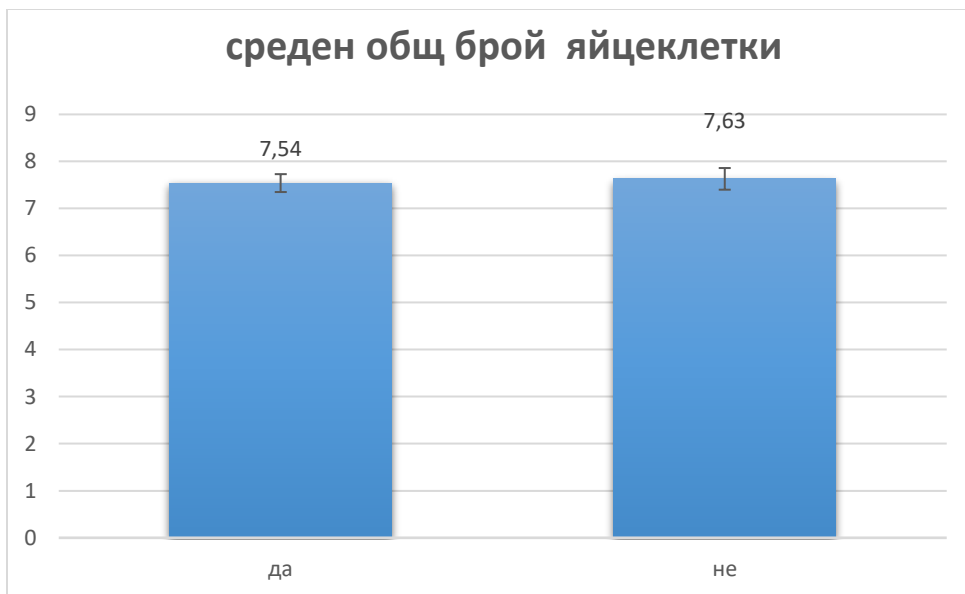
В изследването са включени 557 жени, отбелязали в информационната си карта, че са пушачки. За контролна група са селектирани 416 жени непущачки в сходни възрастови граници.

Резултатите при отчитане на броя добити яйцеклетки са представени в таблица 15:

Табл. 15. Основни статистически данни за средния брой добити яйцеклетки

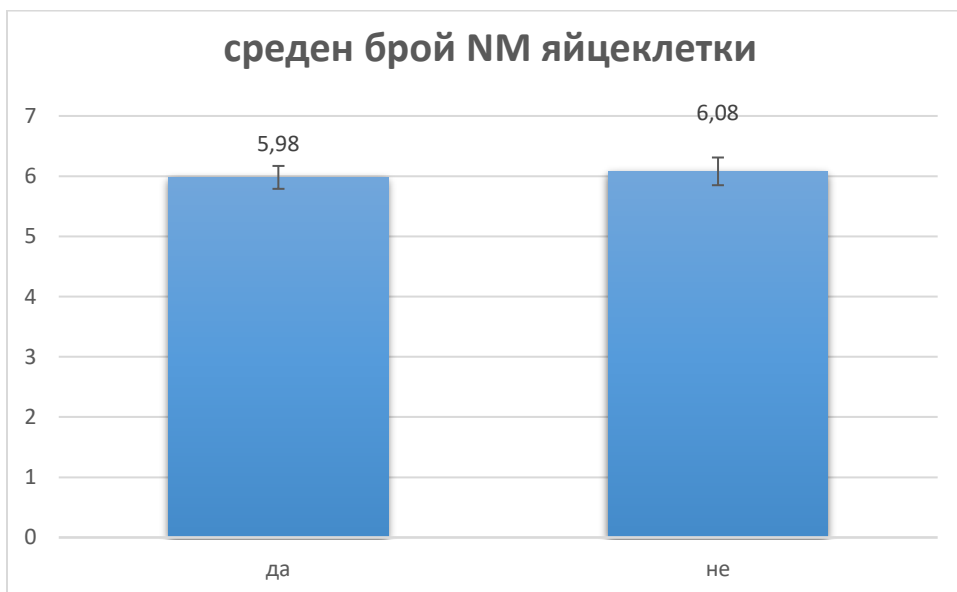
общ брой яйцеклетки					
тютюнопушене	п	мин.	макс.	среден брой	SE
да	3174	0	27	5,7	0,19
не	2272	0	30	5,48	0,23

От направения статистически тест по Mann-Whitney не бяха установени статистически различия между двете кохорти в средния брой добити яйцеклетки (фиг. 42).



Фиг. 42. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в двете групи

По отношение на средния брой зрели МП яйцеклетки също няма установени статистически зависими разлики. Данните от двете сравнявани групи са хомогенни и сравними по този показател, както и спрямо средният процент зрели овоцити от общата кохорта (фиг. 43).



Фиг. 43. Среден брой МП яйцеклетки в двете групи

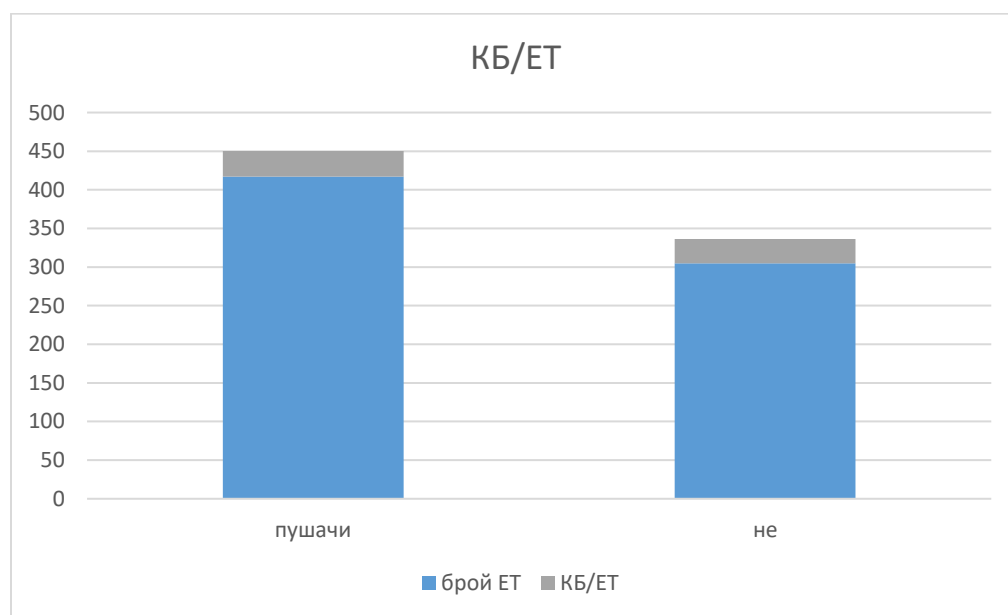
Резултатите от оплождането също показват сходни характеристики – 75% и в двете групи.

Анализът на крайните резултати от проведения цикъл на лечение са демонстрирани в табл. 16:

Табл. 16. Основни данни за изхода от лечението

тютюнопушене	да	не
канселирана след пункция		
брой	112	77
%	20%	18%
приключила с трансфер		
брой	325	258
%	60%	62%
приключила с трансфер и замразяване		
брой	70	50
%	11%	12%
приключила със замразяване		
брой	50	31
%	9%	8%

Данните демонстрират хомогенност и в двете групи. Подобни са и резултатите от постигнатите клинични бременности, демонстрирани на фиг. 44:



Фиг. 44. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

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

Дискусия:

Тютюнопушенето е обявено от СЗО за една от най-големите заплахи за общественото здраве, поради факта, че годишно умират над 8 милиона души от последици, свързани с активно или пасивно пушене. Съдържащите се в стандартните цигари за масова употреба въглероден оксид, азотен оксид, бензол, никотин, метанол са с доказана клетъчна токсичност.

В статия в сп. *Reproductive toxicology* авторите изследват нивата на бензо[а]пирен и други полицикличните ароматни въглеводороди (ПАВ) във фоликулярната течност на жени пушачки и установяват значително по-високи стойности в сравнение с непушещи пациентки (Neal, Zhu, & Foster, 2008). Наличието на токсини като ПАВ във фоликулярната течност кара авторите да предполагат негативното им влияние върху фоликулогенезата.

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 (Ozbakir & Tulay, 2020). 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

Базовите серумни нива на хормона FSH са дългогодишен индикатор за състоянието на яйчниковият резерв. Редица изследвания обаче отчитат влиянието на повишеното му

количество директно върху овоцитното качество и респективно върху репродуктивните резултати.

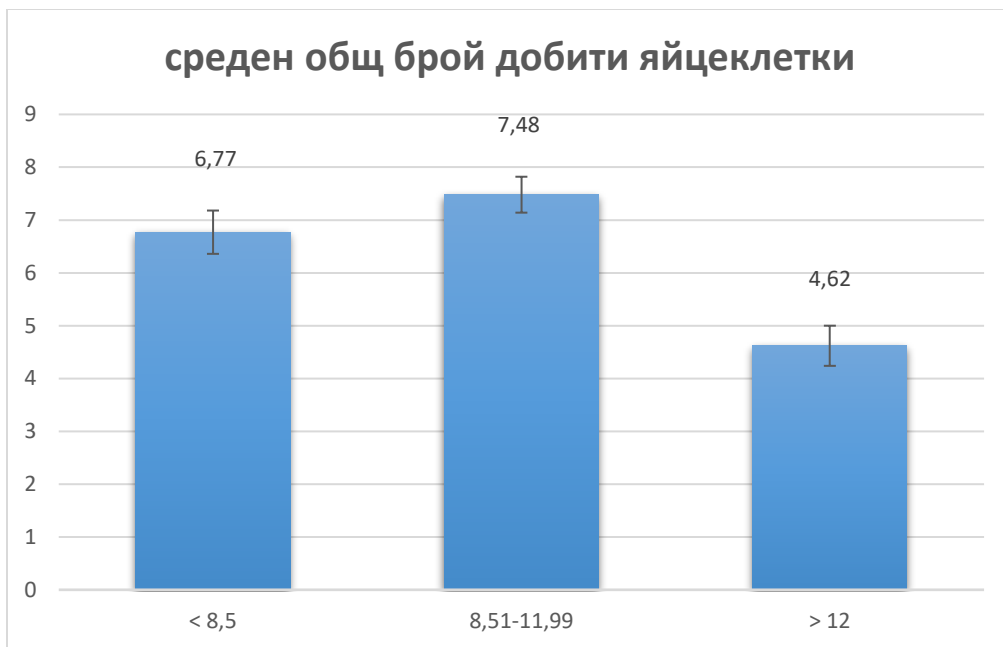
В това изследване сме анализирали резултатите на 411 пациентки, за които има данни за базалните серумни нива на FSH при стартиране на хормонална стимулация за целите на АРТ, разпределени в 3 групи в зависимост от конкретните стойности: група 1: (под 8,5 IU/l) n= 103, група 2: (от 8.51 до 1.99 IU/l) n=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

При отчитане на средният брой добити яйцеклетки след КОХ бяха получени следните резултати, демонстрирани в табл. 17:

Табл. 17. Основни статистически данни за добитите яйцеклетки в различните групи

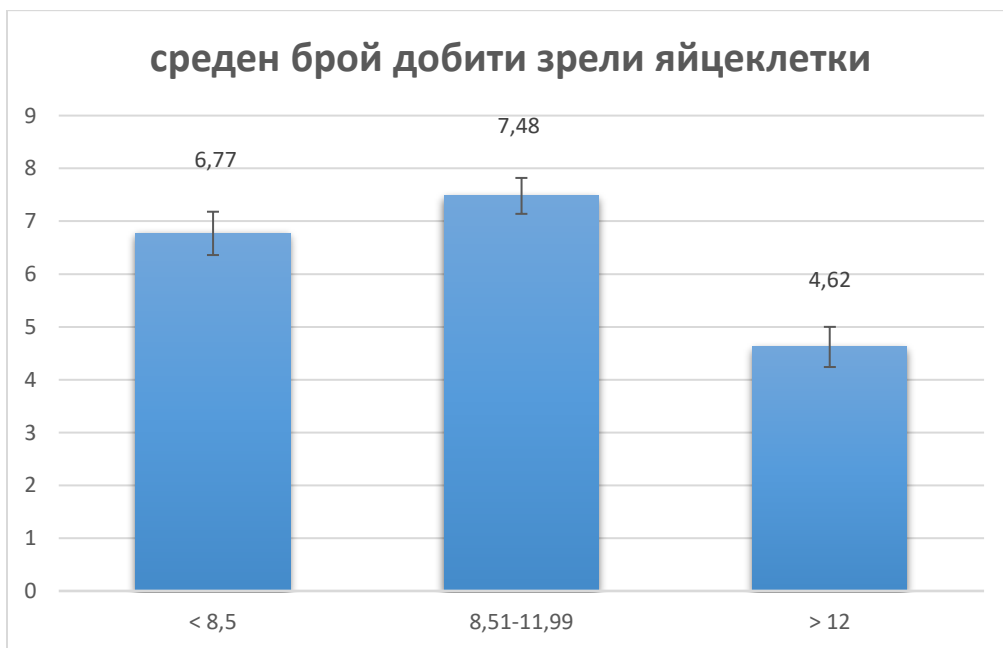
общ брой яйцеклетки					
FSH	n	мин.	макс.	среден брой	SE
< 8,5	697	0	27	6,77	0,48
8,51-11,99	1579	0	27	7,48	0,43
> 12	448	0	26	4,62	0,44

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. 45):



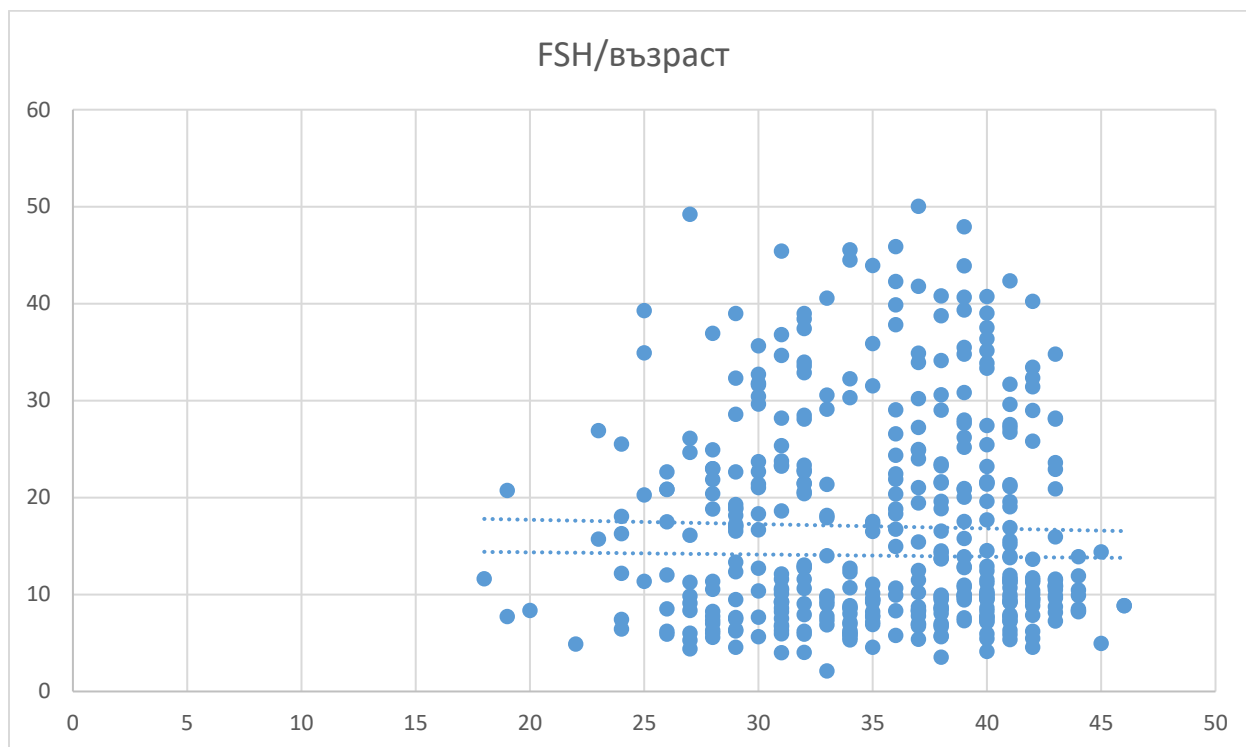
Фиг. 45. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните групи

Аналогични са данните относно делът на зрели яйцеклетки в различните групи (фиг. 46). Затвърждава се тенденцията за понижен брой яйцеклетки при завишени нива на FSH над 12 IU/L.



Фиг. 46. Среден брой МП яйцеклетки в различните групи

По отношение на връзката между възрастта на лекуваните жени и техните FSH стойности анализирани данни и резултатите са представени графично на фиг. 47:



Фиг. 47. Корелационна зависимост между възраст и стойности на FSH.

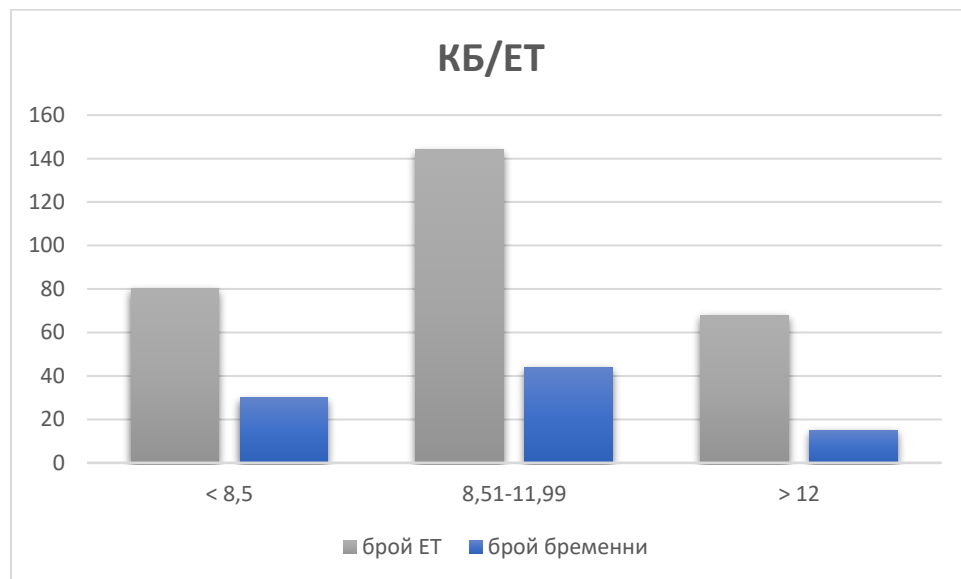
Анализът на параметричният корелационен коефициент между тези 2 фактора отчете взаимозависимост между увеличаващата се възраст на пациентките и стойностите на техните базални серумни нива на FSH.

Финалните резултати от проведеното лечение показват някои закономерния различия в отделните изследвани групи (табл. 18):

Табл. 18. Основни данни за изхода от лечението

FSH	< 8,5	8,51-11,99	> 12
канселирана след пункция			
брой	16	42	26
%	15%	20%	27%
приключила с трансфер			
брой	72	121	65
%	70%	57%	67%
приключила с трансфер и замразяване			
брой	8	23	3
%	8%	11%	3%
приключила със замразяване			
брой	7	25	3
%	7%	12%	3%

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. 48):



Фиг. 48. 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) (Н. Xu, Deng, Luo, Chen, et al., 2016) 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

Възпалителните заболявания на женския репродуктивен тракт са свързани с редица изменения в интрафоликулярната среда, като понижена ароматазна експресия на P450 и повишена интрацелуларна концентрация на реактивни свободни радикали. Редица литературни данни докладват за отражение на възпалителните процеси върху биологичните характеристики на яйцеклетките, но резултатите, засягащи клиничната значимост са противоречиви (Юнакова и съавт., 2016).

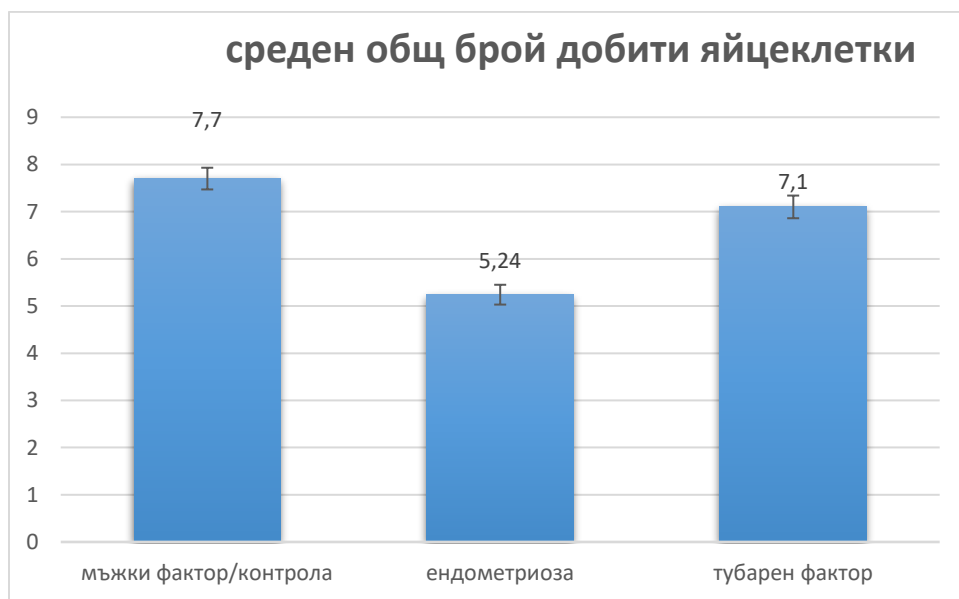
За да установим има ли корелация между продукцията на овоцити, оплождането и имплантационния потенциал при жени, засегнати от ендометриоза и ТВБ, изследвахме постигнатите резултати от лечение чрез АРТ на жени с диагностицирана ендометриоза и ТВБ и ги сравнихме с пациентски двойки с мъжки фактор като контролна група.

Основните статистически данни са изложени в табл. 19:

Табл. 19. Основни статистически данни за добитите яйцеклетки в различните групи

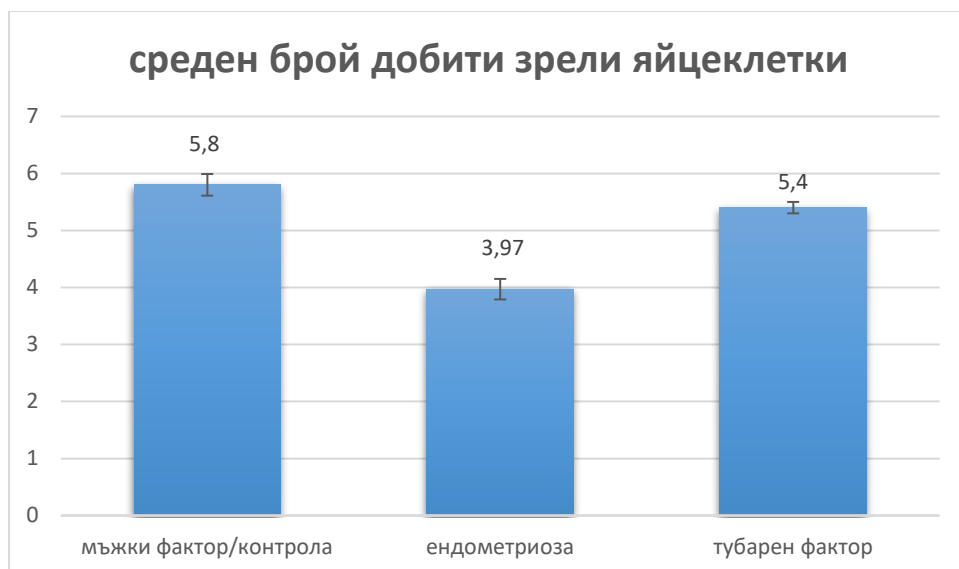
общ брой яйцеклетки					
	п	мин.	макс.	среден брой	SE
Ендометриоза	2471	0	28	5,24	0,21
Тубарен фактор	15693	0	45	7,1	0,24
Мъжки фактор - контрола	4408	0	32	7,7	0,23

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. 49).



Фиг. 49. Съотношение между средния брой добити яйцеклетки в различните групи

Аналогични са и резултатите, когато сравняваме дела на средния брой добити годни за оплождаване яйцеклетки. Отново се установява статистическо различие както при сравняване на отделните две групи с контролата така и между самите изследвани групи ($p < 0,01$) (фиг. 50).



Фиг. 50. Среден брой МП яйцеклетки в различните групи

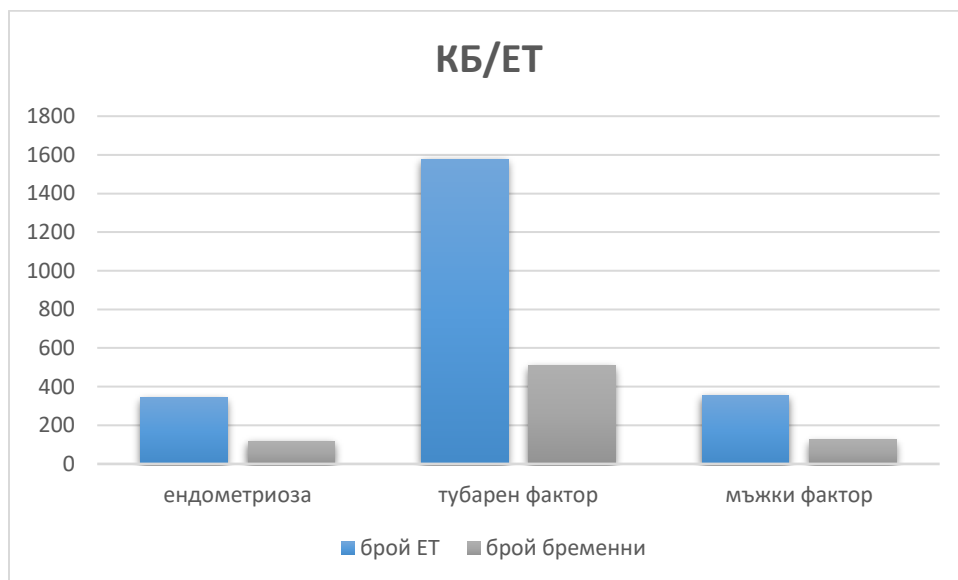
Резултатите от проведените цикли са изложени в табл. 20:

Табл. 20. Основни данни за изхода от лечението

	ендометриоза	тубарен фактор	мъжки фактор
канселирана след пункция			
брой	104	404	134
%	23%	18%	23%
приключила с трансфер			
брой	309	1288	291
%	65%	59%	51%
приключила с трансфер и замразяване			
брой	35	290	65
%	7%	13%	12%
приключила със замразяване			
брой	24	219	82
%	5%	10%	14%

И 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 ¼ 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. 51:



Фиг. 51. 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 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:

Ендометриозата и ТВБ са комплексни заболявания, засягащи в различна степен и тежест жените в репродуктивна възраст. Основните поражения върху репродуктивната система рефлектират върху фоликулогенезата, състава на фоликулярната течност и нарушена кинетика на клетъчния цикъл на гранулозните клетки.

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 (Younis, 2022). В статията авторите отбелязват, че възпалителните процеси в малкия таз променят

нормалната среда на фоликуларната 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. 21).

Табл. 21. 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%

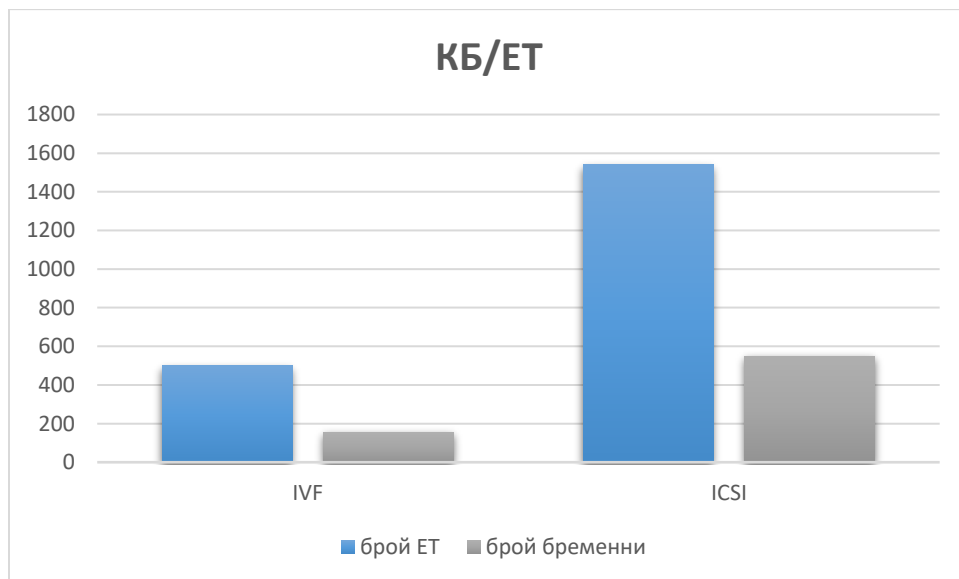
При сравнение на средният процент оплодени яйцеклетки, не се отчитат сигнификантни разлики ($p = 0.1443$). Неоплодените яйцеклетки са 22,5% и 26% съответно за ICSI и за IVF процедурата. Дегенериралите след инжектиране овоцити (damage) са 2,5%.

По отношение на крайните резултати, данните също показват сходство при двете процедури (табл. 22):

Табл. 22. Основни данни за изхода от лечението

	IVF	ICSI
канселирана след пункция		
брой	133	513
%	20%	23%
приключила с трансфер		
брой	400	1406
%	60%	63%
приключила с трансфер и замразяване		
брой	100	134
%	15%	6%
приключила със замразяване		
брой	33	178
%	5%	8%

Не бяха отчетени статистически разлики по отношение на процента канселирани цикли поради липса на оплождане или неразвиващи се ембриони. Данните за установените бременности след прилагане на двете процедури са демонстрирани на фиг. 52.



Фиг. 52. 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:

Лабораторните процедури са фактори, които оказват директно влияние върху яйцеклетките. Една от най-инвазивните манипулации, които овоцитите претърпяват по време на цикъла си на оплождане в лабораторни условия, е инжектирането със сперматозоид посредством микроманипулация. При отчитане на оплождане на 18ти час, се отчита и процент дегенерирани овоцити след ICSI.

Докато класическата IVF процедура е по-физиологичният метод, свързан с по-малко манипулации върху гаметите, при ICSI методиката съществуват рискове на няколко етапа от разрушаване на овоцита. В най-големия си процент това се получава след проникването на инжекционната пипета и скъсването на оволемата. Данните от нашето проучване демонстрират пренебрежимо нисък процент дегенерирани 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 (Seviren et al., 2014) (Reproduction et al., 2021). Съвременните публикации напълно затвърждават нашите резултати (Maggiulli et al., 2020) и изваждат тази лабораторна процедура от списъка с фактори, които повлияват качеството на овоцитите и крайният резултат от лечението.

Криоконсервация

Първоначалните опити за използване на замразени посредством програмно бавно замразяване овоцити за целите на АРТ са свързани с висок риск те да не преживеят цялата процедура по размразяване и замразяване. Поради тази причина факторът криопрезервация присъства като значим такъв засягащ качеството на овоцитите. След навлизането на метода витрификация и неговото масово прилагане особено в последното десетилетие данните за неговото влияние се променят. 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.

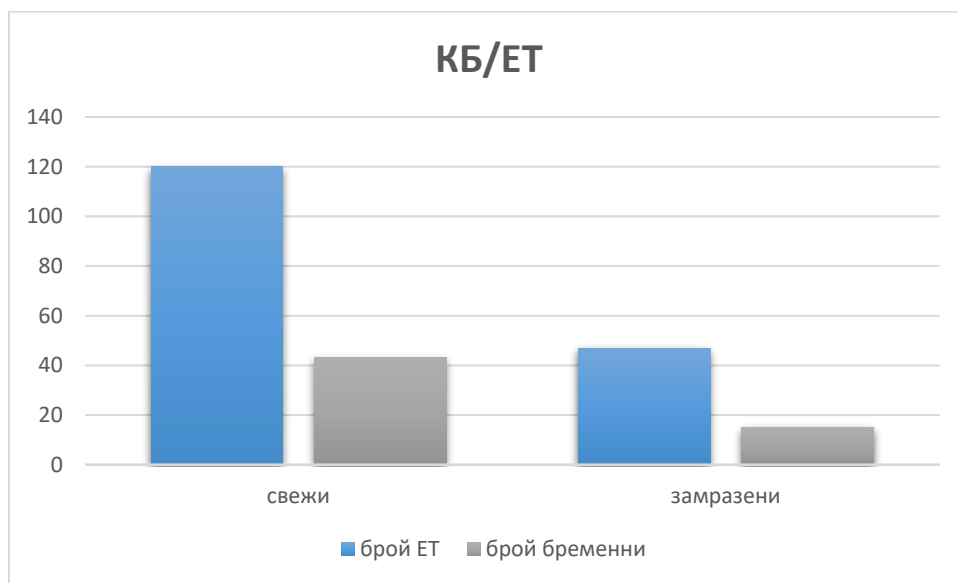
След размразяване по протокол, са отчетени 208 преживели от 213 размразени – 98% survival rate (SR). Основните данни са представени на табл. 23:

Табл. 23. Основни статистически данни

общ брой яйцеклетки					
	п	мин.	макс.	среден 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. 53) – 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. 53. Клинични бременности спрямо ембриотрансфер

Дискусия:

Методиките по криопрезервация на гамети и ембриони навлизат в лабораторната практика години след първите успешни ин витро опити. Докато при замразяване на сперматозоиди

и ембриони техниките бързо стават рутинни, криоконсервацията на овоцити не води до толкова добра успеваемост. Това се променя с бързи темпове след въвеждане на метода витрификация, при който резултатите при работа с яйцеклетки са значително по-успешни и сравними с тези, при които са използвани свежи такива. Публикациите от последните години дават предимство на витрификацията (Hirsch et al., 2023) като методика и не се установяват разлики при лечението на пациентки със свежи или замразени овоцити (Levi Setti et al., 2014). Други съвременни публикации не отчитат влияние на витрификацията върху качеството на яйцеклетките (Chang, Shapiro, & Nagy, 2021). Нашите резултати напълно кореспондират с литературните данни по темата и са доказателство за отлично работещата методика и добрата подготовка и опитност на ембриолозите и криобилозите в България.

ОБОБЩЕНИЕ:

Редица фактори оказват влияние върху човешките репродуктивни клетки - както външни, от заобикалящата ни среда, така и такива, които са резултат от начина на живот и изборите, които всеки човек прави в ежедневието си. Категоричността и силата на влияние за някои от тях е и трудно измерима. Влиянието на стреса е подобен пример - за него се предполага, че има отношение, но анализът на такъв тип фактор е труден, поради строго индивидуалният характер и субективната преценка на всеки индивид. За други фактори, като замърсеност на въздуха данните идват основно от Китай, където това е изключително тежък проблем, концентрацията на газове и ФПЧ е десетки, дори стотици пъти над нормата и са засегнати не само градове, но и цели географски области - за разлика от България, където условията за живот и замърсеността на въздуха варират в големи граници дори в рамките на един град. Някои от факторите са доказали своето влияние, но броя на пациентите, които са засегнати от него не е достатъчно репрезентативен, както е при пациенти, преминали през химио и лъчетерапия, при които за по-голямо спокойствие и сигурност се предпочита работа с донорски материал, или с гамети, замразени преди пристъпване към лечение на онкологичното заболяване.

Редица изследвания, публикувани през последните няколко години относно факторите, оказващи влияние върху овоцитното качество и потенциал подчертават противоречивите данни за всеки един от тях (Buratini et al., 2021; Sansone, Zaami, Cetta, Costanzi, & Signore, 2021) и насочват вниманието към тяхното синергично въздействие (Amanda Souza Setti, Halpern, Braga, Iaconelli, & Borges, 2022). В действителност в клиничната практика при оценка на прогнозите за изход от лечението е необходимо да се извърши цялостен анализ и да се вземат предвид всички фактори, които са с потенциален ефект.

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 **cancelation 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.

При изследването на някои фактори, като ендометриоза и ТВБ се откриват сигнификантни зависимости по отношение на средния брой добити яйцеклетки, но не и при отчитане на процента получени бременности. За тях са необходими допълнителни изследвания и разделяне на подгрупи, в зависимост от тежестта и стадия на заболяването, както и

елиминиранието на влиянието на фактори като възраст и брой добити яйцеклетки, като определящи изхода от ин-витро процедурите.

За редица други – като ICSI методиката например, които демонстрират по-добри, макар и не статистически значими резултати от контролата, е време да се категоризират като фактори с историческо, но не и със съвременно значение. Този метод на оплождане вече е широко предпочитан в световен мащаб и в някои държави достига нива 70-100% от всички цикли (European IVF Monitoring Consortium et al., 2022).

Ембриологията е постоянно развиваща се наука, в която непрекъснато се внедряват нови технологии и те променят условията на работа и постигнатите резултати (Милачич, 2020). В последните години усилено се работи по проблема с „остаряването“ на яйцеклетките, като различни екипи разработват няколко методики – апликация на стволови клетки, нуклеарен трансфер, по-богати хранителни среди и т.н. Поради тази причина и факторите, които оказват влияние са динамична величина, която има нужда от постоянно тестване и осъвременяване.

V.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.

Още първите години след навлизането на ин витро методиката в медицинската практика са започнали и изследванията на различните фактори, които могат да окажат въздействие върху цялостния цикъл на лечението, включително и върху качеството на яйцеклетките. Много скоро след това начало с натрупване на брой пациенти, преминали през цикли на ин витро оплождане, се откроява възрастовият фактор като водещ предиктор за успеха от лечението. С течение на времето са докладвани от различни екипи и редица други фактори с потенциално значение. В наши дни в научната литература са представени изследвания върху десетки фактори от всички аспекти на съвременния живот, като постоянно се публикуват нови статии и клинични проучвания от стотици изследователски научни екипи, лаборатории и университети. Поради тези причини има необходимост от систематизацията на факторите, обект на проучване от съвременните изследователи, повлияващи овоцитното качество в обобщен вид.

В научните публикации най-общо тези фактори са разделени на 2 основни групи – с външно и с вътрешно влияние. В един от основните препоръки за добра лабораторна практика – Виенският консенсус от 2017г. ("The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators†‡," 2017) факторите с вътрешно влияние са наречени още пациент-специфични и към тях са класифицирани възраст, ИТМ, лайфстайл фактори и тип инфертилитет. Към външните са причислени овариална стимулация, лабораторни процедури (ПФ, денудация, подготовка за ICSI, криопрезервация), условия на култивиране (температура, рН, рО₂), условия в лабораторията (светлина, качество на въздуха, влажност), културални условия.

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

Екстрапулация на факторите в табличен вид

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 (оригинални проучвания, обзорни статии, учебници, мета-анализи, систематични прегледи, препоръки), нашият екип трансформира литературните данни в табличен изглед на основните фактори с външно и вътрешно влияние (табл. 24), 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

В настоящият табличен изглед са включени както многократно изследвани и добре известни фактори, така и такива, за които няма много описани случаи или не толкова популярни – като изследване на влиянието на раковите заболявания (Fabiani, Ferrante, et al., 2022), физическата активност (Ferreira et al., 2010; Olaso et al., 2023), начин на хранене (Gonnella et al., 2022), метаболитен синдром (Cardozo, Pavone, & Hirshfeld-Cytron, 2011), токсини от околната среда (Jain & Singh, 2022; Jeelani et al., 2018) и др.

Табл. 24. Фактори, влияещи върху качеството на яйцеклетките

ФАКТОРИ ВИЛЯЕЩИ ВЪРХУ КАЧЕСТВОТО НА ЯЙЦЕКЛЕТКИТЕ	
ФАКТОРИ С ВЪТРЕШНО ВЪЗДЕЙСТВИЕ (ПАЦИЕНТ СПЕЦИФИЧНИ)	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

Дискусия:

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 и контрол върху някои заболявания, имащи отношение към фертилитета, подлагането на хирургични интервенции ако това е нужно преди започване на процедурата и т.н.

Прави впечатление, че от изнесените данни като фактори с изключително важно значение се открояват добрите условия в ембриологичната лаборатория – както поддържането на оптимални параметри в инкубаторите, в които се отглеждат гаметите и ембрионите, така и строгия контрол на условията в самата лаборатория, най-вече по отношение на качеството на въздуха, избягване на светлинно облъчване и влажност. Ето защо добрите лаборатории за асистирана репродукция трябва да разполагат с мениджър по качествения контрол, за когото е приоритет следенето на всички важни параметри и снабдяването на лабораторията с най-новите и ефективни продукти за контрол, мониторинг и пречистване.

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 готов продукт на пазара – ChatGPT (Open AI) с неговата премиум версия - GPT-4, реализирана през месец март 2023 г. Новата версия се отличава със значително обогатена и усъвършенствана база данни в областта на медицината и отваря нови възможности за работа в насока подобряване на методите за лечение във всички области на здравеопазването (Lee, Goldberg, & Kohane, 2023; Waisberg et al., 2023).

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:

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. Асистираните 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

Дискусия:

Използването на съвременните технологични достижения и частност изкуственият интелект е от критично значение за бъдещето на асистираните репродуктивни технологии и на медицината като цяло. Въпреки че се намираме на все още ранен етап от прилагането на тези технологии в ежедневната клинична практика, в близките няколко години се очаква значителен напредък и усъвършенстване на вече предлаганите софтуерни AI

модели, както и разработка на следващо ниво такива. В момента в редица изследователски центрове се разработват продукти на базата на изкуствен интелект, които да се интегрират както в ин витро лабораториите, така и в клиничната част от лечението на пациенти с инфертилитет. Медицината и иновациите в лечението са сред топ приоритетите на следващото поколение AI.

Навлизането на изкуствения интелект във всички сфери на живота е безспорен факт и неделима част от бъдещето. 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. Най-много AI разработки има при системата за оценка както на ембриони, така и на яйцеклетки – на пазара вече се предлагат редица обучени AI софтуерни продукти, оценяващи и приоритизиращи определени ембриони и овоцити с най-висок потенциал за имплантация. Друга област, в която активно се работи е генерирането на индивидуални стимулационни протоколи с прецизирани дози от определени хормонални препарати за стимулация с цел добиване на оптимален брой яйцеклетки.

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.

ОБОБЩЕНИЕ:

Редица фактори оказват въздействие върху качеството на човешките овоцити. За някои от тях има доказано безспорно влияние, като възрастта, химио- и лъчетерапията, излагане на радиация, работа без защитни средства с пестициди и т.н. За други фактори все още продължават да се публикуват противоречиви данни, затвърждаващи или отричащи тяхното въздействие, като тютюнопушене, замърсеност на въздуха, употреба на алкохол, някои заболявания и т.н. При тях в повечето случаи авторите подчертават, че са необходими допълнителни по-детайлни изследвания, в които да се специфицира количеството на агента, който има потенциално въздействие, или степента и тежестта на съответното заболяване.

Въпреки че в научната литература най-голям брой публикации и най-задълбочено са изследвани факторите с предполагаемо **негативно въздействие**, в последните години се наблюдава промяна в тенденцията. Това е наложено от различният профил на жените, обръщащи се за лечение към клиниките по инфертилитет – средната възраст се покачва със всяка изминала година според данните от националните регистри на редица

европейски държави (Verona et al., 2020) и вече достига до средни стойности от над 36 г. по данни на HEFA, регулаторът във Великобритания. Това налага насочване на усилията към търсене на методи, чрез които да се постигне „подмладяване“ на яйцеклетките при по-възрастни пациентки. Ето защо актуалните публикации и изследвания са насочени и към факторите, оказващи **позитивно въздействие** и които потенциално биха могли да подсилат митохондриалната активност и редуцират грешките при асоциирането на мейотичното вретено. Поради тази причина широко изследвани вкл. и от нашия екип са приема на суплементи, които биха могли да подобрят овоцитното качество и съответно резултатите от лечението (268). Редица данни посочват приема на Коензим Q10 (Ma et al., 2020; Rodríguez-Varela & Labarta, 2021), мио-инозитол (Unfer, Raffone, Rizzo, & Buffo, 2011) мелатонин (Tamura et al., 2008), ресвератрол (Pasquariello et al., 2020; Sun, Tang, Shen, Yin, & Sun, 2019) и т.н. за потенциални активатори на митохондриалната активност на овоцитите и силно антиоксидантно действие, редуциращо вредното влияние на свободните радикали.

В някои случаи факторите могат да имат двупосочно въздействие. Такъв пример са хранителните навици – при недोхранване или лоша диета ефектът е негативен върху качеството и овариалния отговор (Gonnella et al., 2022), докато при добре балансирано разнообразно хранене могат да се отчетат позитиви. Редица статии препоръчват Средиземноморската диета като най-оптимален вариант и имаща отношение към подобреното качество на гаметите и ембрионите (H. Sun et al., 2019). В мета-анализ, публикуван 2022 г. авторите обобщават резултатите от 11 статии по темата и потвърждават силната позитивна връзка между Средиземноморската диета и резултатите от лечението на инфертилитет (Muffone, de Oliveira Lübke, & Rabito, 2022).

В заключение би могло да се подчертае, че въпреки, че някои от факторите не подлежат на промяна и корекция, при други е напълно възможно намаляване и дори елиминиране на тяхното негативно въздействие. Избягването на вредни навици и неблагоприятна обкръжаваща среда, професионални вредности, както и поддържането на здравословен начин на живот свързан с балансирано хранене, поддържане на нормално тегло и умерена физическа активност, прием на подходящи суплементи биха увеличили шансовете за постигане на успешна бременност след лечение чрез АРТ (Braga et al., 2015; Ferreira et al., 2010; Amanda Souza Setti et al., 2022).

V.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.

Броят на населението с репродуктивни проблеми продължава да нараства в световен мащаб, главно поради по-късната възраст, на която двойките решават да имат деца, модерният начин на живот, предразполагащ заседналост, натрупване на излишни килограми и лоша диета, както и концентрацията на населението в големи градове със силно замърсен въздух. Поради тази причина мястото на АРТ технологиите в съвременната медицина нараства всеки ден. Въпреки това и въпреки разработването на все по-ефективни и прецизни техники, успеваемостта при АРТ остава сравнително ниска, варирайки между 25% и 35% (De Geyter et al., 2020), като в последните години се забелязва плато и дори понижение в процента постигнати бременности на цикъл (European IVF Monitoring Consortium et al., 2022). Поради причината, че качеството на овоците определя до голяма степен потенциала за ембрионално развитие, тази силно диференцирана клетка заема изключително важно място в изследванията за подобряване на резултатите при лечение на инфертилитет. Обикновено качеството на овоцитите се оценява визуално чрез морфологични критерии под инвретен 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 (Lemseffer, Terret, Campillo, & Labrune, 2022). 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 важноста 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.

Морфо-физиологични критерии за оценка

Морфологичните характеристики на яйцеклетката са първият и основен ориентир за нейното качество и потенциал. Благодарение на дългогодишният опит в областта на АРТ технологиите, екипа работещ върху настоящото изследване може да посочи и още един

важен предиктивен белег за по-нататъшната съдба на овоцитите – техните физиологични особености, които демонстрират по време на самото оплождане. Въпреки че не е обект на многобройни изследвания, редица публикации потвърждават важноста на ултраструктурните промени в цитоплазмата по време на зреенето и оплождането, както и еластичността на оволемата по време на пенетрацията на инжекционната пипета (Payeli, 2022; Trebichalská et al., 2020).

Комбинирайки двата фактора, разделихме яйцеклетките в 3 основни групи – А, В и С в зависимост от водещия фактор – морфологията и в 9 подгрупи (А1, А2, А3, В1, В2, В3, С1, С2, С3) според физиологичните им особености, проявени в процеса на интрацитоплазмено инжектиране.

Анализирахме данните от 468 цикъла, при които бяха добити 4127 кумулулно-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 инвертен микроскоп и оценяване на функционалните характеристики при инжектиране чрез микроманипулатор, всички яйцеклетки бяха разпределени в различните групи и подгрупи, демонстрирани на фиг. 54.

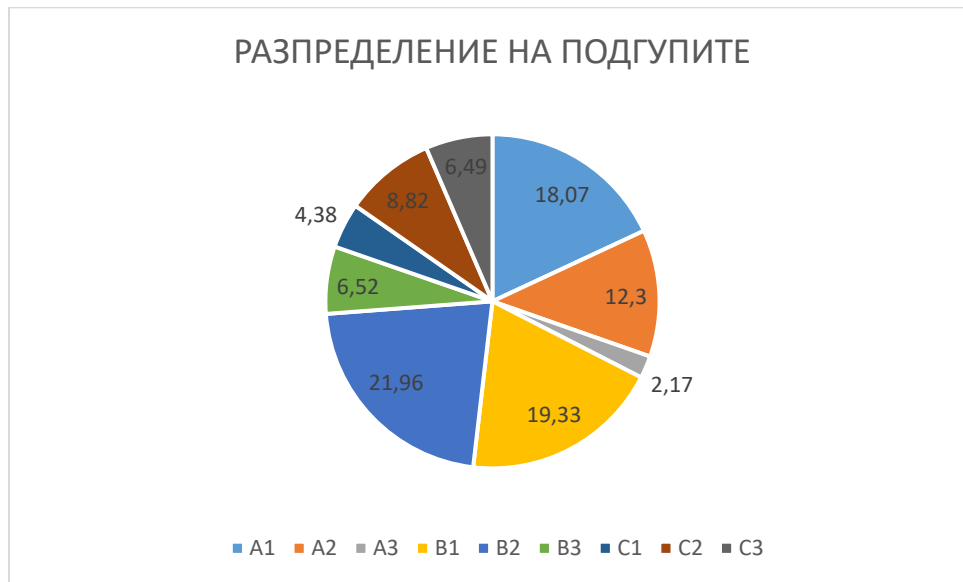
1002 от яйцеклетките (32,5 %) бяха окачествени като тип А, 1474 (47,81%) тип В и 607 (19,69%) тип С.



Фиг. 54. Разпределение на яйцеклетките по групи

Най-висок процент от яйцеклетките са оценени като тип В, т.е. с единична по-силно или по-слабо изразена морфологична особеност.

След прилагане на комбинираният метод за оценка, овоцитите бяха разпределени в 9 различни подгрупи в зависимост от своите морфологични и физиологични характеристики (фиг. 55).



Фиг. 55. Процентно разпределение на подтиповете яйцеклетки

С най-висока честота са оценяваните 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 оценени като най-високият клас А1, при 12,3% се е наблюдавал леко понижен тургур и еластичност и са оценени като А2 и в най-ниския 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

Въпреки множеството данни, докладвани в научната литература за влиянието на възрастта върху овоцитната компетентност, изследванията са основно върху ултраструктурата на митохондриите, стабилността на мейотичното вретено и целостта на цитоплазмения цитоскелет (Armstrong, 2001; Keefe, Kumar, & Kalmbach, 2015). Една от целите на екипа, провеждащ настоящото проучване е да установи съществува ли корелационна зависимост между вътрешните възрастовите изменения в овоцита и неговите външни морфологични и физиологични проявления.

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. 25).

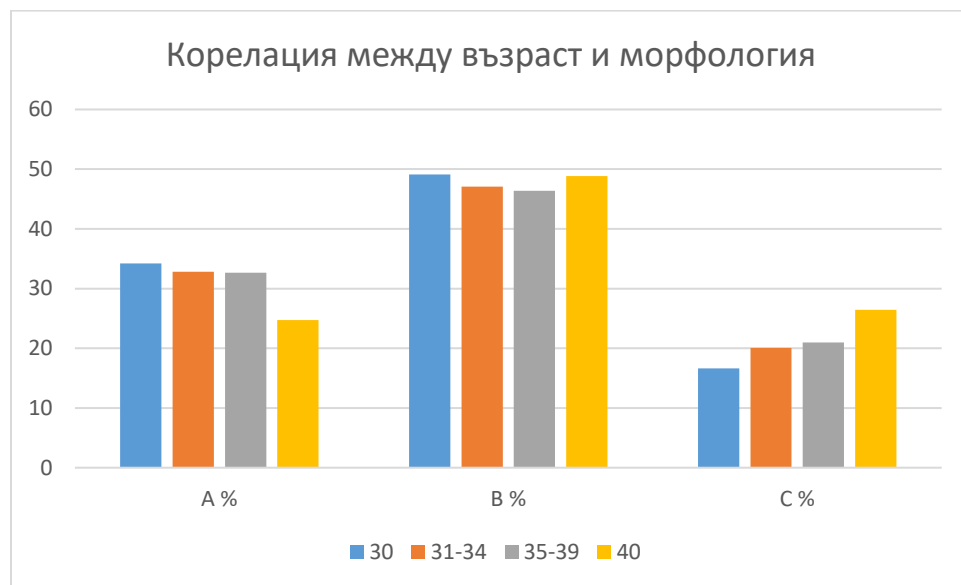
Табл. 25. Корелация между тип и подтип яйцеклетки и възраст

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. 56).



Фиг. 56. Корелация на основните групи и възрастта

Човешките овоцити са силно зависими от митохондриалното окислително фосфорилиране (OXPHOS) за генериране на аденозин трифосфат (АТФ), използвайки пируват, получен от околните кумулусни клетки. От друга страна обаче митохондриите произвеждат по-голямата част от клетъчните свободни радикали и реактивни кислородни видове, които възникват като страничен продукт на OXPHOS (Цјас, Wei, & Homer, 2020). ROS изпълнява важни сигнални функции, но също така е силно реактивен и уврежда основни клетъчни компоненти като ДНК и протеини. Поради това се смята, че митохондриалната дерегулация и повишеният оксидативен стрес са основни двигатели, които са в основата на свързания с възрастта спад в компетентността (или качеството) на яйцеклетките (Maupanloup et al., 2016).

По време на овогенезата женските герминативни клетки натрупват широк спектър от компоненти, които са от ключово значение за ранните етапи на ембрионалното развитие - протеини, иРНК и най-вече митохондриална маса, които насочват и регулират както сложните високо специализирани молекулни процеси на оплождането, така и първоначалните етапи на делене на създадения ембрион. Участието на овоцита в общия процес на стареене е свързано с прогресивното влошаване на плейотропните функции с възрастта, както по отношение на производството на енергия, така и в регулирането на

различните клетъчни сигнални пътища. Стареещият овоцит преминава през редица патофизиологични процеси, които оказват отражение върху повечето клетъчни органели и структури и критичното натрупване на грешки от своя страна въздейства върху морфологичните и физиологичните прояви на клетката.

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 (Weghofer et al., 2019), 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.

Резултати от оплождане

Корелацията между морфологичното качество (Lasienė, Vitkus, Valanėiūtė, & Lasys, 2009; Rienzi et al., 2008) и функционалните характеристики (Danfour & Elmahaishi, 2010; Hiraoka et al., 2012) с фертилизационния потенциал на яйцеклетките все още е дискутабилна тема – при по-голямата част от публикуваните данни се докладва позитивна връзка между изследваните параметри и резултатите от оплождането, но има и публикации, които не откриват такава. Това се дължи най-вече на изследваните параметри, които са разнообразни по своя характер.

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.

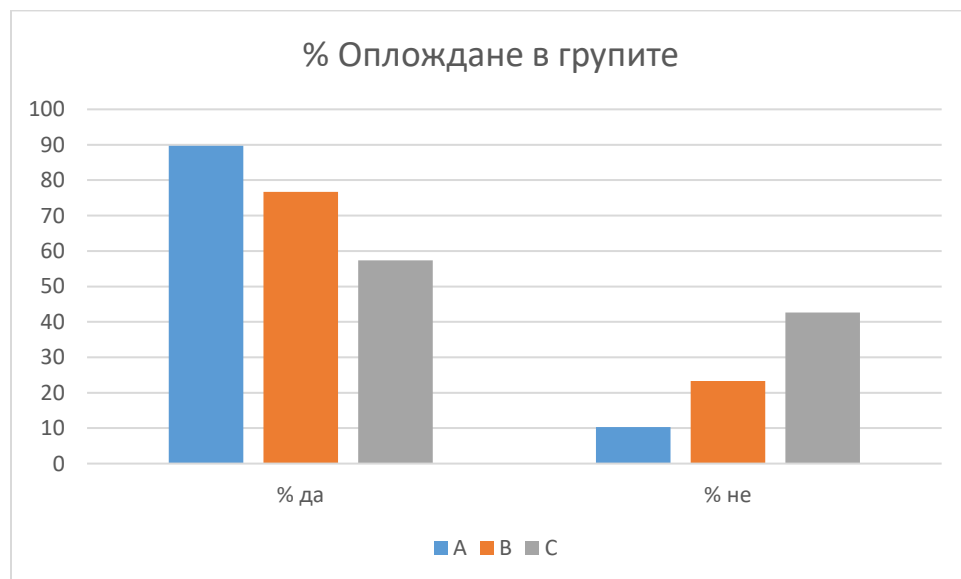
Средните стойности на оплождане, дефинирани от Виенският консенсус варират между 70 и 80%. От направения статистически анализ чрез теста на Kruskal-Wallis се установи, че има ясна статистическа разлика между изследваните групи. Наблюдава се отчетлива тенденция за намаляване на дела на оплодените яйцеклетки с влошаване тяхното морфологично качество (табл. 26).

Табл. 26. 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 гамети. В една от подгрупите – С3, в която са налице най-лошите морфо-функционални параметри, квотата на неоплодените яйцеклетки е по-голяма от оплодените.

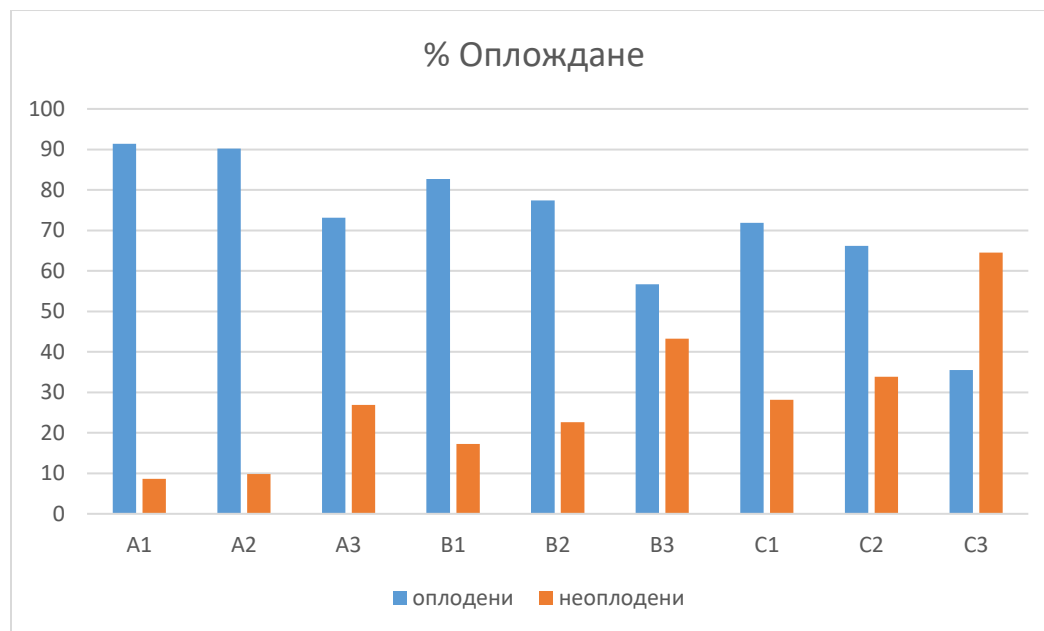
При анализ на трите основни групи, сигнификантни разлики се отчитат във всяка една група. При множествено сравнение по метода на Dunn се доказва различия между всички двойки възрастови групи ($p < 0.05$) (фиг. 57).



Фиг. 57. Оплождане в основните групи

При статистическа обработка на данните в различните подгрупи също се получават интересни резултати. В подгрупата на А тип яйцеклетките не се открива сигнификантна

зависимост между A1, A2 и A3 тип яйцеклетките. В останалите 2 групи обаче – В и С, се отчитат достоверни различия при сравнение на подгрупите ($p < 0,05$) (фиг. 58).



Фиг. 58. Оплождане в подгрупите

Резултатите след проведена процедура по оплождане в лабораторни условия са една от най-критичните стъпки в прогнозата за изхода от лечение. От броя на нормално оплодените гаметите до голяма степен зависи крайният успех и това дали ще е възможно да се осъществи друга важна стъпка от цикъла на ин витро оплождане – селекцията на ембриони.

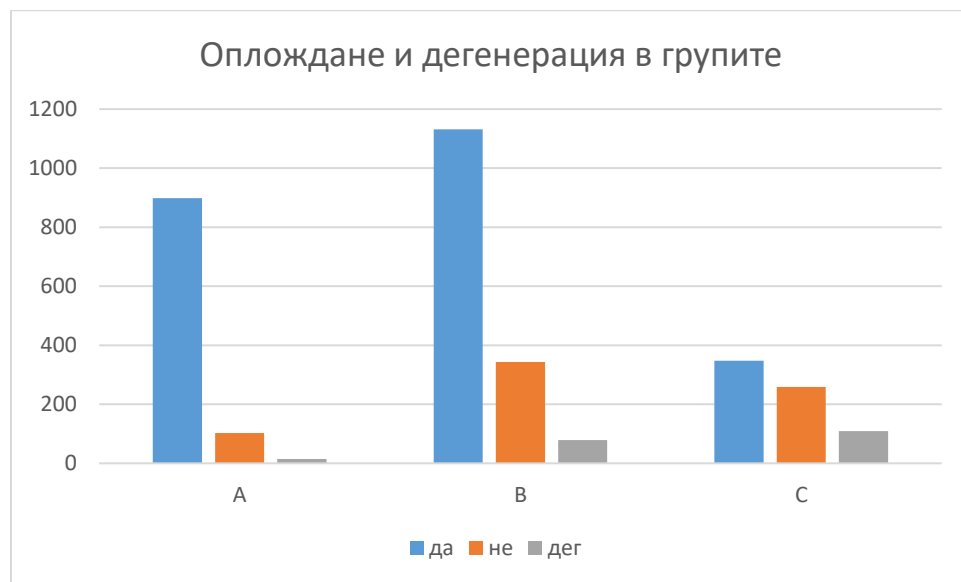
Оплождането е високо специализиран процес, обхващащ широк спектър от събития, които са подчинени на строг регулаторен контрол. Тригерирането посредством гонадотропини на последните стадии на мейотичното зреене, таймирането на овулацията, освобождаването на кортикални гранули и взаимодействието със хаплоидният генетичен набор, донесен от сперматозоида, изграждането на мейотичното вретено на новосъздаденият ембрион са фини процеси, които са силно зависими от редица условия за своето правилно протичане. Наличието на дефекти или дисфункционалност на органелите на яйцеклетката, в които се осъществяват те, води до различни грешки и нарушава правилното протичане на фертилизационния цикъл.

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 дегенерирани след манипулацията гамет. Когато яйцеклетката няма ясни признаци за активация на цитоплазмения и генетичния материал, тя се проследява в 24 часов период за потенциално скрито оплождане или по-късна проява на такова. Когато е налице дегенерация, гаметата е практически неизползваема и се полага на изтегляне и унищожаване. За да установим потенциална връзка между морфо-физиологичните характеристики на овоцита и рискът от дегенерация след ICSI, проследихме и сравнихме процентите дегенерирани яйцеклетки след манипулиране.

В трите основни групи процентът на дегенерациите е съответно: за група А – 1,49%, група В – 5,36% и група С – 17,96%. Резултатите от теста на Kruskal-Wallis сочат силна сигнификантна разлика между всички групи ($p < 0,001$) по отношение на дела на дегенерирани след ICSI яйцеклетки (фиг. 59).



Фиг. 59. Оплождане и дегенерация в основните групи

На табл. 27 е представено численото и процентно изражение на оплождането на яйцеклетките в различните подгрупи и дела на дегенериралите след манипулацията:

Табл. 27. Процентно разпределение на дела оплодени, неоплодени и дегенерирани след инжектиране яйцеклетки

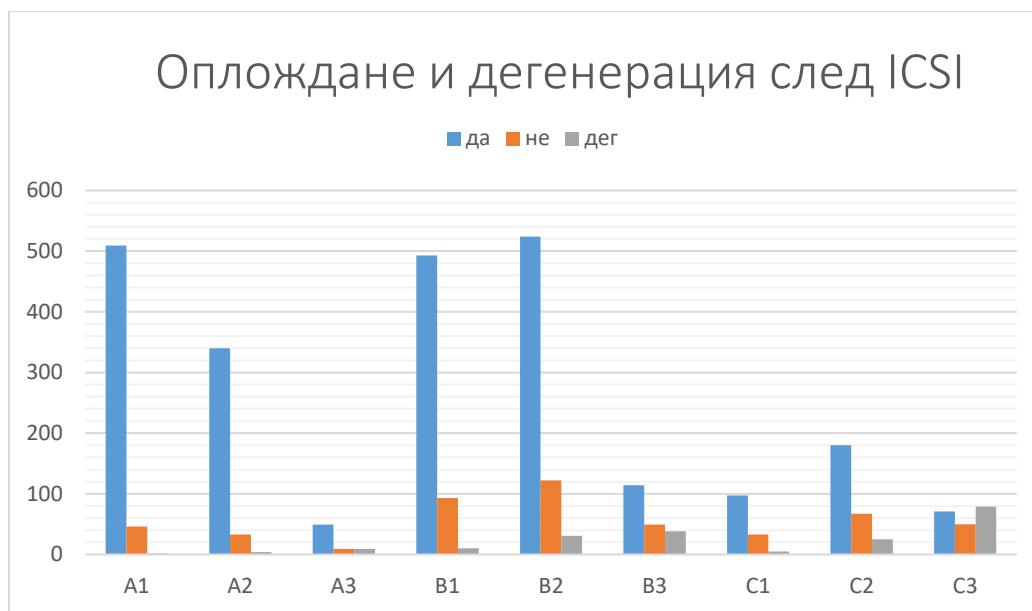
	оплодени	неоплодени	дегенерирали	общо	% дегенерирали
A1	509	46	2	557	0,36
A2	340	33	4	377	1,1
A3	49	9	9	67	13,43
B1	493	93	10	596	1,68
B2	524	122	31	677	4,58
B3	114	49	38	201	18,91
C1	97	33	5	135	3,7
C2	180	67	25	272	9,19
C3	71	50	79	200	39,5

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 пенетрацията 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 множествено 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. 60).



Фиг. 60. Оплождане и дегенерация след инжектиране

ICSI методиката е въведена през 90-те години на миналия век като едно от най-значителните постижения в полето на АРТ процедурите. Дори и с напредъка в технологията, тази механична микроманипулация носи между 5 до 20% риск от дегенерация на овоцити след прилагане (Ebner et al., 2001). Дегенерацията на овоцитите е често срещано явление, с което се сблъскват всички ембриолози, които извършват процедурата. Обикновено се наблюдава след изваждане на инжекционната игла и се характеризира с изтичане на съдържимото и лизис на гаметата. Също така може да се прояви на следващия ден, когато при отчитане на оплождане се установява потъмняла цитоплазма. В някои тежки случаи степента на дегенерация може да достигне високи проценти и когато са налице малък брой добити яйцеклетки да достигне 100% и по този начин да се компрометира цялата процедура. В първите години след въвеждане на ICSI методиката са отчитани високи нива на дегенерация, които се обясняват с неопитността на операторите и несъвършенствата на микроманипулаторните микроскопи и иглите, с които се осъществява пенетрацията. В наши дни човешкият фактор е с пренебрежима стойност (Rosen et al., 2006), но дори от ръцете на изключително опитни ембриолози се получава определен процент дегенерация (L. Liu, Cai, Li, Jiang, & Ren, 2017), който се дължи на индивидуалните характеристики на яйцеклетките.

Именно физиологичните характеристики са тези, които имат най-голямо отношение към успешното извършване на манипулацията. Това е инвазивна процедура, при която се пробива оволемата и част от цитоплазменото съдържимо се засмуква в пипетата. След приключване на процедурата наличието на инжекционна фуния е индикатор за цитоплазма с добра органелна плътност и здрав цитоскелет. Когато липсва съпротивление

при пенетриране с пипетата, яйцеклетката обикновено е „мека“ с водниста цитоплазма и ригидна мембрана. В тези случаи инжекционна фуния липсва и рискът цитоплазменото съдържимо да изтече и яйцеклетката да лизира е изключително голям.

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 (Krause et al., 2016). Вискозността на клетъчната цитоплазма и еластичността на оволемата са най-важните фактори, които са свързани с този процес. 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.

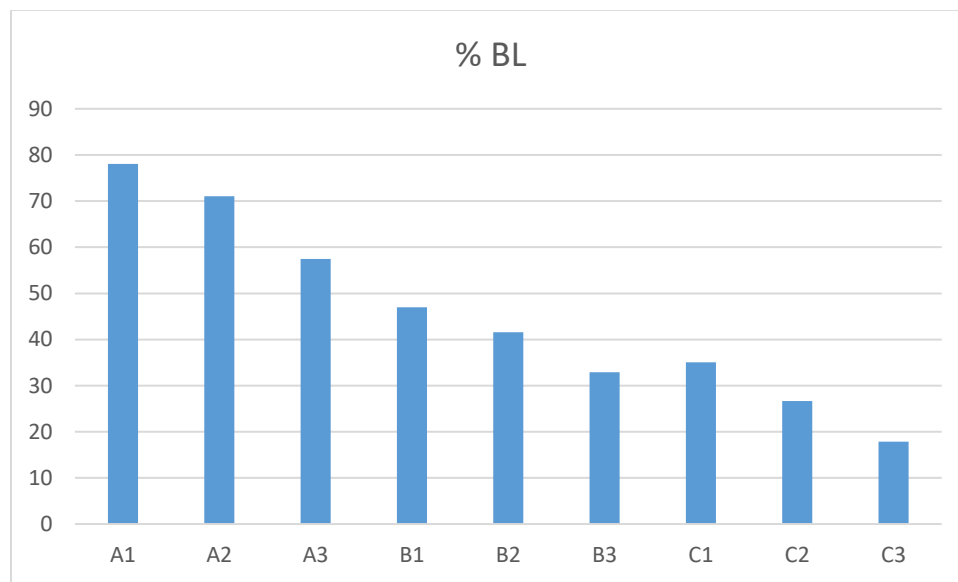
На табл. 28 са представени числените и процентни изражения на достигналите стадий бластоцист от всички ембриони, които са отглеждани до ден 5ти:

Табл. 28. Процент получени бластоцисти в подгрупите

подгрупа	BL	общо BL	Е ден 5	общо Е ден 5	% BL
A1	335	571	429	770	78,08857809
A2	209		294		71,08843537
A3	27		47		57,44680851
B1	195	395	415	914	46,98795181
B2	172		414		41,54589372
B3	28		85		32,94117647
C1	27	73	77	268	35,06493506
C2	36		135		26,66666667
C3	10		56		17,85714286

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. 61).



Фиг. 61. Процент получени бластоцисти в подгрупите

Редица публикации подчертават връзката между морфологията на овоцитите и качеството на генерираните ембриони (Braga et al., 2013). Овоцитното качество е величина, която влияе не само на характеристиките на ембрионите, но и на техният имплантационен потенциал. Продължителното култивиране в лабораторни условия позволява да се извърши по-прецизна селекция на ембриони, защото голяма част от генерираните след оплождане ембриони спират своето развитие на клетъчен стадий, дори и да са демонстрирали добри характеристики на делене. Когато се отглеждат до ден 5, лабораторната оценка на качеството се извършва след като е стартирала генната експресия на ембриона, което се случва на ден 3. Като допълнително предимство някои изследователи посочват постигането на по-добър синхрон между ендометриалната рецептивност и степента на развитие на ембриона, както и намалената контрактилност на матката в сравнение с по-ранни дни (Fanchin et al., 2001).

В систематично ревю и мета анализ на литературата от 2021г., изследователите потвърждават предимствата на трансфера на стадий бластоцист, като отчитат по-високи стойности на развиващи се бременности в сравнение с трансферите на ембрион на клетъчен стадий (Li, Liu, & Lv, 2021).

Един от основните недостатъци на бластоцистния трансфер е, че ограничен брой ембриони имат компетентността да достигнат до този етап и тяхната пропорция е трудно да се прогнозира при конкретен пациент. Поради тази причина в някои центрове се избягва култивирането до ден 5 заради висок риск от стопиране на всички ембриони и канселиране на цялата процедура.

Различни фактори влияят върху потенциала на ембриона. Някои от тях подлежат на контрол и корекции, като субоптималните условия на култивиране в инкубатора и лабораторията като цяло, композицията на хранителните среди и др. (Minasi et al., 2015). Водещият предиктивен фактор за получаване на бластоцистна формация обаче е качеството на овоцита, от който е генериран (Wu et al., 2021). Като се има предвид жизнено важната роля, която яйцеклетката играе в процеса на ранното ембрионално развитие, връзката между нейното качество и капацитетът на ембриона да продължи своето развитие и да формира бластоцист е закономерна.

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. Различните проявления на вътреклетъчната маса и трофектодерма, както и степента на експандираност на бластоцела са свързани с техния капацитет за имплантация (Desai et al., 2016).

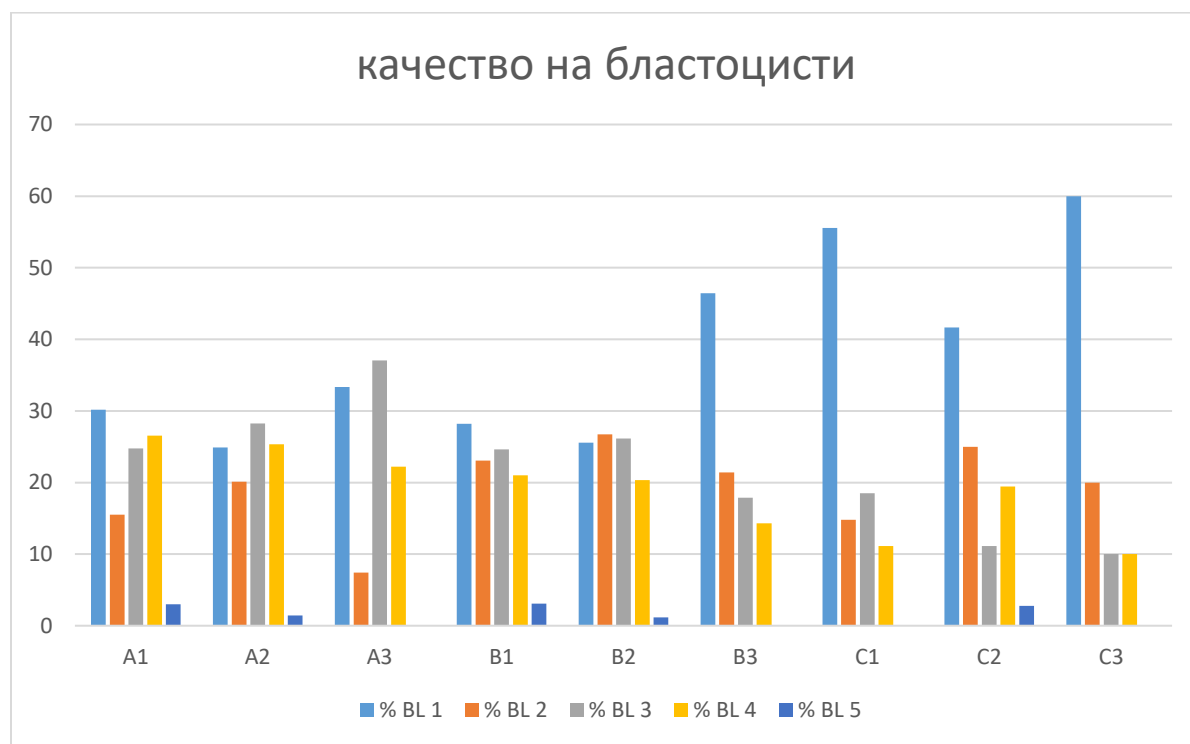
Една от целите на нашето изследване е да свържем морфо-физиологичните характеристики на яйцеклетките и качествените показатели на получените бластоцисти.

На табл. е демонстрирано разпределението на бластоцистите, получени от яйцеклетки с различно качество според оценката им за морфологични характеристики по OVOSCORE. В групите А и В се отчитат съпоставими пропорции на различните стадии бластоцисти, докато при група С почти 50% от бластоцистите на ден 5 са ранни (табл. 29).

Табл. 29. Процентно разпределение на бластоцистите

	% BL				
	1	2	3	4	5
A	28,3713	16,8126	26,62	25,9194	2,27671
B	28,3544	24,557	24,8101	20,2532	2,02532
C	49,3151	20,5479	13,6986	15,0685	1,36986

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 B11 е достоверно по-висок в сравнение с останалите подгрупи ($<0,05$) (фиг. 62).



Фиг. 62. Разпределение на бластоцистите по качество при подтиповете яйцеклетки

Колкото по-високо диференциран е един бластоцист, толкова повече информация може да се получи за неговите структурни характеристики и да се оцени с по-голяма прецизност. Степента на експандираност е само един от критериите за качествен анализ на ембриона,

но той очертава ясно оформящите се ембрионални структури, всяка една от които подлежи на отделна оценка. Съвременните технологии в ембриологичната лаборатория, като мониторирането на ембрионите чрез тайм-лапс, проследява тяхната кинетика в реално време и потвърждава водещата роля на морфологичното оценяване на бластоцистите като най-силен предиктивен фактор не само за тяхната имплантация, но и за техния еуплоиден статус (A. Wang, Kort, Behr, & Westphal, 2018).

Благодарение на тайм-лапс ембриоскопията в последните години след нейното навлизане в рутинната лабораторна практика, са публикувани данни, потвърждаващи силната корелационна зависимост между морфологията на овоцитите, морфокинетиката на ембрионите и качествените показатели на бластоцистите (David K. Gardner & Balaban, 2016). В своя публикация в сп. *Zygote* на университета Кеймбридж, изследователският екип, публикувал резултатите от тайм-лапс проследяването подчертават колко е важна оценката на овоцитите за прогнозирането на бластоцистна формация и препоръчват тя да бъде въведена като един от задължителните критерии в програмите за асистирана репродукция (Faramarzi, Khalili, & Ashourzadeh, 2017).

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

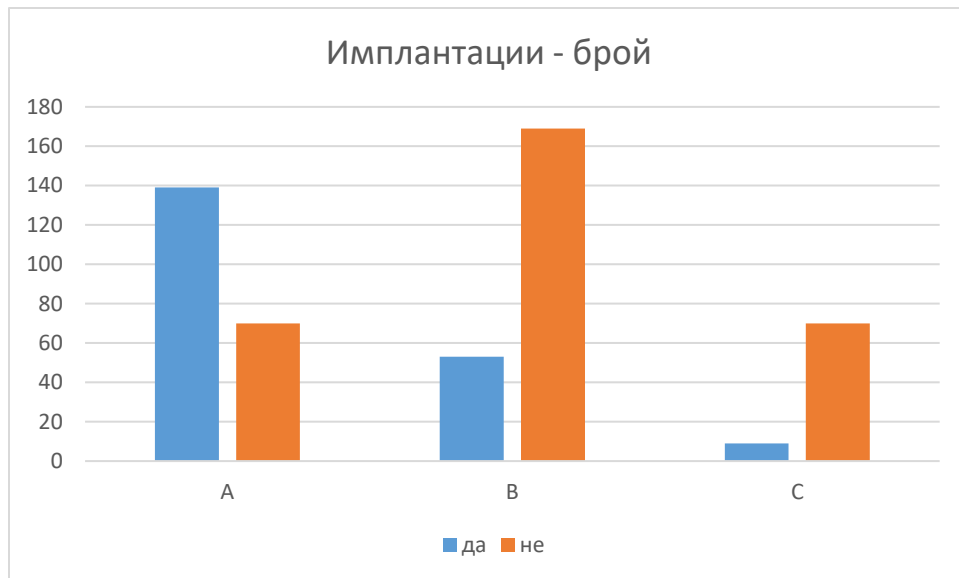
Въпреки че в периода от добиването на яйцеклетката до имплантацията на ембриона настъпват много генерални промени, случват се строго диференцирани процеси и се активира изцяло нов уникален геном, ролята и влиянието на овоцита си остава водеща и детерминира до голяма степен целия цикъл.

С цел да направим връзка между дисморфизмите в яйцеклетката и нейните шансове да даде началото на успешна бременност като ембрион, разгледахме резултатите от проведените цикли асистирана репродукция и в случаите, които е възможно – отчетохме получените имплантации.

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 ($p < 0.0001$) (фиг. 63).



Фиг. 63. Брой и съотношение на имплантациите в групите

При разглеждане на постигнатите бременности в различните подгрупи, тенденцията се запазва същата. Разпределението на броя и процентът имплантации е демонстриран на табл. 30. 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. 30. 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

Морфологичната оценка на овоцитите е важна за ембриолозите, за да идентифицират яйцеклетките с добри характеристики в IVF/ICSI циклите. Дисморфизмът на овоцитите намалява техния потенциал за оплождане и развитие, както и прогнозите за настъпване на клинична бременност и износване на здрав плод. Редица публикации дават данни, че съществува пряка връзка между различни дисморфизми в яйцеклетките и резултатите от лечение чрез методите на АРТ (J. J. Zhang et al., 2020) (Buratini et al., 2023; Amanda S. Setti et al., 2011). В литературата има изнесени и резултати от изследвания, които категоризират като неубедителна силата на прогностичната стойност на морфологичното оценяване на овоцитите за крайния изход от лечението (Fischer, Nguyen, Singh, Baker, & Segars, 2021).

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:

Морфологичните прояви на яйцеклетката са много и най-разнообразни. Те могат да засягат различни органели, структури или отделни участъци на овоцита. Някои от тях са нормални фенотипни вариации, нямащи отношение към качеството, или част от динамичните процеси по съзряване на овоцита. Други параметри, обаче, демонстрират големи качествени изменения от нормалния изглед и са обект на редица изследвания относно тяхното потенциално влияние върху компетентността на женската гамета. В научната литература има публикации за изследвани над 20 различни форми на дисморфизъм и тяхното потенциално негативно въздействие или липса на такова (Ozturk, 2020). В препоръките за оценка и работа с яйцеклетки категоричност има само за 2 от тези прояви – гигантски яйцеклетки и агрегация на гладък ендоплазмен ретикулум. За всички останали дебатът е все още отворен, но становището на екипа на проф. Laura Rienzi е, че това, което има най-съществено значение е кумулативният ефект от натрупването на повече морфологични дефекти, което понижава съществено перспективата на яйцеклетката, която ги носи.

Нашето изследване потвърждава тази теза и добавя към факторите, които допринасят за понижаване на овоцитното качество и физиологичните прояви на яйцеклетката, които демонстрира по време на процедурата по оплождане.

При отчитане на пропорционалното разпределение на яйцеклетките, най-голям дял заеха оценените като тип В, което отговаря на данните, че над 50% от добитите след хормонална стимулация овоцити имат някакви отклонения във външния вид. Резултатите от оплождане показаха сигнификантното влияние на морфологичния фактор върху оплодителния потенциал на овоцита. Рискът от дегенерация извежда на преден план физиологичните особености на яйцеклетките, които са детерминиращи за пропорцията дегенерирани след инжектиране. За процентът на бластоцистна формация също беше установена корелационна зависимост – основно с морфологичните качества, но беше доказано, че и физиологичните характеристики играят роля за развитието на ембриона. При отчитане на процента имплантации се установи ясна пропорционална зависимост между качеството на овоцита и потенциала на генерирания от него ембрион да даде начало на жизнеспособен плод.

Друг основен резултат от проведеното изследване е обвързването на външните характеристики на яйцеклетката с възрастта на жената и проявата на дисморфизъм с всичките генетични и структурни промени, които настъпват в стареещия овоцит. Като cut-off стойност изчислихме възрастта от 40 години, след която пропорцията на овоцити с компрометирано качество нараства сигнификантно.

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.

След провеждане на КОХ в една и съща кохорта яйцеклетки се откриват както такива с добро качество и без видими забележки, така и такива с ясно изразен дисморфизъм. 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 (Vuratini et al., 2023). 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 овоците 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 неколкократно 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 овоците 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.

V.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.

АРТ технологиите продължават да бъдат все още методики със сравнително ниска ефективност – между 20 и 40% клинични бременности след ембриотрансфер. Поради тази причина при много пациенти се налага да се направи втори, трети и т.н. цикъл на лечение докато се достигне желания резултат. Когато има налице и тежък мъжки фактор или лошо качество на яйцеклетките, водещи до по-нисък процент на оплождане, или липса на такова, шансовете за постигане на бременност намаляват драстично. При лечението на пациенти след неуспешен опит, свързан с проблеми с оплождането или лошо качество на получените ембриони може да се приложат различни методики за подобряване на успеваемостта в последващ цикъл. 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. Различните допълнителни процедури в зависимост от индикациите и конкретния случай могат да се приложат на всеки един етап от ембриологичната част – от обработката на сперматозоидите до финалната селекция на ембрионите за трансфер. 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

Калциевата активация е бърза, неинвазивна и лесно приложима методика, която не изисква специализирана апаратура. Поради това и сравнително ниската цена на хранителната среда, съдържаща калциев йонофор е една от най-често прилаганите методики, когато имаме история с ниско или липсващо оплождане в предходен опит на пациентската двойка.

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.

Спермограма в деня на ФП

В деня на фоликулярната пункция при спермограмите на мъжете от партньорските двойки не бяха установени големи амплитуди в семенните параметри при циклите с и без калциева активация (табл. 31).

Табл. 31. Стойности на семенния анализ в деня на ФП

	Normozoospermia	лека Asthenozoospermia	тежка Asthenozoospermia	ОАТ
група 1	3	25	7	9
група 2	1	17	5	7

ICSI и активация с Ca²⁺ ionophore

С цел приложение на методиката, всички яйцеклетки в цикъла с асистирана овоцитна активация бяха подложени на ICSI процедура независимо от параметрите на еякулата в деня на ФП.

Оплождане и развитие на ембрионите

В Група 1 общо 175 зрели МII яйцеклетки са подложени на оплождане. На ден 1 ви 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 Ca²⁺ 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 стационаране 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. 32).

Табл. 32. 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 еднотайчни 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 гаметети.

Дискусия:

Когато при една двойка има установен репродуктивен проблем, е възможно прилагането на различни методики в следващ цикъл, за да бъдат подобрени резултатите и да се достигне до клинична развиваща се бременност. Изборът на конкретна техника зависи от причината, която налага асистирана репродукция. Индивидуалният подход при лечение и персонализираната медицина през последните години се утвърждават като най-успешен метод при прилагане на АРТ. В съвременната ембриологична лаборатория ежегодно се въвеждат нови апаратури, хранителни среди и протоколи, с които се цели да се оптимизират резултатите от оплождане, да се направи по-добра селекция на гаметите, да се получат ембриони с по-добро качество и имплантационен потенциал.

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 (Антонова и съавт., 2019). Наблюдава се подобрение не само в процента на оплодените яйцеклетки, но и в качеството на получените ембриони – в циклите, в които е използван Ca²⁺ 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

Възможността да се наблюдава делителния апарат на яйцеклетката изисква високо специализирана скъпа апаратура, с която не всяка ембриологична лаборатория е снабдена. Основният показател за ефективността на прилагане на тази методика, са резултатите от оплождане и процента на постигнати клинични бременности.

В ембриологичната лаборатория на САГБАЛ „Д-р Щерев“ разполагаме с модерен полоскоп за визуализация на делителното вретено. Това е неинвазивна процедура и се прилага по индикации.

За да отчетем нейната ефективност, 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.

Визуализация чрез полоскоп

След денудация и отстраняване на незрелите яйцеклетки, бяха положени на оценка общо 46 МШ овоцита. Всеки един от тях беше разположен в индивидуална капка хранителна среда в петри със стъклено дъно. С помощта на микроскопия и мониториране, за всяка яйцеклетка се търси къде е разположено делителното вретено, като специализираните лещи отразяват формацията в определени характерни цветове.

Резултати от визуализацията

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. 33). 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. 33. резултати от визуализацията с полоскоп

визуализация SV		не се визуализира
правилна позиция	изместване	
22	9	15

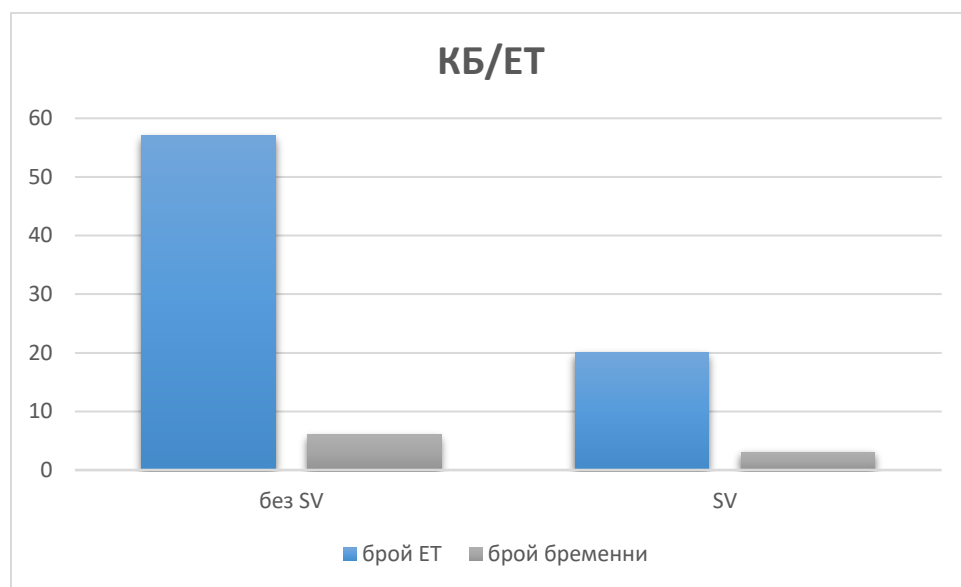
ICSI и оплождане

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. 64).



Фиг. 64. 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 ($p = 0.5949$).

Дискусия:

Човешките яйцеклетки често образуват нестабилни делителни вретена. Микротубулите на овоцитното делително вретено са много често неправилно захванати за мейотичните кинетохори. В резултат на това под въздействие на редица външни фактори често се дисоциират, което е свързано с висок риск от хромозомни аберации (So et al., 2022).

Редицата грешки, които могат да възникнат при структурирането на този сложен механизъм в яйцеклетката са и една от главните причини за нейния понижен фертилизационен потенциал (Thomas, Cavazza, & Schuh, 2021). 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 (Dimitriadis, Zaninovic, Badiola, & Vormann, 2022).

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.

VI. 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 аномално 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.

VII. 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 ≥ 25 кг/м² или затлъстяване ≥ 30 кг/м².
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 овоцита. 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.

VIII. 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 МП 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.

IX. 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. Atretic eggs-frequency and factors which increase their production, Yunakova, M., I. Kostov, N. Magunska, I. Antonova.; HUMAN REPRODUCTION, vol. 36, pp. 411-411. GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND: OXFORD UNIV PRESS, 2021.
3. 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.
4. 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,
5. Съхранение на ооцити за бъдеща асистираната репродукция при жени - Д. Дюлгерова-Николова, И. Антонова, Л. Вълкова, Т. Милачич, Т. Тимева, Списание „Ембриология”(Embryology)/(том 13, книжка 1 за 2023 г.), двуезично издание, ISSN: 1312-7349
6. 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
7. Тютюнопушенето като фактор, влияещ върху качеството и имплантационния потенциал на овоцитите - Антонова И., Юнакова М., Янева Г., Иванов Д., сп. Репродуктивно здраве, бр. 35/2023 г.
8. Хранителни навици и женското репродуктивно здраве – И. Антонова, сп. GP news, бр. 3/2024 г.

9. Лайфстайл фактори, оказващи влияние върху човешката репродукция – И. Антонова, сп. Medinfo, бр. 2/2024 г.
10. 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., Duylgerova-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. 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

I. БИБЛИОГРАФИЯ

ПУБЛИКАЦИИ В ИЗДАНИЯ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК

1. Антонова И, Дюлгерова-Николова Д, Магунска Н, Юнакова М, Милачич Т. Прилагане на асистирана овоцитна активация при пациенти с фертилизационни неуспехи. *Репродуктивно здраве*, 2019, 29: 11-13
2. Антонова И., Юнакова М., Магунска Н., Бояджиев А., Дюлгерова-Николова Д., Иванов Д., Пациент-специфични фактори, влияещи върху качеството и оплодителния потенциал на овоцитите - сп. *Репродуктивно здраве*, бр. 33/2022г.
3. Антонова, М. Юнакова, Н. Магунска, Т. Милачич, Д. Иванов Човешката яйцеклетка – исторически преглед и развитие на асистираната репродукция — сп. *GP news*, бр. , 2020
4. Ковачев Е. и сътр., Диагностично и клинично състояние на преждевременно яйчниково отпадане, сп. *Акушерство и гинекология*, 2003; 42(4):34-8
5. Магунска Н, Антонова И, Бечев Б, Ганева Г, Щерев А, Иванов Ст. Фертилност на жените с овариална ендометриоза подложени на ин витро процедура. *Репродуктивно здраве*, 2016, бр. 24, стр. 9-14.
6. Магунска Н, Бечев Б, Тимева Т, Щерев А, Иванов Ст. Ефективност на методите на лечение на жени с овариална ендометриоза и инфертилитет. *Репродуктивно здраве*, 2016, бр. 24, стр. 21-28.
7. Магунска Н. Ефективност на методите на лечение на инфертилитет при жени с овариална ендометриоза, . Докторат, Варна, 2016
8. Милачич Т, Тончева Д. Предимплантационна (ПИГД) и предконцепционна (ПКГД) генетична диагностика (подглава №33), *Медицинска генетика в постгеномната ера.*, 2010, Симелпрес, София, ISBN 978-954-2918-01-1
9. Милачич Т. Оценка на информативната стойност на генетични и морфологични критерии за предимплантационна диагностика. Докторат, София, 2009
10. Таня Владимирова Милачич. Асистирана репродукция при човека. Съвременни похвати за предимплантационна оценка на човешки ембриони. 2020г., София ISBN 978-619-188-405-6
11. Тимева Т. Предимплантационни прогностични фактори и пренатална диагностика при асистираните репродуктивни технологии. Докторат, София, 2007
12. Тончева, Д., *Медицинска генетика в постгеномната ера. Геномна медицина*, стр. 739-744, 2010, Симелпрес, София, ISBN 978-954-2918-01-1
13. Юнакова М. Слаб яйчников отговор на контролирана овариална хиперстимулация – диагноза, прогностични фактори, управление. Докторат, Варна, 2016
14. Юнакова М., Антонова И., Бочев И., Тимева Т., Щерев А., Влияние на начина на живот и възрастта върху репродуктивния капацитет на жената, САГБАЛ „Д-р Щерев“, София, Сп. *MedPost*, бр. 10, Октомври 2015, стр. 56 – 61.
15. Юнакова М., Валериева Е., Палабушок О., Бочев И., Тимева Т., Щерев А. Връзка между тубарния фактор като причина за стерилитет и яйчниковият отговор на

- контролирана овариална хиперстимулация САГБАЛ „Д-р Щерев“, София, Сп. MedPost, бр. 15, Март 2016, стр. 12 – 15
16. Юнакова М., Гогова Г., Антонова И., Велева Г., Костов И., Щерев А., Възрастта като предиктивен маркер за изхода от асистираните репродуктивни технологии, Сп. Акушерство и гинекология, Vol. 56, , Бр.6, 2017, стр. 17 – 20, ISSN 0324-0959
 17. Юнакова М., Гогова Г., Костов И., Иванов В., Щерев А., Влияние на тютюнопушенето върху репродуктивния потенциал на жената, сп. GP News, , бр. 3, Март 2018, стр. 28 – 31, ISSN 1311-4727
 18. Юнакова М., И. Бочев, И. Костов, Хр. Сурчева, Г. Гогова, А. Щерев, Опит за подобряване на изхода от асистираните репродуктивни технологии при жени с редуциран яйчников резерв чрез вазоактивни и антиоксидантни терапевтични мероприятия, сп. MedPost, , бр. 29, Юни 2018, стр. 8 – 11, ISSN 2367-6469.
 19. Юнакова М., Сурчева Х., Андреева П., Костов И., Велева Г., Щерев А., Сравнение на прогностичната сила на маркерите на яйчниковия резерв, Сп. Акушерство и гинекология, Vol. 56, , Бр.6, 2017, стр. 3 – 8, ISSN 0324-0959

ПУБЛИКАЦИИ В ИЗДАНИЯ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК

20. Akarsu, C., Çağlar, G., Vicdan, K., Sözen, E., & Biberoglu, K. (2009). Smooth endoplasmic reticulum aggregations in all retrieved oocytes causing recurrent multiple anomalies: case report. *Fertility and sterility*, 92(4), 1496. e1491-1496. e1493.
21. Akhter, N., & Shahab, M. (2017). Morphokinetic analysis of human embryo development and its relationship to the female age: a retrospective time-lapse imaging study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 63(8), 84-92. doi:10.14715/cmb/2017.63.8.18
22. Alikani, M., Palermo, G., Adler, A., Bertoil, M., Blake, M., & Cohen, J. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote*, 3(4), 283-288.
23. Antonova, I., Veleva, L., Petkova, L., & Shterev, A. (2011). *Correlation of oocyte grade based on cytoplasmic density and oolema elasticity with fertilization rate after ICSI*. Paper presented at the Hum Reprod.
24. Armstrong, D. T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55(6), 1303-1322. doi:[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00484-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00484-8)
25. Association of Clinical Embryologists – Guidelines on Good Practice in Clinical Embryology Laboratories 2012. (2012). *Human Fertility*, 15(4), 174-189. doi:10.3109/14647273.2012.747891
26. Azarkh, D., Cao, Y., Floehr, J., & Schnakenberg, U. (2023). Viscoelastic Properties of Zona Pellucida of Oocytes Characterized by Transient Electrical Impedance Spectroscopy. *Biosensors*, 13(4), 442.
27. Balaban, B. (2017). Oocyte Grading by Morphological Evaluation. *Principles of IVF Laboratory Practice: Optimizing Performance and Outcomes*, 132.
28. Balaban, B. (2019). Assessment of Oocyte Quality. In Z. P. Nagy, A. C. Varghese, & A. Agarwal (Eds.), *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices* (pp. 123-132). Cham: Springer International Publishing.

29. Balaban, B., & Urman, B. (2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(5), 608-615.
doi:[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61187-X](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61187-X)
30. Balakier, H., Sojecki, A., Cabaca, O., Bouman, D., Librach, C. L., & Squire, J. (2001). Morphologic and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Fertility and sterility*, 76(3), S268. doi:10.1016/S0015-0282(01)02804-7
31. Banerjee, J., Sharma, R., Agarwal, A., Maitra, D., Diamond, M. P., & Abu-Soud, H. M. (2012). IL-6 and Mouse Oocyte Spindle. *PLoS One*, 7(4), e35535.
doi:10.1371/journal.pone.0035535
32. Bartolacci, A., Intra, G., Coticchio, G., dell'Aquila, M., Patria, G., & Borini, A. (2022). Does morphological assessment predict oocyte developmental competence? A systematic review and proposed score. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(1), 3-17.
doi:10.1007/s10815-021-02370-3
33. Bedoschi, G., Navarro, P. A., & Oktay, K. (2016). Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future Oncology*, 12(20), 2333-2344.
doi:10.2217/fon-2016-0176
34. Braga, D. P. A. F., Halpern, G., Setti, A. S., Figueira, R. C. S., Iaconelli, A., & Borges, E. (2015). The impact of food intake and social habits on embryo quality and the likelihood of blastocyst formation. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(1), 30-38.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.03.007>
35. Braga, D. P. A. F., Setti, A. S., de Cássia S. Figueira, R., Machado, R. B., Iaconelli, A., & Borges, E. (2013). Influence of oocyte dysmorphisms on blastocyst formation and quality. *Fertility and Sterility*, 100(3), 748-754.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.021>
36. Brinsden, P. R., & Brinsden, P. R. (2009). Thirty years of IVF: The legacy of Patrick Steptoe and Robert Edwards. *Human Fertility*, 12(3), 137-143.
doi:10.1080/14647270903176773
37. Buratini, J., Dellaqua, T. T., Dal Canto, M., La Marca, A., Carone, D., Mignini Renzini, M., & Webb, R. (2021). The putative roles of FSH and AMH in the regulation of oocyte developmental competence: from fertility prognosis to mechanisms underlying age-related subfertility. *Human Reproduction Update*, 28(2), 232-254.
doi:10.1093/humupd/dmab044
38. Buratini, J., Moutier, C., Guglielmo, M. C., Turchi, D., Webb, R., De Ponti, E., . . . Canto, M. D. (2023). The impact of oocyte central granularity on ICSI practice: developmental competence of dysmorphic and morphologically normal companion oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40(10), 2375-2384.
doi:10.1007/s10815-023-02895-9
39. Byskov, A. G., Andersen, C. Y., Hossaini, A., & Guoliang, X. (1997). Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Molecular Reproduction and Development*, 46(3), 296-305.
doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<296::AID-MRD8>3.0.CO;2-K
40. Camus, E., Poncelet, C., Goffinet, F., Wainer, B., Merlet, F., Nisand, I., & Philippe, H. J. (1999). Pregnancy rates after in-vitro fertilization in cases of tubal infertility with and without hydrosalpinx: a meta-analysis of published comparative studies. *Hum Reprod*, 14(5), 1243-1249. doi:10.1093/humrep/14.5.1243

41. Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., . . . Ubaldi, F. M. (2014). Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod*, 29(6), 1173-1181. doi:10.1093/humrep/deu033
42. Cardozo, E., Pavone, M. E., & Hirshfeld-Cytron, J. E. (2011). Metabolic syndrome and oocyte quality. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(3), 103-109. doi:10.1016/j.tem.2010.12.002
43. Carré, J., Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Leandri, R. (2017). Influence of air quality on the results of in vitro fertilization attempts: A retrospective study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 210, 116-122. doi:10.1016/j.ejogrb.2016.12.012
44. Ceviren, A., Ozcelik, N., Urfan, A., Donmez, L., & Isikoglu, M. (2014). Characteristic cytoplasmic morphology of oocytes in endometriosis patients and its effect on the outcome of assisted reproduction treatments cycles. *IVF Lite*, 1(2), 88-93. doi:10.4103/2348-2907.140123
45. Chamayou, S. (2022). Oocyte quality in assisted reproduction techniques. *Minerva endocrinology*, 47(1), 89-98. doi:10.23736/s2724-6507.21.03507-7
46. Chang, C.-C., Shapiro, D. B., & Nagy, Z. P. (2021). The effects of vitrification on oocyte quality. *Biology of Reproduction*, 106(2), 316-327. doi:10.1093/biolre/ioab239
47. Choe, S. A., Jun, Y. B., Lee, W. S., Yoon, T. K., & Kim, S. Y. (2018). Association between ambient air pollution and pregnancy rate in women who underwent IVF. *Hum Reprod*, 33(6), 1071-1078. doi:10.1093/humrep/dey076
48. Cimadomo, D., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Ubaldi, N., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2018). Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence. *Frontiers in endocrinology*, 9, 327-327. doi:10.3389/fendo.2018.00327
49. Cinar, O., Demir, B., Dilbaz, S., Saltek, S., Aydin, S., & Goktolga, U. (2012). Does empty zona pellucida indicate poor ovarian response on intra cytoplasmic sperm injection cycles? *Gynecological Endocrinology*, 28(5), 341-344. doi:10.3109/09513590.2011.631632
50. Comstock, I. A., Diaz-Gimeno, P., Cabanillas, S., Bellver, J., Sebastian-Leon, P., Shah, M., . . . Lathi, R. B. (2017). Does an increased body mass index affect endometrial gene expression patterns in infertile patients? A functional genomics analysis. *Fertility and sterility*, 107(3), 740-748.e742. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.11.009
51. Conforti, A., Mascia, M., Cioffi, G., De Angelis, C., Coppola, G., De Rosa, P., . . . De Placido, G. (2018). Air pollution and female fertility: a systematic review of literature. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 117. doi:10.1186/s12958-018-0433-z
52. Cordeiro, I., Calhaz-Jorge, C., Leal, F., Barata, M., & Coelho, A. P. (1993). Fractured zona oocytes in in-vitro fertilization cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone analogue and human menopausal gonadotrophin. *Hum Reprod*, 8(4), 609-611. doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138105
53. Crawford, N. M., & Steiner, A. Z. (2015). Age-related Infertility. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 42(1), 15-25. doi:10.1016/j.ogc.2014.09.005
54. Creanga, A. A., Catalano, P. M., & Bateman, B. T. (2022). Obesity in pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 387(3), 248-259.

55. Crha, I., Hrubá, D., Fiala, J., Ventruba, P., Zákova, J., & Petrenko, M. (2001). The outcome of infertility treatment by in-vitro fertilisation in smoking and non-smoking women. *Cent Eur J Public Health*, 9(2), 64-68.
56. Dafopoulos, K., & Tarlatzis, B. C. (2023). Chapter 20 - Ovarian stimulation protocols. In A. S. Laganà & A. Guglielmino (Eds.), *Management of Infertility* (pp. 199-204): Academic Press.
57. Danfour, M. A., & Elmahaishi, M. S. (2010). Human oocyte oolemma characteristic is positively related to embryo developmental competence after ICSI procedure. *Middle East Fertility Society Journal*, 15(4), 269-273.
58. De Geyter, C., Wyns, C., Calhaz-Jorge, C., de Mouzon, J., Ferraretti, A. P., Kupka, M., . . . Goossens, V. (2020). 20 years of the European IVF-monitoring Consortium registry: what have we learned? A comparison with registries from two other regions. *Human Reproduction*, 35(12), 2832-2849. doi:10.1093/humrep/deaa250
59. De Vos, M., Devroey, P., & Fauser, B. C. J. M. (2010). Primary ovarian insufficiency. *The Lancet*, 376(9744), 911-921. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60355-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60355-8)
60. Demir, B., Guven, S., Guvendag Guven, E. S., Atamer, Y., & Gul, T. (2009). ORIGINAL ARTICLE: Serum IL-6 Level May Have Role in the Pathophysiology of Unexplained Infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*, 62(4), 261-267. doi:10.1111/j.1600-0897.2009.00734.x
61. Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L., Attaran, M., Goldberg, J. M., Austin, C., & Falcone, T. (2016). Delayed blastulation, multinucleation, and expansion grade are independently associated with live-birth rates in frozen blastocyst transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 106(6), 1370-1378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1095>
62. Devroey, P., Aboulghar, M., Garcia-Velasco, J., Griesinger, G., Humaidan, P., Kolibianakis, E., . . . Fauser, B. C. J. M. (2009). Improving the patient's experience of IVF/ICSI: a proposal for an ovarian stimulation protocol with GnRH antagonist co-treatment. *Hum Reprod*, 24(4), 764-774. doi:10.1093/humrep/den468
63. Dib, L., Picinato, M., Giorgenon, R., Romão, G., Ferriani, R., & Navarro, P. (2012). Noninvasive Imaging of the Meiotic Spindle of In Vivo Matured Oocytes From Infertile Women With Endometriosis. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20. doi:10.1177/1933719112459217
64. Dimitriadis, I., Zaninovic, N., Badiola, A. C., & Bormann, C. L. (2022). Artificial intelligence in the embryology laboratory: a review. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(3), 435-448. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.11.003>
65. Dolmans, M.-M., Demylle, D., Martinez-Madrid, B., & Donnez, J. (2005). Efficacy of in vitro fertilization after chemotherapy. *Fertility and sterility*, 83(4), 897-901. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.08.035>
66. Du, Y., Chen, Y., Zhang, S., Cheng, D., Liu, Y., Zhao, Q., . . . Zhao, X. (2022). Mechanical Characterization and Modelling of Subcellular Components of Oocytes. *Micromachines*, 13(7), 1087.
67. Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*, 103(2), 303-316. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.11.015
68. Duraker, R., Guven, E., Dilbaz, S., MENTEŞE, A., Aydin, S., & GÜVEN, S. (2021). Oxidative stress status in severe OHSS patients who underwent long agonist protocol

- intracytoplasmic sperm injection cycles. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 48(2).
69. Duran, H. E. (2020). Controlled Ovarian Stimulation Protocols for IVF: From First IVF Baby in the United States and Beyond. In O. Bukulmez (Ed.), *Diminished Ovarian Reserve and Assisted Reproductive Technologies: Current Research and Clinical Management* (pp. 105-117). Cham: Springer International Publishing.
 70. Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Wiesinger, R., Puchner, M., & Tews, G. (2003). Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod*, 18(11), 2406-2412. doi:10.1093/humrep/deg452
 71. Ebner, T., Moser, M., & Tews, G. (2006). Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 507-512. doi:[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62006-8](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62006-8)
 72. Ebner, T., Moser, M., Yaman, C., Feichtinger, O., Hartl, J., & Tews, G. (1999). Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertility and sterility*, 72(4), 599-603.
 73. Ebner, T., Oppelt, P., Wober, M., Staples, P., Mayer, R. B., Sonnleitner, U., . . . Shebl, O. (2015). Treatment with Ca²⁺ ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: a prospective multicenter study. *Hum Reprod*, 30(1), 97-102. doi:10.1093/humrep/deu285
 74. Ebner, T., Yaman, C., Moser, M., Sommergruber, M., Jesacher, K., & Tews, G. (2001). A Prospective Study on Oocyte Survival Rate After ICSI: Influence of Injection Technique and Morphological Features. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(12), 623-628. doi:10.1023/A:1013171505702
 75. European IVF Monitoring Consortium , f. t. E. S. o. H. R., Embryology, Wyns, C., De Geyter, C., Calhaz-Jorge, C., Kupka, M. S., . . . Goossens, V. (2022). ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE†. *Human Reproduction Open*, 2022(3). doi:10.1093/hropen/hoac022
 76. Fabiani, C., Ferrante, M. G., Meneghini, C., Licata, E., Paciotti, G., Gallo, M., . . . Rago, R. (2022). Female fertility preservation: Impact of cancer on ovarian function and oocyte quality. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 156(1), 166-171. doi:<https://doi.org/10.1002/ijgo.13702>
 77. Fabiani, C., Guarino, A., Meneghini, C., Licata, E., Paciotti, G., Miriello, D., . . . Rago, R. (2022). Oocyte Quality Assessment in Breast Cancer: Implications for Fertility Preservation. *Cancers*, 14(22), 5718.
 78. Fanchin, R., Ayoubi, J.-M., Righini, C., Olivennes, F., Schönauer, L. M., & Frydman, R. (2001). Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Human Reproduction*, 16(6), 1115-1119.
 79. Faramarzi, A., Khalili, M. A., & Ashourzadeh, S. (2017). Oocyte morphology and embryo morphokinetics in an intra-cytoplasmic sperm injection programme. Is there a relationship? *Zygote*, 25(2), 190-196. doi:10.1017/S0967199417000041
 80. Farhi, J., Cohen, K., Mizrachi, Y., Weissman, A., Raziel, A., & Orvieto, R. (2019). Should ICSI be implemented during IVF to all advanced-age patients with non-male factor subfertility? *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1), 30. doi:10.1186/s12958-019-0474-y

81. Ferrarini Zanetti, B., Paes de Almeida Ferreira Braga, D., Souza Setti, A., de Cássia Sávio Figueira, R., Iaconelli Jr, A., & Borges Jr, E. (2018). Is perivitelline space morphology of the oocyte associated with pregnancy outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 231, 225-229. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.10.053>
82. Ferreira, R. C., Halpern, G., de Cássia Savio Figueira, R., de Almeida Ferreira Braga, D. P., Iaconelli, A., & Borges, E. (2010). Physical Activity, Obesity and Eating Habits Can Influence Assisted Reproduction Outcomes. *Women's Health*, 6(4), 517-524. doi:10.2217/WHE.10.40
83. Fischer, N. M., Nguyen, H. V., Singh, B., Baker, V. L., & Segars, J. H. (2021). Prognostic value of oocyte quality in assisted reproductive technology outcomes: a systematic review. *F&S Reviews*, 2(2), 120-139. doi:<https://doi.org/10.1016/j.xfmr.2021.03.001>
84. Fréour, T., Lammers, J., Splingart, C., & Barrière, P. (2013). Time-lapse study of ovoid oocytes in ICSI cycles. *Fertility and sterility*, 100(3), S239. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.07.1213
85. Galanti, F., Licata, E., Paciotti, G., Gallo, M., Riccio, S., Miriello, D., . . . Antonaci, D. (2023). Impact of different typologies of smoking on ovarian reserve and oocyte quality in women performing ICSI cycles: an observational prospective study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 27, 5190-5199.
86. Gardner, D. K., & Balaban, B. (2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and ‘OMICS’: is looking good still important? *Molecular Human Reproduction*, 22(10), 704-718. doi:10.1093/molehr/gaw057
87. Gardner, D. K., Stevens, J., Sheehan, C. B., & Schoolcraft, W. B. (2007). Analysis of blastocyst morphology. *Human preimplantation embryo selection*, 79-87.
88. Geng, Y., Xun, Y., Hu, S., Lai, Q., & Jin, L. (2019). GnRH antagonist versus follicular-phase single-dose GnRH agonist protocol in patients of normal ovarian responses during controlled ovarian stimulation. *Gynecological Endocrinology*, 35(4), 309-313. doi:10.1080/09513590.2018.1528221
89. Ghannadi, A., Kazerooni, M., Jamalzadeh, F., Amiri, S., Rostami, P., & Absalan, F. (2011). The effects of laser assisted hatching on pregnancy rates. *Iranian journal of reproductive medicine*, 9(2), 95-98.
90. Glujovsky, D., Quinteiro Retamar, A. M., Alvarez Sedo, C. R., Ciapponi, A., Cornelisse, S., & Blake, D. (2022). Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(5). doi:10.1002/14651858.CD002118.pub6
91. Goldman, S., Dirnfeld, M., Gonen, Y., Koifman, M., Lissak, A., & Abramovici, H. (1993). Different morphology and proliferative ability of cumulus and granulosa cells originating from cystic follicles aspirated from stimulated in vitro fertilization patients. *Fertility and sterility*, 59(3), 601-605. doi:10.1016/S0015-0282(16)55807-5
92. Gonnella, F., Konstantinidou, F., Di Bernardino, C., Capacchietti, G., Peserico, A., Russo, V., . . . Gatta, V. (2022). A Systematic Review of the Effects of High-Fat Diet Exposure on Oocyte and Follicular Quality: A Molecular Point of View. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8890.

93. Gonzalez, M. B., Robker, R. L., & Rose, R. D. (2022). Obesity and oocyte quality: significant implications for ART and emerging mechanistic insights. *Biology of Reproduction*, *106*(2), 338-350.
94. Goodarzi, M. O., Dumesic, D. A., Chazenbalk, G., & Azziz, R. (2011). Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nature Reviews Endocrinology*, *7*, 219. doi:10.1038/nrendo.2010.217
95. Gosden, R., & Lee, B. (2010). Portrait of an oocyte: our obscure origin. *The Journal of clinical investigation*, *120*(4), 973-983. doi:10.1172/JCI41294
96. Gosden, R. G. (1985). Maternal Age: A Major Factor Affecting the Prospects and Outcome of Pregnancy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *442*(1), 45-57. doi:10.1111/j.1749-6632.1985.tb37504.x
97. Goud, A. P., Goud, P. T., Diamond, M. P., Gonik, B., & Abu-Soud, H. M. (2008). Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free radical biology & medicine*, *44*(7), 1295-1304. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.014
98. Goud, P., Goud, A. P., Qian, C., Laverge, H., Van der Elst, J., De Sutter, P., & Dhont, M. (1998). *In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: Role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium* (Vol. 13).
99. Greydanus, D. E., Cabral, M. D., & Patel, D. R. (2022). Pelvic inflammatory disease in the adolescent and young adult: An update. *Disease-a-Month*, *68*(3), 101287. doi:<https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2021.101287>
100. Haaf, T., Hahn, A., Lambrecht, A., Grossmann, B., Schwaab, E., Khanaga, O., . . . Schorsch, M. (2009). A high oocyte yield for intracytoplasmic sperm injection treatment is associated with an increased chromosome error rate. *Fertil Steril*, *91*(3), 733-738. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.01.012
101. Hamilton, W. J. (1944). Phases of maturation and fertilization in human ova. *Journal of anatomy*, *78*(Pt 1-2), 1-4.2.
102. Heijnen, E. M. E. W., Eijkemans, M. J. C., Hughes, E. G., Laven, J. S. E., Macklon, N. S., & Fauser, B. C. J. M. (2005). A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*, *12*(1), 13-21. doi:10.1093/humupd/dmi036
103. Heindryckx, B., Van der Elst, J., De Sutter, P., & Dhont, M. (2005). Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod*, *20*(8), 2237-2241. doi:10.1093/humrep/dei029
104. Heitmann, R. J., Hill, M. J., James, A. N., Schimmel, T., Segars, J. H., Csokmay, J. M., . . . Payson, M. D. (2015). Live births achieved via IVF are increased by improvements in air quality and laboratory environment. *Reproductive BioMedicine Online*, *31*(3), 364-371. doi:10.1016/j.rbmo.2015.04.011
105. Hieronimus, B., & Ensenauer, R. (2021). Influence of maternal and paternal pre-conception overweight/obesity on offspring outcomes and strategies for prevention. *European Journal of Clinical Nutrition*, *75*(12), 1735-1744. doi:10.1038/s41430-021-00920-7
106. Higdon, H. L., III, Blackhurst, D. W., & Boone, W. R. (2008). Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertility and sterility*, *89*(3), 703-710. doi:10.1016/j.fertnstert.2007.03.040

107. Hiraoka, K., Tamaki, T., Matsumura, Y., Kiriake, C., Uto, H., Yoshida, H., & Kitamura, S. (2012). Impact of the volume of cytoplasm aspirated into the injection pipette at the time of oolemma breakage on the fertilization rate after ICSI: a preliminary study. *Journal of Mammalian Ova Research*, 29(1), 82-87.
108. Hirsch, A., Hirsh Raccach, B., Rotem, R., Hyman, J., Ben-Ami, I., & Tsafrir, A. (2023). P-402 What is the efficacy of planned oocyte cryopreservation? A systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction*, 38(Supplement_1). doi:10.1093/humrep/dead093.753
109. Hong, Z., Zhou, L., Ji, H., Xu, C., Yang, D., Yang, X., & Wang, H. (2022). Growth hormone protects oocytes from premature ovarian failure by alleviating apoptosis (GH protects oocytes from POF by alleviating apoptosis).
110. Iljas, J. D., Wei, Z., & Homer, H. A. (2020). Sirt1 sustains female fertility by slowing age-related decline in oocyte quality required for post-fertilization embryo development. *Aging Cell*, 19(9), e13204. doi:<https://doi.org/10.1111/accel.13204>
111. Iussig, B., Maggiulli, R., Fabozzi, G., Bertelle, S., Vaiarelli, A., Cimadomo, D., . . . Rienzi, L. (2019). A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 98(5), 550-558. doi:<https://doi.org/10.1111/aogs.13569>
112. Jackson Wu, T.-C., Wang, L., & Wan, Y.-J. Y. (1993). Detection of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction**Supported by research grants CA53596-01A1 and HD29539-01 from National Institutes of Health, Bethesda, Maryland.††Presented at the 40th Annual Meeting of The Pacific Coast Fertility Society, Indian Wells, California, April 8 to 12, 1992. *Fertility and sterility*, 59(1), 54-59. doi:[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)55614-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)55614-3)
113. Jain, M., & Singh, M. (2022). Environmental Toxins And Infertility. In *StatPearls [Internet]*: StatPearls Publishing.
114. Jeelani, R., Chatzicharalampous, C., Kohan-Ghadr, H.-R., Awonuga, A., Joshi, N., Morris, R. T., & Abu-Soud, H. M. (2018). Acrolein, a commonly found environmental toxin, causes oocyte mitochondrial dysfunction and negatively affects embryo development. *Free Radical Research*, 52(9), 929-938. doi:10.1080/10715762.2018.1487559
115. Jindal, S. K., Zapantis, K., Zapantis, A., Lieman, H. J., Barad, D., & Santoro, N. (2005). Does Injection of Immature Oocytes During ICSI Increase the Number of Embryos for Transfer? *Fertility and sterility*, 84, S454. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.07.1188
116. Kahyaoglu, I., Demir, B., Turkkani, A., Cinar, O., Dilbaz, S., Dilbaz, B., & Mollamahmutoglu, L. (2014). Total fertilization failure: is it the end of the story? *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(9), 1155-1160. doi:10.1007/s10815-014-0281-5
117. Kalleas, D., McEvoy, K., Horne, G., Roberts, S. A., & Brison, D. R. (2022). Live birth rate following undisturbed embryo culture at low oxygen in a time-lapse incubator compared to a high-quality benchtop incubator. *Human Fertility*, 25(1), 147-153. doi:10.1080/14647273.2020.1729423
118. Karavani, G., Wasserzug-Pash, P., Mordechai-Daniel, T., Bauman, D., Klutstein, M., & Imbar, T. (2021). Age-Dependent in vitro Maturation Efficacy of Human Oocytes

- Is There an Optimal Age? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. doi:10.3389/fcell.2021.667682
119. Kashir, J., Heindryckx, B., Jones, C., De Sutter, P., Parrington, J., & Coward, K. (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Update*, 16(6), 690-703. doi:10.1093/humupd/dmq018
 120. Kawwass, J. F., Kulkarni, A. D., Hipp, H. S., Crawford, S., Kissin, D. M., & Jamieson, D. J. (2016). Extremities of body mass index and their association with pregnancy outcomes in women undergoing in vitro fertilization in the United States. *Fertility and Sterility*, 106(7), 1742-1750. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.08.028
 121. Keefe, D., Kumar, M., & Kalmbach, K. (2015). Oocyte competency is the key to embryo potential. *Fertility and Sterility*, 103(2), 317-322. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.115>
 122. Kermack, A. J., Fesenko, I., Christensen, D. R., Parry, K. L., Lowen, P., Wellstead, S. J., . . . Houghton, F. D. (2022). Incubator type affects human blastocyst formation and embryo metabolism: a randomized controlled trial. *Human Reproduction*, 37(12), 2757-2767. doi:10.1093/humrep/deac233
 123. Khoudja, R. Y., Xu, Y., Li, T., & Zhou, C. (2013). Better IVF outcomes following improvements in laboratory air quality. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(1), 69-76. doi:10.1007/s10815-012-9900-1
 124. Kilani, S., & Chapman, M. (2011). *The use of polarized light microscopy in IVF* (Vol. 6).
 125. Kosmas, I. P., Kolibianakis, E. M., & Devroey, P. (2004). Association of estradiol levels on the day of hCG administration and pregnancy achievement in IVF: a systematic review. *Hum Reprod*, 19(11), 2446-2453. doi:10.1093/humrep/deh473
 126. Krause, I., Pohler, U., Grosse, S., Shebl, O., Petek, E., Chandra, A., & Ebner, T. (2016). Characterization of the injection funnel during intracytoplasmic sperm injection reflects cytoplasmic maturity of the oocyte. *Fertility and Sterility*, 106(5), 1101-1106. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.06.015>
 127. Labs, E. G. G. o. G. P. i. I., De los Santos, M. J., Woodward, B., Vermeulen, N., Apter, S., Coticchio, G., . . . Verheyen, G. (2016). Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015)†. *Hum Reprod*, 31(4), 685-686. doi:10.1093/humrep/dew016
 128. Lainez, N. M., & Coss, D. (2019). Obesity, neuroinflammation, and reproductive function. *Endocrinology*, 160(11), 2719-2736.
 129. Lasienė, K., Vitkus, A., Valanėiūtė, A., & Lasys, V. (2009). Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina*, 45(7), 509.
 130. Lee, P., Bubeck, S., & Petro, J. (2023). Benefits, Limits, and Risks of GPT-4 as an AI Chatbot for Medicine. *New England Journal of Medicine*, 388(13), 1233-1239. doi:10.1056/NEJMsr2214184
 131. Lee, P., Goldberg, C., & Kohane, I. (2023). *The AI revolution in medicine: GPT-4 and beyond*: Pearson.
 132. Lehner, A., Kaszas, Z., Murber, A., Rigo, J., Urbancsek, J., & Fancsovits, P. (2015). Giant oocytes in human in vitro fertilization treatments. *Archives of gynecology and obstetrics*, 292(3), 697-703.
 133. Lemmen, J. G., Agerholm, I., & Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(3), 385-391. doi:[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60222-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60222-2)

134. Lemmen, J. G., Rodríguez, N. M., Andreasen, L. D., Loft, A., & Ziebe, S. (2016). The total pregnancy potential per oocyte aspiration after assisted reproduction-in how many cycles are biologically competent oocytes available? *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(7), 849-854. doi:10.1007/s10815-016-0707-3
135. Lemseffer, Y., Terret, M.-E., Campillo, C., & Labrune, E. (2022). Methods for Assessing Oocyte Quality: A Review of Literature. *Biomedicines*, 10(9), 2184.
136. Levi Setti, P. E., Porcu, E., Patrizio, P., Vigiliano, V., de Luca, R., d'Aloja, P., . . . Scaravelli, G. (2014). Human oocyte cryopreservation with slow freezing versus vitrification. Results from the National Italian Registry data, 2007–2011. *Fertility and Sterility*, 102(1), 90-95.e92. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.03.052>
137. Li, Y., Liu, S., & Lv, Q. (2021). Single blastocyst stage versus single cleavage stage embryo transfer following fresh transfer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 267, 11-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.10.004>
138. Liu, L., Cai, J., Li, P., Jiang, X., & Ren, J. (2017). Clinical outcome of cycles with oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63(2), 113-119. doi:10.1080/19396368.2016.1272648
139. Liu, Q., Sun, Y., Guan, L., Chen, X., Zhou, J., Liu, P., & Huo, B. (2023). Detection of the effect of microvibrational stimulation on human discarded immature oocytes by single-cell transcriptome sequencing technology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. doi:10.1007/s10815-023-02837-5
140. Llonch, S., Barragán, M., Nieto, P., Mallol, A., Elosua-Bayes, M., Lorden, P., . . . Payer, B. (2021). Single human oocyte transcriptome analysis reveals distinct maturation stage-dependent pathways impacted by age. *Aging Cell*, 20(5), e13360. doi:<https://doi.org/10.1111/accel.13360>
141. Lui Yovich, J. (2020). Founding pioneers of IVF update: Innovative researchers generating livebirths by 1982. *Reproductive Biology*, 20(1), 111-113. doi:<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.12.008>
142. Lyu, S. W., Kim, J. W., Choi, C. H., Seok, H. H., Yoon, T. K., & Kim, A. (2013). Impact of high basal FSH/LH ratio in women with normal FSH levels on in vitro fertilization outcomes. *Gynecological Endocrinology*, 29(5), 424-429. doi:10.3109/09513590.2012.743002
143. Ma, L., Cai, L., Hu, M., Wang, J., Xie, J., Xing, Y., . . . Liu, J. (2020). Coenzyme Q10 supplementation of human oocyte in vitro maturation reduces postmeiotic aneuploidies. *Fertility and Sterility*, 114(2), 331-337. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.04.002>
144. Maggiulli, R., Cimadomo, D., Fabozzi, G., Papini, L., Dovere, L., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2020). The effect of ICSI-related procedural timings and operators on the outcome. *Human Reproduction*, 35(1), 32-43. doi:10.1093/humrep/dez234
145. Magli, M. C., Jones, G. M., Lundin, K., & van den Abbeel, E. (2012). Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. Preface. *Hum Reprod*, 27 Suppl 1, i1. doi:10.1093/humrep/des229
146. May-Panloup, P., Boucret, L., Chao de la Barca, J.-M., Desquiere-Dumas, V., Ferré-L'Hotellier, V., Morinière, C., . . . Reynier, P. (2016). Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. *Human Reproduction Update*, 22(6), 725-743. doi:10.1093/humupd/dmw028

147. Mayer, R. B., Shebl, O., Oppelt, P., Reiter, E., Altmann, R., Enengl, S., . . . Ebner, T. (2018). Good-quality blastocysts derived from vacuolized morulas show reduced viability. *Fertility and sterility*, *109*(6), 1025-1029.
148. Medicine, A. S. i. R., & Embryology, E. S. I. G. o. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting†. *Human Reproduction*, *26*(6), 1270-1283. doi:10.1093/humrep/der037
149. Miao, Y.-L., Kikuchi, K., Sun, Q.-Y., & Schatten, H. (2009). Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction Update*, *15*(5), 573-585. doi:10.1093/humupd/dmp014
150. Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *785*, 108320. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108320>
151. Milachich, T., & Shterev, A. (2018). When Fertilization Fails. In T.-C. Li, T. Tulandi, & Y. Cheong (Eds.), *Practical Problems in Assisted Conception* (pp. 165-168). Cambridge: Cambridge University Press.
152. Milachich, T., Shterev, A., Cheong, Y., Tulandi, T., & Li, T.-C. (2018). Practical Problems in Assisted Conception. 165-168. doi:10.1017/9781108149891.035
153. Minasi, M. G., Fabozzi, G., Casciani, V., Lobascio, A. M., Colasante, A., Scarselli, F., & Greco, E. (2015). Improved blastocyst formation with reduced culture volume: comparison of three different culture conditions on 1128 sibling human zygotes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *32*, 215-220.
154. Moghadam, A. R. E., Moghadam, M. T., Hemadi, M., & Saki, G. (2022). Oocyte quality and aging. *JBRA Assist Reprod*, *26*(1), 105-122. doi:10.5935/1518-0557.20210026
155. Montag, M., Liebenthron, J., & Köster, M. (2011). Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta*, *32*, S252-S256. doi:<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.07.009>
156. Morgan, S., Anderson, R. A., Gourley, C., Wallace, W. H., & Spears, N. (2012). How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Human Reproduction Update*, *18*(5), 525-535. doi:10.1093/humupd/dms022
157. Mortimer, D., Cohen, J., Mortimer, S. T., Fawzy, M., McCulloh, D. H., Morbeck, D. E., . . . Gilligan, A. V. (2018). Cairo consensus on the IVF laboratory environment and air quality: report of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*, *36*(6), 658-674. doi:10.1016/j.rbmo.2018.02.005
158. Muffone, A. R. M. C., de Oliveira Lübke, P. D. P., & Rabito, E. I. (2022). Mediterranean diet and infertility: a systematic review with meta-analysis of cohort studies. *Nutrition Reviews*, *81*(7), 775-789. doi:10.1093/nutrit/nuac087
159. Murugesu, S., Saso, S., Jones, B. P., Bracewell-Milnes, T., Athanasiou, T., Mania, A., . . . Ben-Nagi, J. (2017). Does the use of calcium ionophore during artificial oocyte activation demonstrate an effect on pregnancy rate? A meta-analysis. *Fertility and sterility*, *108*(3), 468-482.e463. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.06.029
160. Nagy, Z. P., Dozortsev, D., Diamond, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Abdelmassih, R., & Greco, E. (2003). Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril*, *80*(1), 67-74.
161. Nayot, D., Mercuri, N., Krivoi, A., Casper, R. F., Meriano, J., & Fjeldstad, J. (2021). A NOVEL NON-INVASIVE OOCYTE SCORING SYSTEM USING AI

- APPLIED TO 2-DIMENSIONAL IMAGES. *Fertility and Sterility*, 116(3), e474.
doi:10.1016/j.fertnstert.2021.08.029
162. Neal, M. S., Zhu, J., & Foster, W. G. (2008). Quantification of benzo[a]pyrene and other PAHs in the serum and follicular fluid of smokers versus non-smokers. *Reproductive Toxicology*, 25(1), 100-106.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.10.012>
 163. Neblett, M. F., Kim, T., Jones, T. L., Baumgarten, S. C., Coddington, C. C., Zhao, Y., & Shenoy, C. C. (2021). Is there still a role for a cleavage-stage embryo transfer? *F&S Reports*, 2(3), 269-274. doi:<https://doi.org/10.1016/j.xfre.2021.06.004>
 164. Nikbakht, R., Mohammadjafari, R., Rajabalipour, M., & Moghadam, M. T. (2021). Evaluation of oocyte quality in Polycystic ovary syndrome patients undergoing ART cycles. *Fertility research and practice*, 7, 1-6.
 165. Nikiforov, D., Cadenas, J., Mamsen, L. S., Wakimoto, Y., Kristensen, S. G., Pors, S. E., & Andersen, C. Y. (2021). Clusters of smooth endoplasmic reticulum are absent in oocytes from unstimulated women. *Reproductive BioMedicine Online*, 43(1), 26-32.
 166. Nikiforov, D., Grøndahl, M. L., Hreinsson, J., & Andersen, C. Y. (2022). Human Oocyte Morphology and Outcomes of Infertility Treatment: a Systematic Review. *Reproductive Sciences*, 29(10), 2768-2785. doi:10.1007/s43032-021-00723-y
 167. Nori, H., King, N., McKinney, S. M., Carignan, D., & Horvitz, E. (2023). Capabilities of gpt-4 on medical challenge problems. *arXiv preprint arXiv:2303.13375*.
 168. Oh, H. S., Jang, J., & Yoon, H. J. (2022). INFLUENCE OF WOMEN'S AGE ON MEIOTIC SPINDLE POSITION AND THE EFFECT OF ICSI BASED ON MEIOTIC SPINDLE VISUALIZATION. *Fertility and Sterility*, 118(4), e139.
doi:10.1016/j.fertnstert.2022.08.408
 169. Olaso, F., Mendoza, R., Echeverria, I., Malaina, I., Ibañez, J., Irazusta, J., & Matorras, J. (2023). P-161 Impact of physical activity (PA) on oocyte quality: a prospective study among IVF/ICSI patients. *Human Reproduction*, 38(Supplement_1), dead093. 524.
 170. Oldenbourg, R. (1998). Chapter 10 Polarized Light Microscopy of Spindles. In C. L. Rieder (Ed.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 61, pp. 175-208): Academic Press.
 171. Organization, W. H. (2022). *WHO European regional obesity report 2022*: World Health Organization. Regional Office for Europe.
 172. Oride, A., Kanasaki, H., Hara, T., Ohta, H., & Kyo, S. (2017). Characterization of oocyte retrieval cycles with empty zona pellucida. *Reproductive medicine and biology*, 17(1), 71-76. doi:10.1002/rmb2.12071
 173. Otsuki, J., Iwasaki, T., Katada, Y., Tsutsumi, Y., Tsuji, Y., Furuhashi, K., . . . Shiotani, M. (2018a). A higher incidence of cleavage failure in oocytes containing smooth endoplasmic reticulum clusters. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(5), 899-905. doi:10.1007/s10815-018-1119-3
 174. Otsuki, J., Iwasaki, T., Katada, Y., Tsutsumi, Y., Tsuji, Y., Furuhashi, K., . . . Shiotani, M. (2018b). A higher incidence of cleavage failure in oocytes containing smooth endoplasmic reticulum clusters. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 1-7.
 175. Otsuki, J., Okada, A., Morimoto, K., Nagai, Y., & Kubo, H. (2004). The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod*, 19(7), 1591-1597.

176. Ozbakir, B., & Tulay, P. (2020). Does cigarette smoking really have a clinical effect on folliculogenesis and oocyte maturation? *Zygote*, 28(4), 318-321. doi:10.1017/S0967199420000155
177. Ozturk, S. (2020). Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. *Molecular Reproduction and Development*, 87(10), 1021-1036. doi:<https://doi.org/10.1002/mrd.23420>
178. Paccola, C. C., Souza, G. S., Freitas, I. M. M., Souza, J. C., Martins, L. L., Vendramini, V., & Miraglia, S. M. (2021). Does maternal exposure to nicotine affect the oocyte quality and reproductive capacity in adult offspring? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 426, 115638. doi:<https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115638>
179. Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810), 17-18.
180. Palomba, S., Costanzi, F., Nelson, S. M., Caserta, D., & Humaidan, P. (2023). Interventions to prevent or reduce the incidence and severity of ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic umbrella review of the best clinical evidence. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1), 67. doi:10.1186/s12958-023-01113-6
181. Pandey, S., Maheshwari, A., & Bhattacharya, S. (2010). Should access to fertility treatment be determined by female body mass index? *Hum Reprod*, 25(4), 815-820. doi:10.1093/humrep/deq013
182. Pasquariello, R., Verdile, N., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., Boiti, C., Zerani, M., & Maranesi, M. (2020). The Role of Resveratrol in Mammalian Reproduction. *Molecules*, 25(19), 4554.
183. Payeli, S. (2022). P-142 ICSI Semi Automation powered by AI: Gateway for Oocyte Quality Assessment real time based on biomechanics during ICSI. *Human Reproduction*, 37(Supplement_1), deac107. 137.
184. Pelletier, C., Keefe, D. L., & Trimarchi, J. R. (2004). Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. *Fertility and sterility*, 81, 850-856. doi:10.1016/j.fertnstert.2003.09.033
185. Petersen, C. G., Oliveira, J. B. A., Mauri, A. L., Massaro, F. C., Baruffi, R. L. R., Pontes, A., & Franco, J. G., Jr. (2009). Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(2), 235-243. doi:10.1016/S1472-6483(10)60261-1
186. Petrushko, M. P., Buderatska, N. O., Gontar, J. V., & Yurchuk, T. O. (2021). Morphological and Molecular Cytogenetic Characteristics of Giant Human Oocytes. *Cytology and Genetics*, 55(2), 132-137. doi:10.3103/S0095452721020110
187. Pietroforte, S., Monasterio, M. B., Ferrer-Vaquer, A., Irimia, M., Ibáñez, E., Popovic, M., . . . Zambelli, F. (2023). Specific processing of meiosis-related transcript is linked to final maturation in human oocytes. *Molecular Human Reproduction*. doi:10.1093/molehr/gaad021
188. Prados, F. J., Debrock, S., Lemmen, J. G., & Agerholm, I. (2012). The cleavage stage embryo. *Hum Reprod*, 27 Suppl 1, i50-71. doi:10.1093/humrep/des224
189. Prasath, E. (2023). Time line in IVF laboratory. *Fertility Science and Research*, 10(1), 15-19. doi:10.4103/fsr.fsr_6_23

190. Pribenszky, C., Nilselid, A.-M., & Montag, M. (2017). Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 35(5), 511-520. doi:10.1016/j.rbmo.2017.06.022
191. Rama Raju, G. A., Prakash, G. J., Krishna, K. M., & Madan, K. (2007). Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reprod Biomed Online*, 14(2), 166-174.
192. Regan, S. L. P., Knight, P. G., Yovich, J. L., Leung, Y., Arfuso, F., & Dharmarajan, A. (2018). Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle—A Changing View. *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00061
193. Reproduction, T. E. I.-M. C. f. t. E. S. o. H., Embryology, Wyns, C., De Geyter, C., Calhaz-Jorge, C., Kupka, M. S., . . . Goossens, V. (2021). ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE†. *Human Reproduction Open*, 2021(3). doi:10.1093/hropen/hoab026
194. Rienzi, L., Gracia, C., Maggiulli, R., LaBarbera, A. R., Kaser, D. J., Ubaldi, F. M., . . . Racowsky, C. (2016). Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update*, 23(2), 139-155. doi:10.1093/humup/dmw038
195. Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., . . . Greco, E. (2008). Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1692-1700. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.024>
196. Rodríguez-Varela, C., & Labarta, E. (2021). Does Coenzyme Q10 Supplementation Improve Human Oocyte Quality? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9541.
197. Rosen, M. P., Shen, S., Dobson, A. T., Fujimoto, V. Y., McCulloch, C. E., & Cedars, M. I. (2006). Oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection: a multivariate analysis to assess its importance as a laboratory or clinical marker. *Fertility and Sterility*, 85(6), 1736-1743. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.12.017>
198. Sanchez, A. M., Somigliana, E., Vercellini, P., Pagliardini, L., Candiani, M., & Vigano, P. (2016). Endometriosis as a detrimental condition for granulosa cell steroidogenesis and development: From molecular alterations to clinical impact. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 155, 35-46. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.023>
199. Sanchez, A. M., Vanni, V. S., Bartiromo, L., Papaleo, E., Zilberberg, E., Candiani, M., . . . Viganò, P. (2017). Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature. *Journal of Ovarian Research*, 10(1), 43. doi:10.1186/s13048-017-0341-4
200. Sansone, M., Zaami, S., Cetta, L., Costanzi, F., & Signore, F. (2021). Ovotoxicity of smoking and impact on AMH levels: a pilot study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*, 25, 5255-5260.
201. Santos, M., Cordts, E. B., Bianco, B., Barbosa, C. P., & Christofolini, D. M. (2015). Oocyte Quality in Patients with Increased FSH Levels. *JBRA Assist Reprod*, 19(4), 227-229. doi:10.5935/1518-0557.20150044

202. Sciorio, R., Bellaminutti, S., Tramontano, L., & Esteves, S. C. (2022). Impact of obesity on medically assisted reproductive treatments. *Zygote*, 30(4), 431-439.
203. Sciorio, R., Thong, J. K., & Pickering, S. J. (2018). Comparison of the development of human embryos cultured in either an EmbryoScope or benchtop incubator. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(3), 515-522. doi:10.1007/s10815-017-1100-6
204. Scott, L. (2003). Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), 201-214. doi:[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61711-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61711-7)
205. Scott, L. (2008). Analysis of fertilization. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies: Laboratory and Clinical Perspectives. Third ed: Taylor and Francis, Inc*, 207-217.
206. Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., & Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*, 15(11), 2394-2403. doi:10.1093/humrep/15.11.2394
207. Scott, L., Finn, A., O'Leary, T., McLellan, S., & Hill, J. (2007). Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod*, 22(1), 230-240. doi:10.1093/humrep/del358
208. Scott, L. A., & Smith, S. (1998). The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod*, 13(4), 1003-1013. doi:10.1093/humrep/13.4.1003
209. Sedighe, E., Mahsa, G., Maryam, A., Mohammad, C., Gholamali, J. S., & Parvaneh, M. (2022). Stages of endometriosis: Does it affect oocyte quality, embryo development and fertilization rate? *JBRA Assist Reprod*, 26(4), 620-626.
210. Setti, A. S., Figueira, R. C. S., Braga, D. P. A. F., Colturato, S. S., Iaconelli, A., & Borges, E. (2011). Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 159(2), 364-370. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.07.031>
211. Setti, A. S., Halpern, G., Braga, D. P. d. A. F., Iaconelli, A., & Borges, E. (2022). Maternal lifestyle and nutritional habits are associated with oocyte quality and ICSI clinical outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(2), 370-379. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.08.025>
212. Shaw-Jackson, C., Van Beirs, N., Thomas, A.-L., Rozenberg, S., & Autin, C. (2014). Can healthy babies originate from oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates? A systematic mini-review. *Hum Reprod*, 29(7), 1380-1386.
213. Shen, T., Benet, E., Sridhar, S. L., Abadie, J., Piat, E., & Vernerey, F. J. (2019). Separating the contributions of zona pellucida and cytoplasm in the viscoelastic response of human oocytes. *Acta Biomaterialia*, 85, 253-262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.034>
214. Shi, W., Xu, B., Wu, L. M., Jin, R. T., Luan, H. B., Luo, L. H., . . . Tong, X. H. (2014). Oocytes with a dark zona pellucida demonstrate lower fertilization, implantation and clinical pregnancy rates in IVF/ICSI cycles. *PLoS One*, 9(2), e89409. doi:10.1371/journal.pone.0089409

215. Shu, Y., Gebhardt, J., Watt, J., Lyon, J., Dasig, D., & Behr, B. (2007). Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and sterility*, *87*(5), 1022-1027. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.08.110
216. Simopoulou, M., Rapani, A., Grigoriadis, S., Pantou, A., Tsioulou, P., Maziotis, E., . . . Vlahos, N. (2021). Getting to Know Endometriosis-Related Infertility Better: A Review on How Endometriosis Affects Oocyte Quality and Embryo Development. *Biomedicines*, *9*(3), 273.
217. Smith, R., Stevens, J., Schlenker, T., McCormick, S., Schoolcraft, W. B., & Katz-Jaffe, M. (2010). Sibling immature oocytes exhibit higher rates of chromosomal aneuploidies. *Fertility and sterility*, *94*(4), S52. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.07.203
218. Snider, A. P., & Wood, J. R. (2019). Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. *Reproduction*, *158*(3), R79-R90.
219. So, C., Menelaou, K., Uraji, J., Harasimov, K., Steyer, A. M., Seres, K. B., . . . Schuh, M. (2022). Mechanism of spindle pole organization and instability in human oocytes. *Science*, *375*(6581), eabj3944. doi:doi:10.1126/science.abj3944
220. Soares, S. R., Simon, C., Remohí, J., & Pellicer, A. (2006). Cigarette smoking affects uterine receptiveness. *Hum Reprod*, *22*(2), 543-547. doi:10.1093/humrep/del394
221. Steptoe, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, *2*(8085), 366.
222. Sun, H., Lin, Y., Lin, D., Zou, C., Zou, X., Fu, L., . . . Qian, W. (2019). Mediterranean diet improves embryo yield in IVF: a prospective cohort study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *17*(1), 73. doi:10.1186/s12958-019-0520-9
223. Sun, Y.-L., Tang, S.-B., Shen, W., Yin, S., & Sun, Q.-Y. (2019). Roles of Resveratrol in Improving the Quality of Postovulatory Aging Oocytes In Vitro. *Cells*, *8*(10), 1132.
224. Sunde, A. (2019). Embryo Culture and Phenotype of the Offspring. In Z. P. Nagy, A. C. Varghese, & A. Agarwal (Eds.), *In Vitro Fertilization: A Textbook of Current and Emerging Methods and Devices* (pp. 877-889). Cham: Springer International Publishing.
225. Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., . . . Sugino, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, *44*(3), 280-287. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00524.x>
226. Ten, J., Mendiola, J., Vioque, J., de Juan, J., & Bernabeu, R. (2007). Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reproductive BioMedicine Online*, *14*(1), 40-48.
227. Tews, G., Moser, M., Puchner, M., Sommergruber, M., Wiesinger, R., & Ebner, T. (2003). Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity. *Hum Reprod*, *18*(6), 1294-1298. doi:10.1093/humrep/deg232
228. Tews, G., Moser, M., Sommergruber, M., Shebl, O., & Ebner, T. (2007). Developmental fate of ovoid oocytes. *Hum Reprod*, *23*(1), 62-66. doi:10.1093/humrep/dem280
229. Thakre, N., & Homburg, R. (2019). A review of IVF in PCOS patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, *14*(5), 315-319. doi:10.1080/17446651.2019.1631797

230. Thomas, C., Cavazza, T., & Schuh, M. (2021). Aneuploidy in human eggs: contributions of the meiotic spindle. *Biochemical Society Transactions*, 49(1), 107-118. doi:10.1042/bst20200043
231. Thomson, A. (1919). The Maturation of the Human Ovum. *Journal of anatomy*, 53(Pt 2-3), 172-208.175.
232. Trebichalská, Z., Kyjovská, D., Kloudová, S., Otevřel, P., Hampl, A., & Holubcová, Z. (2020). Cytoplasmic maturation in human oocytes: an ultrastructural study †. *Biology of Reproduction*, 104(1), 106-116. doi:10.1093/biolre/ioaa174
233. Ubaldi, F., Rienzi, L., & Vajta, G. (2010). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reproduction Update*, 17(1), 34-45. doi:10.1093/humupd/dmq029
234. Ubaldi, F. M., Cimadomo, D., Vaiarelli, A., Fabozzi, G., Venturella, R., Maggiulli, R., . . . Rienzi, L. (2019). Advanced Maternal Age in IVF: Still a Challenge? The Present and the Future of Its Treatment. *Frontiers in Endocrinology*, 10(94). doi:10.3389/fendo.2019.00094
235. Unfer, V., Raffone, E., Rizzo, P., & Buffo, S. (2011). Effect of a supplementation with myo-inositol plus melatonin on oocyte quality in women who failed to conceive in previous in vitro fertilization cycles for poor oocyte quality: a prospective, longitudinal, cohort study. *Gynecological Endocrinology*, 27(11), 857-861. doi:10.3109/09513590.2011.564687
236. Uyar, A., Torrealday, S., & Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*, 99(4), 979-997. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.129
237. Van Blerkom, J., Antczak, M., & Schrader, R. (1997). The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(5), 1047-1055.
238. Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., De Gheselle, S., Dullaerts, V., Van den Abbeel, E., Gerris, J., . . . De Sutter, P. (2012). Assisted oocyte activation is not beneficial for all patients with a suspected oocyte-related activation deficiency. *Hum Reprod*, 27(7), 1977-1984. doi:10.1093/humrep/des097
239. Veeck, L. L. (1988). Oocyte Assessment and Biological Performance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541(1), 259-274. doi:10.1111/j.1749-6632.1988.tb22263.x
240. Verberg, M. F. G., Macklon, N. S., Nargund, G., Frydman, R., Devroey, P., Broekmans, F. J., & Fauser, B. C. J. M. (2009). Mild ovarian stimulation for IVF. *Human Reproduction Update*, 15(1), 13-29. doi:10.1093/humupd/dmn056
241. Verona, B., Czeromin, U., Daniel, F., Friese, K., Gnoth, C., Kruessel, J., . . . Andreas, T.-S. (2020). D·I·R Annual 2019. *Journal fur Reproduktionsmedizin und Endokrinologie*, 17, 196-239.
242. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of art laboratory performance indicators†‡. (2017). *Human Reproduction Open*, 2017(2). doi:10.1093/hropen/hox011
243. Von Baer, K. E. (1827). *De ovi mammalium et hominis genesi: epistolam ad Academiam Imperialem Scientiarum Petropolitanam: sumptibus Leopoldi Vossii.*

244. Waisberg, E., Ong, J., Masalkhi, M., Kamran, S. A., Zaman, N., Sarker, P., . . . Tavakkoli, A. (2023). GPT-4: a new era of artificial intelligence in medicine. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*. doi:10.1007/s11845-023-03377-8
245. Wang, A., Kort, J., Behr, B., & Westphal, L. M. (2018). Euploidy in relation to blastocyst sex and morphology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 35*(9), 1565-1572. doi:10.1007/s10815-018-1262-x
246. Wang, J., Sun, X., Yang, Z., Li, S., Wang, Y., Ren, R., . . . Yu, D. (2023). Epigenetic regulation in premature ovarian failure: A literature review. *Frontiers in Physiology, 13*, 998424.
247. Wang, L., Tang, J., Wang, L., Tan, F., Song, H., Zhou, J., & Li, F. (2021). Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *Journal of Cellular Physiology, 236*(12), 7966-7983. doi:<https://doi.org/10.1002/jcp.30468>
248. Wang, X., Wang, L., & Xiang, W. (2023). Mechanisms of ovarian aging in women: a review. *Journal of Ovarian Research, 16*(1), 1-22.
249. Weghofer, A., Kushnir, V. A., Darmon, S. K., Jafri, H., Lazzaroni-Tealdi, E., Zhang, L., . . . Gleicher, N. (2019). Age, body weight and ovarian function affect oocyte size and morphology in non-PCOS patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *PLOS ONE, 14*(10), e0222390. doi:10.1371/journal.pone.0222390
250. Wilding, M., Di Matteo, L., D'Andretti, S., Montanaro, N., Capobianco, C., & Dale, B. (2007). An oocyte score for use in assisted reproduction. *Journal of assisted reproduction and genetics, 24*(8), 350-358. doi:10.1007/s10815-007-9143-8
251. Wood, L., & Cutting, R. (2022). Quality Management Requirements for Oocyte Collection. *Manual of Oocyte Retrieval and Preparation in Human Assisted Reproduction, 76*.
252. Wright, K. P., Trimarchi, J. R., Allsworth, J., & Keefe, D. (2006). The effect of female tobacco smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod, 21*(11), 2930-2934. doi:10.1093/humrep/del269
253. Wu, F. S.-Y., Weng, S.-P., Shen, M.-S., Ma, P.-C., Wu, P.-K., & Lee, N.-C. (2021). Suboptimal trophoctoderm mitochondrial DNA level is associated with delayed blastocyst development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 38*(3), 587-594. doi:10.1007/s10815-020-02045-5
254. Xia, P. (1997). Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod, 12*(8), 1750-1755. doi:10.1093/humrep/12.8.1750
255. Xiong, S., Han, W., Liu, W., Wu, L., Liu, J. X., Gao, Y., & Huang, G. (2018). Developmental potential of embryos from cycles containing oocytes with severe ovoid zona pellucida. *Human Fertility, 21*(3), 204-211. doi:10.1080/14647273.2017.1324181
256. Xu, B., Guo, N., Zhang, X.-m., Shi, W., Tong, X.-h., Iqbal, F., & Liu, Y.-s. (2015). Oocyte quality is decreased in women with minimal or mild endometriosis. *Scientific reports, 5*, 10779-10779. doi:10.1038/srep10779
257. Xu, H., Deng, K., Luo, Q., Chen, J., Zhang, X., Wang, X., . . . Zhang, C. (2016). High Serum FSH is Associated with Brown Oocyte Formation and a Lower Pregnancy Rate in Human IVF Parctice. *Cellular Physiology and Biochemistry, 39*(2), 677-684. doi:10.1159/000445658

258. Xu, H., Deng, K., Luo, Q., Diao, H., Zhang, X., & Zhang, C. (2016). Causes of brown oocyte formation and the impact on the pregnancy outcome in in vitro fertilization and embryo transfer. *37*, 258-261 and 264. doi:10.14188/j.1671-8852.2016.02.020
259. Xu, X., & Yang, M. (2021). Effects of Environmental EDCs on Oocyte Quality, Embryo Development, and the Outcome in Human IVF Process. In H. Zhang & J. Yan (Eds.), *Environment and Female Reproductive Health* (pp. 181-202). Singapore: Springer Singapore.
260. Yang, G., Yao, G., Xu, Z., Fan, H., Liu, X., He, J., . . . He, Q. (2021). Expression level of ADAMTS1 in granulosa cells of PCOS patients is related to granulosa cell function, oocyte quality, and embryo development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 647522.
261. Yeste, M., Jones, C., Amdani, S. N., Patel, S., & Coward, K. (2016). Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? *Hum Reprod Update*, *22*(1), 23-47. doi:10.1093/humupd/dmv040
262. Yi, X.-f., Xi, H.-L., Zhang, S.-L., & Yang, J. (2019). Relationship between the positions of cytoplasmic granulation and the oocytes developmental potential in human. *Scientific Reports*, *9*(1), 7215. doi:10.1038/s41598-019-43757-8
263. Younis, J. S. (2022). Is oocyte quality impaired in cases with ovarian endometriosis? a second look into the clinical setting. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 921032.
264. Yu, E. J., Ahn, H., Lee, J. M., Jee, B. C., & Kim, S. H. (2015). Fertilization and embryo quality of mature oocytes with specific morphological abnormalities. *Clinical and experimental reproductive medicine*, *42*(4), 156-162. doi:10.5653/cerm.2015.42.4.156
265. Zhang, J. J., Liu, X., Chen, L., Zhang, S., Zhang, X., Hao, C., & Miao, Y. L. (2020). Advanced maternal age alters expression of maternal effect genes that are essential for human oocyte quality. *Aging (Albany NY)*, *12*(4), 3950-3961. doi:10.18632/aging.102864
266. Zhang, L., Zeng, L., Liu, H., Jia, H., Wu, Y., & He, C. (2022). Effects of Oocyte Cytoplasmic Central Granulation on Embryonic Development, Blastocyst Formation, and Pregnancy Outcome in Assisted Reproductive Technology and Its Mechanism. *Cellular and Molecular Biology*, *68*(5), 161-169.
267. Zhang, Q., Guo, X. M., & Li, Y. (2016). Optimal polar bodies angle for higher subsequent embryo viability: a pilot study. *Fertility and sterility*, *105*(3), 670-675.e672. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.009
268. Zhang, Y.-L., Zheng, W., Ren, P., Jin, J., Hu, Z., Liu, Q., . . . Tong, X. (2022). Biallelic variants in MOS cause large polar body in oocyte and human female infertility. *Human Reproduction*, *37*(8), 1932-1944. doi:10.1093/humrep/deac120