



Софийски Университет – „Св. Климент Охридски“

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра – „Цитология, хистология и ембриология“

Любослава Димитрова Вълкова

**Оценка и оптимизиране на витрификацията  
при човешки предимплантационни ембриони  
и яйцеклетки**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен  
„доктор“

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

шифър на специалността 4.3 Биологически науки

Клетъчна биология

**Научни ръководители:**

**Проф. д-р Атанас Щерев, дм**

**и**

**Чл.кор. проф. дбн Румен Панков**

София 2020

Дисертационният труд е написан на 129 страници, съдържа 31 фигури, 34 таблици и 7 приложения. Използвани са 274 литературни източника. Номерата на таблиците, фигурите и цитиранията в автореферата не съответстват на тези в дисертационния труд. Всички пациенти са третирани в САГБАЛ д-р Щерев – София, където са получени, обработвани, криопрезервирани чрез витрификация, съхранявани и размразени анализираниите ембриони и яйцеклетки.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

- ART асистиран репродуктивни технологии
- AX асистиран хетчинг
- AXL асистиран хетчинг с лазер
- ET ембриотрансфер
- ИК изкуствен колапс
- КБ клинични бременности
- КОК кумулушно-ооцитен комплекс
- КОХ контролирана овариална хиперстимулация
- нPET неизвършване на PET - поради лоша преживяемост на размразените ембриони, cancelation rate
- PET размразен ембриотрансфер
- hCG човешки хорионгонадотропин
- HSA човешки серумен албумин, human serum albumin
- ICSI intracytoplasmic sperm injection, интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид
- IVF in vitro fertilization, *in vitro* оплождане
- IVM *in vitro* матурация
- NA not analyzed , не е изследван
- OHSS овариален хиперстимулационен синдром
- PESA percutaneous epididymal sperm aspiration
- PGD preimplantation genetic diagnosis, предимплантационна генетична диагностика
- PGS preimplantation genetic screening, предимплантационен генетичен скрининг
- PGT-A preimplantation genetic testing for aneuploidies, предимплантационен генетичен тест за анеуплоидии
- PGT-M preimplantation genetic testing for single gene / monogenic disorders, предимплантационен генетичен тест за моногенни заболявания
- TESE testicular sperm aspiration

## ВЪВЕДЕНИЕ

Техниките за замразяване са част от асистираните репродуктивни технологии (АРТ), като все повече се увеличават областите на тяхното приложение. В определени случаи чрез тях се улесняват дейностите, а в други, извършването на асистирана репродукция зависи изцяло от тях. Наблюдава се съществена разлика по отношение на възможностите за замразяване на двата вида гаметите - мъжки и женски, както и на предимплантационните ембриони. Замразяването и размразяването на сперматозоиди е рутинен метод, доказал ефикасността и безопасността си, докато замразяването на яйцеклетки се оказва по-трудна задача, и до момента търпи подобрения с цел постигането на по-добри резултати.

Замразяването и съхранението на яйцеклетки или криопрезервацията на яйцеклетки се налага в различни случаи, като затруднения в еякулацията или при азооспермия на партньора в деня на фоликуларната пункция. От изключителна важност е при млади нераждали жени без партньор, страдащи от заболяване, което налага лъче- или химиотерапия, която в голяма част от случаите довежда до загубване на яйчниковата функция, а от там и до стерилитет. Съхранението на яйцеклетки дава шанс за реализиране на бременност в по-късен етап, след успешно приключване на лечението. Все по-често, в развитите страни, където младите жени имат желание и възможност за професионална реализация, се използва замразяването на яйцеклетки, с цел отлагане на репродукцията - явление означавано с термина избирателно запазване на фертилитета или запазване на фертилитета по немедицински причини (*elective fertility preservation (EFP), fertility preservation for non-medical reasons*). Друга причина за криопрезервация на яйцеклетки е при използването на донорски яйцеклетки за хетероложна употреба при реципиентки, които не образуват собствени яйцеклетки или не трябва да използват собствените си поради лошо качество, генетични заболявания или друга причина. Съхранявайки донорски яйцеклетки се улеснява процедурата, съкращава се периодът на изчакване и се избягва нуждата от синхронизация на менструалните цикли между донора и реципиента на яйцеклетки.

При АРТ, извършването на оплождане на яйцеклетките чрез класическо *in vitro* оплождане или интрацитоплазменото инжектиране на сперматозоид води, в част от случаите, до по-голям брой ембриони, отколкото се трансферират в матката на пациентката. Замразяването на нетрансферирани ембриони, осигурява съхранението им, предоставяйки шанс за нов опит при неуспех или, при желание за следваща

бременност, избягвайки хормоналната стимулация и фоликуларната пункция. В определени случаи извършването на ембриотрансфер е противопоказно поради риск от развитие на овариален хиперстимуляционен синдром (OHSS), което представлява усложнение при асистирания репродукция, което включва увеличаване на яйчниците и преминаване на течност от интраваскуларното пространство към различни органи поради повишената пропускливост на капилярите. При възникнал полип в кухината на матката по време на хормоналната стимулация, поява на маточно кървене, невъзможност за проникване в матката е препоръчително отново да не се прилага ембриотрансфер. В описаните случаи замразяването на ембрионите е единственият шанс за използването им в по-късен етап. Криопрезервацията на всички ембриони с добро качество, без извършване на свеж ембриотрансфер, и последващото им използване след размразяване е известно като freeze all програма или freeze all стратегия. От изключително важно значение е възможността за успешна криопрезервация при необходимост от прилагане на генетичен анализ на получените ембриони. Той включва: предимплантационна генетична диагностика (PGD) и предимплантационен генетичен скрининг (PGS), които вече се наричат, съответно PGT-M - предимплантационна генетична диагностика за моногенни заболявания и PGT-A-предимплантационна генетична диагностика за анеуплоидии. Процесът включва биопсия на клетки от ембрионите на ден пети и извършване на генетичен анализ на тези клетки. За процедурата са необходими няколко дни, което налага замразяване на ембрионите. Те се витрифицират и се използват в последващ менструален цикъл на пациентката, след получаването на резултатите.

Различни клинични и ембриологични фактори могат да оказват влияние върху замразяването и размразяването на яйцеклетки и ембриони, както и върху реализираните бременности. Настоящата дисертация има за цел да анализира такива параметри, да определи ефекта им върху резултата от криопрезервацията, което да бъде използвано за оптимизирането ѝ. Данните биха дали по-обстойна информация, което ще е от важно значение за успешната терапия на пациентите.

Оптимизирането на криопрезервационните методи за яйцеклетки и ембриони, ще доведе до по-голяма сигурност за пациентите, по-добри резултати след прилагане на ART, и повече родени здрави деца.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Цел на настоящия дисертационен труд е да се направи обстоен анализ, на базата на собствени резултати, на криопрезервационния метод „витрификация“ и да се оптимизира процесът при човешки предимплантационни ембриони и яйцеклетки.

Така поставената цел предполагаше решаването на следните задачи:

### **1. Да се установи преживяемостта след размразяване на човешки предимплантационни ембриони замразени чрез витрификация в зависимост от:**

- а) Качеството на ембрионите преди замразяване;
- б) Възрастта на пациентката;
- в) Метода за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI;
- г) Деня от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията;
- д) Типа на инфертилитета - първичен или вторичен;
- е) Срока за съхранение на ембрионите;
- ж) Прилагането на ко-култивиране на ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията;
- з) Прилагане на отворена и затворена система за витрификация;
- и) Извършване на изкуствен колапс (artificial collapse) преди витрификацията.

### **2. Да се установи процентът реализирани клинични бременности (КБ) спрямо:**

- а) Качеството на ембрионите преди замразяване;
- б) Възрастта на пациентката;
- в) Метода за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI;
- г) Деня от развитието на ембрионите, на който е извършена а витрификацията;
- д) Типа на инфертилитета - първичен или вторичен;
- е) Срока за съхранение на ембрионите;
- ж) Прилагането на ко-култивиране на ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията;
- з) Прилагане на отворена и затворена система за витрификация;
- и) Броя трансферираните ембриони;
- й) Преживяемостта на трансферираните ембриони;
- к) Прилагане на асистиран хетчинг (асистирано излюпване) след размразяването на ембрионите преди PET;
- л) Извършването на изкуствен колапс преди витрификацията на бластоцистите.

### **3. Да се анализира преживяемостта на ембрионите и развиващите се клинични бременности в случаите, когато не се извършва свеж ембриотрансфер, а всички**

**развиващи се ембриони се замразяват и се използват в последващ размразен ембриотрансфер (“freeze all” програма или стратегия).**

**4. Да се оцени и оптимизира ефективността на витрификацията при замразяване на яйцеклетки.**

- а) Оценка на преживяемостта им след размразяване;**
- б) Оценка на оплождането и развитието на получените ембриони.**

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **Клиничен материал**

В изследването бяха включени 2453 предимплантационни човешки ембриони. Изследваните цикли PGT бяха 941, при 844 пациентки.

### **Методи**

#### **Класическо *in vitro* оплождане (IVF)**

**Денудация (оронване) на яйцеклетките и интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (ICSI)**

**Комбинация от двата метода за оплождане на яйцеклетките (IVF/ICSI)**

**Биопсия за изолиране на автоложни ендометриални клетки**

**Ко-култивиране на ембриони с автоложни ендометриални клетки преди витрификацията**

**Свеж ембриотрансфер (ET)**

**Изкуствен колапс (ИК)**

**Витрификация и размразяване на предимплантационни ембриони**

**Витрификация и размразяване на яйцеклетки**

**Размразен ембриотрансфер (PET)**

## **РЕЗУЛТАТИ**

**Отчитане на преживяемостта на човешки предимплантационни ембриони след витрификация**

Преживелите след размразяване бластомери имат характеристиките на незамразяваните - прозрачен вителус и правилна форма на клетката. Непреживелите, са тъмни, с неясни очертания. Salumets и съавтори (1) разделят ембрионите на три групи след размразяването: 100% преживели, частично увредени (преживели над 50% от клетките) и дегенерирани (преживели под 50% от клетките). В нашето проучване бяха образувани четири групи. След размразяване в зависимост от преживяемостта те бяха:

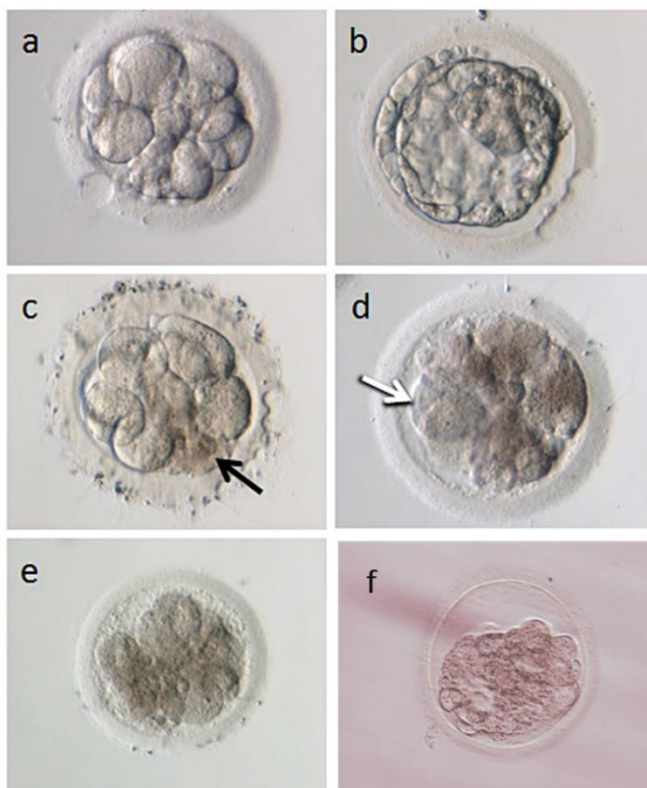
Група I (Интактни ембриони) беше наблюдавана 100% преживяемост след размразяване. Всички клетки на дялящия се ембрион или на бластоциста бяха преживели витрификацията и размразяването (Фиг. 1 а и b).

Група II (Ембриони с преживели над 50% от клетките) представлява добра преживяемост, като малка част от клетките на ембрионите не са преживели витрификацията и размразяването (Фиг. 1c).

Група III (Ембриони с преживели под 50% от клетките) в нея е отчетена лоша преживяемост, по-голямата част от клетките са загинали по време на криопрезервацията (Фиг. 1d).

Група IV (Дегенерирани ембриони), в нея са включени ембрионите, при които не се наблюдава преживяемост на клетките. Определя се и като нула (0) % или липса на преживяемост (Фиг. 1e и f).

За добра преживяемост бяха приемани група I и II (Фиг. 1 а, b и c).



**Фигура 1.** Морфология на размразените ембриони. Представители на ембриони от група I са показани на панели а и b. а) интактен (напълно преживял) ембрион на ден 3 и b) интактен (напълно преживял) ембрион на ден 5 (бластоцист). На панели c и d са представени ембриони от група II и III: c) ембрион с 90% преживяемост (група II) и d) ембрион с 14% преживяемост на бластомерите (група III). Последните два панела са на ембриони от група IV: e) ембрион на ден 3 без преживели бластомери и f) непреживял бластоцист. Черната стрелка показва позицията на непреживял бластомер, а бялата стрелка – преживял бластомер. Увеличение 200x, Hoffman modulation contrast



Беше изчислявана и обща преживяемост. Тя представлява всички ембриони, преживели размразяването напълно или частично, включват се групите I, II, и III. От общата преживяемост бяха изключвани само напълно непреживелите (дегенерирали) ембриони (Група IV). На анализ бяха подложени общо 2453 размразени ембриони, замразени чрез витрификация. Изчислената преживяемост на анализирани ембриони е представена в таблица 1.

**Таблица 1. Преживяемост на витрифицирани ембриони след размразяване**

Брой ембриони	Обща преживяемост брой и %	Интактни ембриони (Група I) брой и %	Преживяемост над 50% от клетките (Група II) брой и %	Преживяемост под 50% от клетките (Група III) брой и %	Дегенерирали ембриони (Група IV) брой и %
2453	2093	995	616	482	360
	85,3 %	40,6 %	25,1 %	19,6 %	14,7 %

Беше проверено влиянието на определени изходни параметри върху преживяемостта на витрифицираните ембриони след размразяване (Табл. 2).

**Таблица 2. Изследвани параметри при прилагане на витрификация**

Изследван параметър	Брой размразени и анализирани ембриони
Качеството на ембрионите преди замразяване	1460
Възрастта на пациентката	1460
Метода за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI	1148
Деня от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията	1460
След модифицирането на метода за витрификация на ден пети	452
Типа на инфертилитета - първичен или вторичен	1460
Срока за съхранение на ембрионите	1460
Прилагането на ко-култивиране на ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията	32
Прилагане на отворена и затворена система за витрификация	311
Извършването на изкуствен колапс на бластоцистите преди витрификацията	937

## **Качеството на ембрионите преди замразяване**

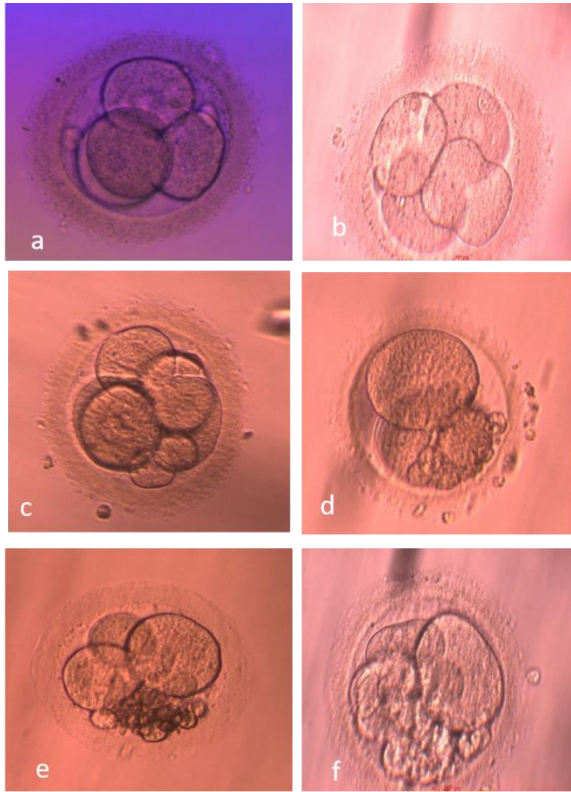
При началното си развитие човешките ембриони не винаги преминават синхронно разделяне, водещо до четен брой бластомери - 2,4,6,8,10. Нерядко се наблюдават нечетен брой клетки – 3,5,7,9, което намалява качеството на ембрионите, но не е причина тези ембриони да не се трансферират, понеже те също биха могли да доведат до бременност. При оценката на качеството на ембрионите важен показател е броят и видът на бластомерите до ден трети. Качеството на ембрионите на ден четвърти, пети и шести ден се определя на база на съответни характеристики описани по-долу. Друг параметър, касаещ качеството на ембрионите на всеки ден от развитието им е отсъствието или наличието на фрагментация, както и процентът ѝ спрямо обема на ембриона. Тя представлява малки цитоплазматични части без генетичен материал, получени вследствие на деленето на ембрионите. Оказва негативно влияние, когато е над 15-20 % от обема на ембриона. Отчитайки всички характеристики на ембрионите те могат да бъдат с максимално (top quality), добро (good quality) или лошо качество (poor quality) за съответния ден. В деня на замразяване на база на оценката на ембрионите, които витрифицирахме те бяха разделяни на такива: с максимално, добро или лошо качество. Не бяха криопрезервирани зиготи (ден първи), а само делящи се ембриони от втори до шести ден.

### **Ден втори (Фиг. 2):**

Като ембриони с максимално качество на ден втори се определят: ембриони с четири бластомери (клетки) без фрагментация;

С добро качество са ембриони на два, три или пет бластомери без или с до 10% фрагментация;

Разделените на повече бластомери с различна големина и/или с над 20% фрагментация представляват ембриони с лошо качество;



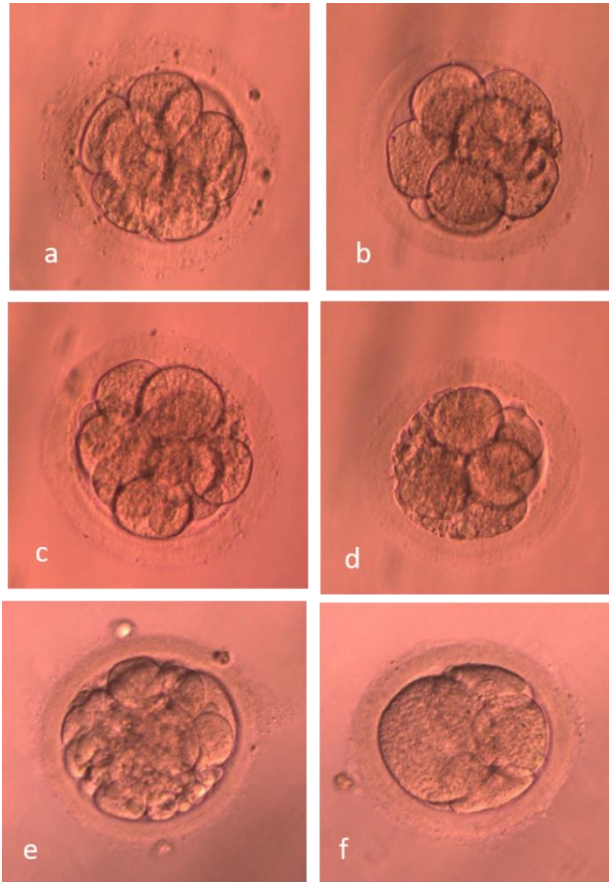
**Фигура 2.** Ембриони на ден втори от *in vitro* развитието им. Представени са двудневни ембриони с различно качество. Панели а и b са ембриони с максимално качество. Панели с и d са ембриони с добро качество. На панели е и f се виждат ембриони с лошо качество. Увеличение 200 x, Hoffman modulation contrast

- **Ден трети (Фиг. 3):**

С максимално качество на ден 3 са ембриони разделени на 7-10 бластомери и под 10% фрагментация ;

Ембриони с добро качество на този ден са ембриони на 6 бластомери и под 10% фрагментация или 7-10 бластомери и 10-20% фрагментация;

Като ембриони с лошо качество се определят тези под 4 бластомери или над 20% фрагментация;



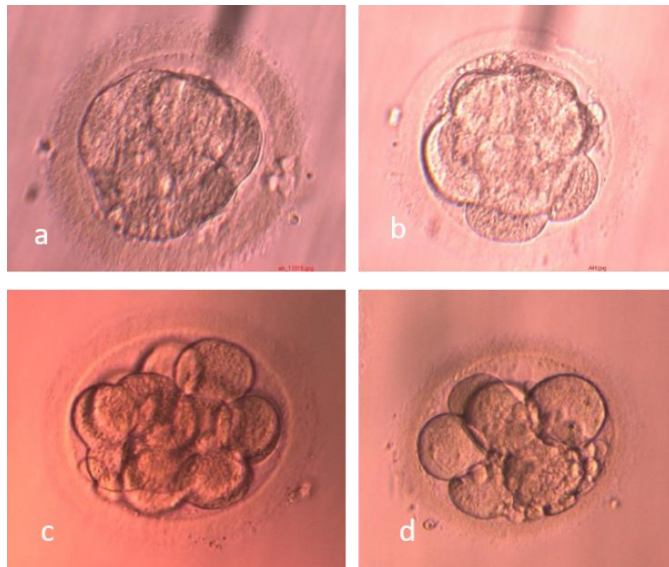
**Фигура 3.** Ембриони на ден трети от *in vitro* развитието им. Представени са тридневни ембриони с различно качество. Панели а и b са ембриони с максимално качество. Панели с и d са ембриони с добро качество. На панели е и f се намират ембриони с лошо качество. Увеличение 200 x, Hoffman modulation contrast

- **Ден четвърти (Фиг.4):**

На ден 4 с максимално качество са ембрионите на стадий компактна морула с под 10% фрагментация. Този стадий представлява компактна структура, в резултат на скъсяване на разстоянията между клетките. В нея трябва да са включени всичките от 16 до 32 бластомера, характерни за стадий морула.

Морула или компактна морула с 10%-20% фрагментация се определят като ембриони с добро качество;

Ембрионите до осем бластомери или с над 20% фрагментация са с лошо качество;



**Фигура 4.** Ембриони на ден четвърти от *in vitro* развитието им. Представени са четиридневни ембриони с различно качество. Панели а и b са ембриони с максимално качество. Панел с е ембрион с добро качество. На панел d се намира ембрион с лошо качество. Увеличение 200 x, Hoffman modulation contrast

- **Ден пети (Фиг. 5):**

На ден пети развиващите се ембриони би трябвало да бъдат бластоцисти, при които да се разграничат ембриобласт (ICM), от който се развива същинския ембрион, и трофобластни клетки (трофектодерм), даващи началото на плацентата. Беше използвана схемата на Gardner и Schoolcraft (2) за оценка на бластоцистите. По нея бяха разграничавани:

ранен бластоцист – когато бластоцелът е по-малък от половината от обема на ембриона;

бластоцист - бластоцелът е по-голям или равен на половината от ембриона;

пълнен бластоцист - бластоцелът изпълва целия ембрион;

експандиран бластоцист – обемът на бластоциста се увеличава и зона пелуцида започва да изтънява;

излюпващ се бластоцист – бластоцистът започва да се излиза през обвивката на ембриона (зона пелуцида) ;

От своя страна ембриобластът (ICM) и трофектодермът бяха оценявани по следната схема:

- ICM:

A. Много клетки, плътно прилепени в структура, приличаща на топка ;

B. Недостатъчно количество клетки, групирани на места;

С. Съставен от малко клетки.

-Трофоектодерм:

А. Много клетки, плътно разположени една до друга в един слой;

В. Малко клетки разположени в един слой;

С. Много малко клетки, неспособни да образуват плътен слой (3).

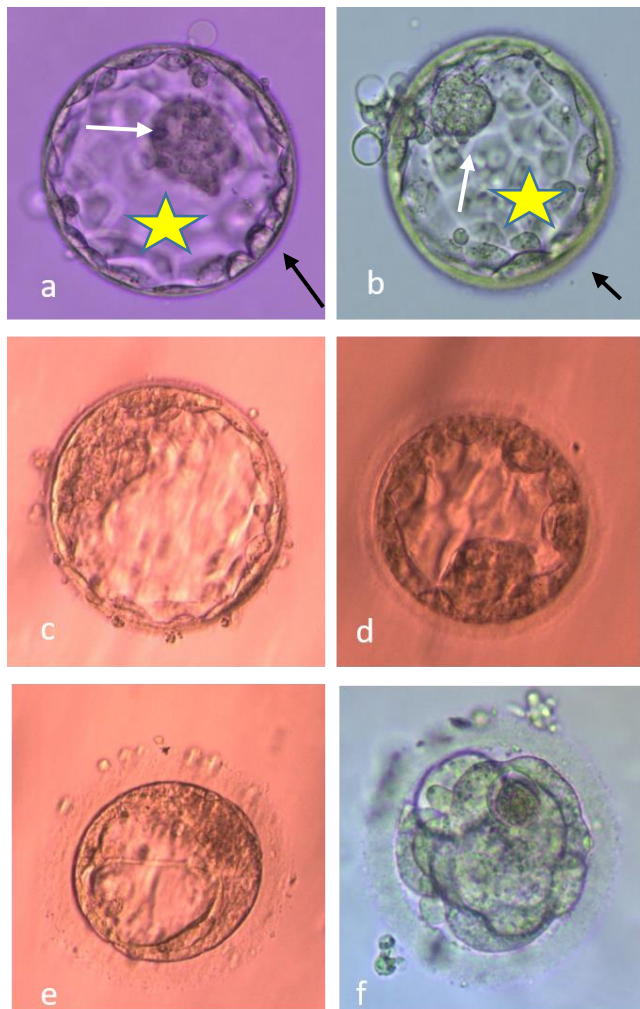
Освен описаните бластоцисти на ден пети бяха наблюдавани компактна морула и ембриони на клетъчен стадий, поради по-бавното им развитие.

Като ембриони с максимално качество бяха определяни: излюпващ се бластоцист, експандиран бластоцист с ICM и трофоектодерм тип А и В, както и пълен бластоцист с <10% фрагментация.

С добро качество – експандиран бластоцист с ICM и трофоектодерм тип С, бластоцист, ранен бластоцист и пълна компактизация без или с 10-20 % фрагментация.

За ембриони с лошо качество бяха считани такива, с по-бавно развитие: с начална или незапочнала компактизация или с > 20% фрагментация.

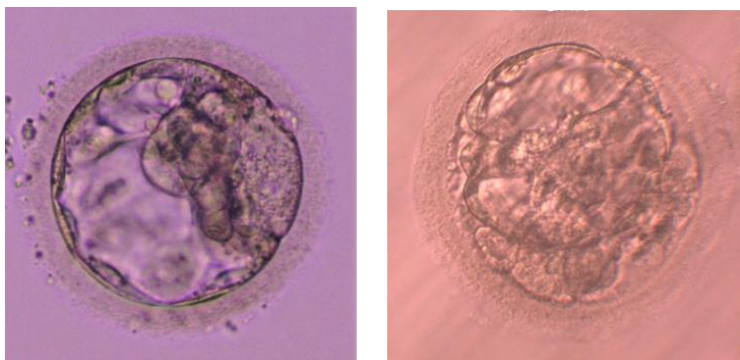
Част от пълните, експандираните и излюпващите се бластоцисти бяха предварително подготвяни за витрификация, чрез извършване на изкуствен колапс.



**Фигура 5.** Ембриони на ден пети от *in vitro* развитието им. Представени са петдневни ембриони (бластоцисти) с различно качество. Панели а и б са бластоцисти с максимално качество. Панели с и d са бластоцисти с добро качество. На панели е и f се виждат ембриони с лошо качество. Бялата стрелка показва ембриобласта (ICM). Черната стрелка показва трофектодерма. Жълтата звезда показва бластоцела. Увеличение 200 х, Hoffman modulation contrast

- **Ден шести** (Фиг. 6):

До ден шести бяха култивирани ембриони, които на ден пети бяха с по-бавен темп на растеж. Тези, които продължаваха развитието си до стадий бластоцист бяха замразявани на ден шести.



**Фигура 6.** Ембриони на ден шести от *in vitro* развитието им. Увеличение 200 х, Hoffman modulation contrast

За определяне на влиянието на качеството преди замразяване върху преживяемостта след размразяване бяха изследвани 1460 ембриони.

На база на качеството на ембрионите от *in vitro* развитието им за съответния ден, на който беше проведена криопрезервацията и преживяемостта им след размразяване бяха образувани три групи представени в таблица 3.

**Таблица 3. Преживяемост на ембрионите в зависимост от качеството им преди замразяване**

Качество на ембрионите преди замразяване	Брой ембриони	Обща преживяемост брой	Обща преживяемост %	Интактни ембриони брой	Интактни ембриони %
Максимално	703	586	83,4%	267	38%
Добро	587	497	84,7%	223	38%
Лошо	170	130	76,5%	39	22,9%

При сравнение на общата преживяемост между ембриони с максимално и добро качество не беше установена статистическа значимост ( $P=0,5$ ) докато при сравнение на ембрионите с лошо качество и тези от групите с максимално ( $P=0,04$ ) и добро ( $P=0,01$ ) качество, резултатът е значим. Подобни корелации, но с още по висока статистическа значимост бяха установени и при сравнение на процентите интактни ембриони –  $P=0,0002$  при сравнение между групата с лошо и максимално качество и  $P=0,0003$  при сравнение между ембрионите с лошо и добро качество.



### Възрастта на пациентката

Бяха оценени 1460 ембриони и разделени в зависимост от възрастта на пациентките на две групи: пациентки  $\leq 35$  години и  $\geq 36$  години по време на извършването на асистираната репродукция. В първата група ( $\leq 35$  години) броят на ембрионите беше 1199, а втората възрастова група ( $\geq 36$  години), включваше 261 ембриони. Преживяемостта е представена в таблица 4.

**Таблица 4. Възрастта на пациентките и преживяемост на ембрионите след размразяване**

Възраст	Брой размразени ембриони	Обща преживяемост брой и (%)	Интактни ембриони брой и (%)	Преживели ембриони с над 50 % от клетките брой и (%)
$\leq 35$ години	1199	1001 (83,5%)	431 (35,9%)	301 (25,1%)
$\geq 36$ години	261	220 (84,3%)	98 (37,5%)	62 (23,8%)

Не беше отчетена разлика в процентите обща преживяемост след размразяване ( $P=0,8$ ), както и в процентите интактни ембриони ( $P=0,6$ ) в зависимост от възрастта на пациентката.

### Метода за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI

Използваните методи за оплождане на яйцеклетките бяха класическо *in vitro* оплождане (IVF) и интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (ICSI). Беше анализирана преживяемостта на 1148 криопрезервирани и размразени ембриони в зависимост от метода на оплождане на яйцеклетките (Табл. 5).

**Таблица 5. Преживяемост на ембрионите според метода на оплождане на яйцеклетките**

Метод	Брой размразени ембриони	Обща преживяемост брой и (%)	Интактни ембриони брой и (%)	Преживели ембриони с над 50 % от клетките брой и (%)
IVF	585	490 (83,8%)	214 (36,6%)	144 (24,6%)
ICSI	563	461 (81,9%)	195 (34,6%)	139 (24,7%)

В зависимост от използвания метод за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI, не беше наблюдавана разлика в преживяемостта след размразяване на ембрионите (P=0,4).

#### **Деня от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията**

Изследвани от нас бяха 1460 ембриони, замразявани на различни дни от *in vitro* развитието им: от ден втори до ден шести включително (Табл.6). След провеждане на свеж ЕТ, оставащите ембриони бяха замразявани чрез витрификация в същия ден. Предпочитаните за свеж ЕТ дни бяха трети и пети ден, затова броят на замразените ембрионите на споменатите дни беше много по-голям в сравнение с втори, четвърти и шести ден.

**Таблица 6. Преживяемост на витрифицирани ембриони след размразяване спрямо деня от *in vitro* култивирането им**

Ден на замразяване на ембрионите от <i>in vitro</i> развитието	Брой размразени ембриони	Обща преживяемост брой и (%)	Интактни ембриони брой и (%)	Преживели ембриони с над 50 % от клетките брой и (%)	Преживели ембриони с под 50 % от клетките брой и (%)
Ден 2	29	24 (82,8%)	15 (51,7%)	5 (17,2%)	4 (13,8%)
Ден 3	771	649 (84,2%)	280 (36,3%)	186 (24,1%)	183 (23,7%)
Ден 4	191	157 (82,2%)	62 (32,5%)	54 (28,3%)	41 (21,5%)
Ден 5	452	379 (83,8%)	167 (36,9%)	113 (25%)	99 (21,9%)
Ден 6	17	12 (70,6%)	5 (29,4%)	5 (29,4%)	2 (11,8%)

Не беше установена статистически достоверна разлика в преживяемостта на ембрионите след размразяване в зависимост от деня на развитие, на който е извършена витрификацията.

#### **Модифициране на метода за витрификация на ден пети**

В таблица 6 представените ембрионите на ден пети са криопрезервирани при използването на две различни концентрации на човешки серумен албумин в замразителните и размразителните разтвори. Първоначално беше използван 5% човешки серумен албумин. При тази концентрация беше получена преживяемост от 78,2% на бластоцистите (таблица 7). Въпреки липсата на статистически значима разлика в

преживяемостта на ембрионите на ден 5, тя беше по-ниска от желаната. Поради тази причина беше решено да приложим оптимизиране на витрификационния метод чрез двойно увеличаване на концентрацията на човешкия серумен албумин във витрификационните и размразителните разтвори. Целта беше да се установи дали по-високата концентрация на човешки серумен албумин има по-добра криопрезервационна функция и дали ще доведе до по-добра преживяемост след размразяване. Негативният ефект на криопрезервацията беше по-слабо изразен при развиващите се ембриони от другите дни на развитие, затова при тях не се наложи прилагането на модифицирания метод. За изследване на ефекта от увеличаването на концентрацията на човешки серумен албумин бяха анализирани 452 витрифицирани и размразени бластоцисти. От тях 193 бяха по метода без модификация, а 259 с вече модифицирания метод. Резултатите, които бяха получени са представени в таблица 7, където се вижда статистически значимо повишаване в общата преживяемост на ембрионите след модифициране на витрификационния метод.

**Таблица 7. Преживяемост на бластоцистите при използване на две различни концентрации на човешки серумен албумин във витрификационните и размразителните разтвори**

Концентрация на HSA	Брой размразени ембриони	Обща преживяемост брой	Обща преживяемост %	P value
Преди модификацията (5% HSA)	193	151	78,2%	P=0,005
След модификацията (10% HSA)	259	228	88%	

#### **Типа на инфертилитета - първичен или вторичен**

Поставихме си за цел да проверим влиянието на типа на инфертилитета върху преживяемостта на ембрионите. С първичен инфертилитет са жените без реализирана бременност. Вторичен инфертилитет представляват случаите на пациентки, които са

реализирали бременност, но опитвайки се да постигнат нова имат неуспех. Изследваните 1460 ембриони бяха разделени на две групи. От пациентки с първичен инфертилитет бяха анализирани 823 ембриони, докато при такива с вторичен ембрионите бяха 637. Няма разлика в средния брой замразени ембриони на пациентка в двете групи, който е 4,5 в случаите с първичен и 4,6 ембриона при тези с вторичен инфертилитет. Преживяемостта им е представена на таблица 8.

**Таблица 8. Преживяемост на ембрионите спрямо вида на инфертилитета**

Вид инфертилитет	Брой размразени ембриони	Обща преживяемост брой и (%)	P value	Интактни ембриони брой и (%)	P value
Първичен инфертилитет	823	683 (83%)	P=0,4	204 (24,8%)	P<0,0001
Вторичен инфертилитет	637	538 (84,5%)		231 (36,3%)	

Въпреки, че не беше отчетена разлика в общата преживяемост в зависимост от вида на инфертилитета (P=0,4), процентът на напълно преживелите след размразяване ембриони в случаите с вторичен инфертилитет е със статистическа значимост (P<0,0001).

#### **Срока за съхранение на ембрионите**

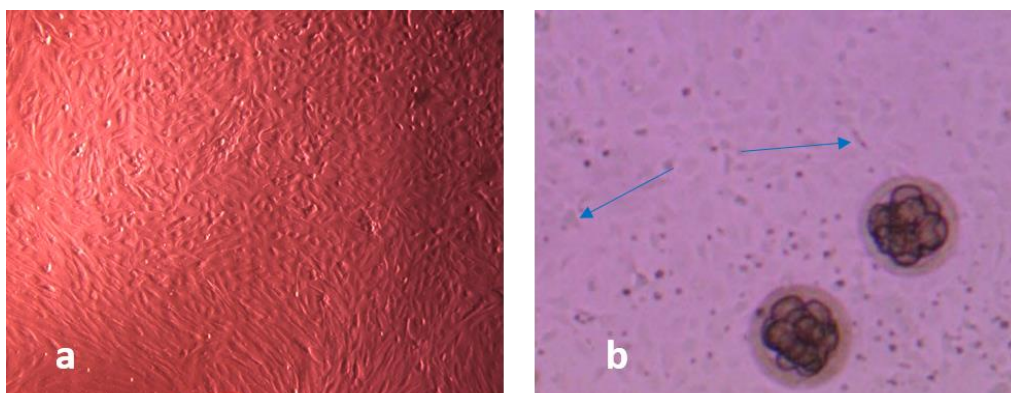
Съхранението на замразените ембриони беше в зависимост от желанието и нуждата на пациентите. Анализирана беше преживяемостта на 1460 ембриони съхранявани от 1 до 28 месеца. Спазвайки необходимите условия за съхранение и гарантирайки неповишаването на температурата беше проверено дали продължителното съхранение оказва негативно влияние върху ембрионите. Разделихме ембрионите на две групи: съхранявани в криобанката до 12 месеца (1366 ембриони) и съхранявани над 12 месеца (94 ембриони). Изчислената преживяемост е представена в таблица 9, където се отчита липса на разлика в двете групи.

**Таблица 9. Преживяемост на ембрионите при различен срок на съхранение**

Срок на съхранение	Брой размразени ембриони	Обща преживяемост брой и (%)	P value	Интактни ембриони брой и %	P value
До 12 м	1366	1139 (83,4%)	P=0,3	487 (35,7%)	P=0,08
Над 12 м	94	82 (87,2%)		42 (44,7%)	

## Прилагане на ко-култивиране на ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията

Анализирани бяха 32 витрифицирани ембриони, ко-култивирани предварително с автоложни ендометриални клетки (Фиг. 7).



**Фигура 7. Ендометриални клетки и ембриони ко-култивирани с тях.** Представени са: монослой от ендометриални клетки (а) и ембриони на ден трети от развитието им върху монослой от автоложни ендометриални клетки (b). Сините стрелки показват ендометриалните клетки. Увеличение 100 x, Hoffman modulation contrast

След размразяване преживяли бяха 26 ембриона (87,5%). Интактните ембриони бяха 14 (43,8%). Тези резултати показват сходна преживяемост с ембриони без ко-култивиране с автоложни ендометриални клетки, въпреки, че ко-култивиране се прилага в случаите с наличие на предишни IVF/ICSI опити, при които получените ембриони не са с добро качество. Изследваните ембриони бяха замразени на ден трети или пети от *in vitro* развитието им. Девет (28,1%) от тях бяха замразени на ден трети, а 23 (71,9%) на ден пети. Данните от преживяемостта в зависимост от деня на замразяване са представени в Таблица 10.

**Таблица 10. Ко-култивиране на ембриони с автоложни ендометриални клетки и преживяемост след размразяване**

Ден на замразяване	Размразени ембриони	Преживели ембриони брой	Обща преживяемост %	Интактни ембриони брой	Интактни ембриони %
Трети ден	9	8	88,9%	4	44,4%
Пети ден	23	20	87,0%	10	43,5%

## Прилагане на отворена и затворена система за витрификация

При затворена система за криопрезервация липсва пряк контакт между замразявания обект и течния азот. При нея ембрионите се поставят върху един носител, след което се прибират в допълнителна пура, която се запечатва. По този начин ембрионите не са в пряк контакт с течения азот. Използването на затворена система за витрификация гарантира по-голяма сигурност на замразените ембриони, като се избягва риска от заразяване на клетките от течния азот или от други клетки. Използването на външна пура, която се запечатва, удължава времето на замразяване, което би могло да доведе до намаляване на преживяемостта на ембрионите след размразяване. За да проверим влиянието върху преживяемостта на ембрионите в зависимост от системата за витрификация бяха изследвани 311 ембриони. От тях 158 бяха замразени в отворена и 153 ембриони в затворена система.

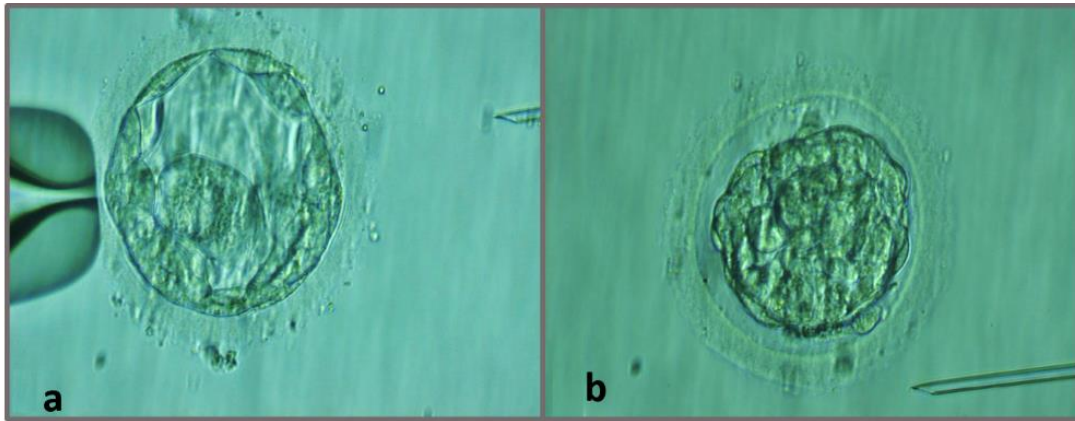
При изчисляване на преживяемостта (Табл. 11), тя беше без разлика в зависимост от използваната система за витрификация. При отворената преживелите ембриони бяха 136 (86,1%), а при затворената - 132, което представлява 86,3 % преживяемост ( $p=1$ ). Не беше отчетена разлика и по отношение на интактните ембриони ( $p=1$ ).

**Таблица 11. Преживяемост на ембрионите след приложение на отворена и затворена система за витрификация**

Вид система	Брой размразени ембриони	Обща преживяемост брой и (%)	Интактни ембриони брой и (%)	Преживели ембриони с над 50 % от клетките брой и (%)
Отворена система	158	136 (86,1%)	76 (48,1%)	41 (25,9%)
Затворена система	153	132 (86,3%)	80 (52,3%)	39 (25,5%)

## Извършване на изкуствен колапс на бластоцистите преди витрификацията

За подобряване на преживяемостта при витрификация на бластоцисти би могло да се приложи допълнителен метод - изкуствен колапс (ИК), за предварително премахване на течността от бластоцела и свиване на бластоциста с цел избягване образуването на кристали (Фиг. 8).



**Фигура 8. Бласцоцист преди и след ИК.** На панел а) се намира бласцоцист, с образуван бласцоцел преди ИК. След използване на инжекционна пипета за ИК се наблюдава колабирал (свит) бласцоцист (b). Увеличение 200 х, Hoffman modulation contrast

На 937 бласцоцисти беше извършен ИК преди замразяването. От тях 452 бяха без приложение на ИК, докато 485 бяха витрифицирани след предварително извършване на ИК. Резултатите в таблица 12 показват статистическо увеличение на общата преживяемост след прилагане на ИК: 85,2% спрямо 78,1% без предварителна подготовка на бласцоцистите (P=0,005).

**Таблица 12. Оценка на преживяемостта на витрифицирани бласцоцисти след размразяване в зависимост от приложението на изкуствен колапс преди замразяването**

Метод	Брой размразени бласцоцисти	Обща преживяемост брой	Обща преживяемост %	P value
Без изкуствен колапс (ИК)	452	353	78,10%	P=0,005
С изкуствен колапс (ИК)	485	413	85,20%	

**Реализирани клинични бременности (КБ) след прилагане на криопрезервационния метод витрификация и последващ размразен ембриотрансфер (PET).**

Успешното замразяване и добрата преживяемост на ембрионите след размразяване са важни за последващия размразен ембриотрансфер (PET). Той

представлява поставяне на криоконсервирани и размразени ембриони в маточната кухина на пациентката.

Цикъл РЕТ включва проследяване чрез ултразвукови прегледи и хормонално контролиране на развитието на ендометриума при пациентка, извършвано от акушер-гинеколог с последващо размразяване на ембрионите и РЕТ в подходящ ден от менструалния цикъл. Извършването на РЕТ се определя от преживяемостта на ембрионите. В случаите, когато всички размразени ембриони не са преживели, т.е са от IV група (0% преживяемост), въпреки предварителната подготовка, не се извършва РЕТ. Това беше определяно като неизвършване на РЕТ (нРЕТ). Това всъщност са анулирани цикли РЕТ (cancelation rate).

Анализирани в настоящата дисертация бяха общо 941 цикъла РЕТ, при 844 пациентки на възраст от 22 до 46 години. При някои от пациентките поради замразен по-голям брой ембриони се извършваха два или три РЕТ. Много важен показател при криопрезервацията на ембриони и последващ РЕТ е процентът реализирани клинични бременности (КБ). Друг важен маркер е процентът на случаите, когато не се извършва РЕТ (нРЕТ), поради лоша преживяемост на ембрионите. Ние установихме нРЕТ при 105 цикъла (11,2%). В останалите 836 цикъла бяха постигнати 299 КБ (35,8%). По този начин се определя процентът реализирани КБ спрямо извършен РЕТ. В таблица 13 са описани изследваните параметри и анализирани спрямо тях брой РЕТ.

**Таблица 13. Анализирани параметри при извършване на РЕТ**

<b>Анализиран параметър</b>	<b>Брой изследвани РЕТ</b>
Качество на ембрионите преди замразяване	372
Случаи на РЕТ със замразени ембриони с максимално качество	155
Възраст на пациентката	675
Метод на оплождане на яйцеклетките	372
Ден от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията	610
Витрификация на ден пети преди и след модифицирането на метода	126
Тип на инфертилитета - първичен или вторичен	372
Срок на съхранение на ембрионите	610



Брой на замразените ембриони	372
Прилагане на ко-култивиране на ембрионите с автоложни ендометриални клетки преди витрификацията	22
Използване на отворена и затворена система за витрификация	87
Използване на три различни витрификационни и размразителни среди	238
Бременности в зависимост от броя на трансферираните ембриони	605
Преживяемост на трансферираните ембрионите	610
Прилагане на асистиран хетчинг на ембрионите след размразяване преди РЕТ	229
Извършване на изкуствен колапс на бластоцистите преди витрификация	251

### Качеството на ембрионите преди замразяване

Беше направено сравнение на реализираните бременности в зависимост от качеството на ембрионите за съответния ден. Анализирани бяха 372 РЕТ в зависимост от качеството на ембрионите преди витрификация (Табл. 14).

**Таблица 14. КБ и нРЕТ спрямо качеството на ембрионите преди замразяване**

Качество на ембрионите преди замразяване	Брой изследвани РЕТ	Брой извършени РЕТ	Клинични бременности (КБ) брой и (%)	P value	Неизвършени РЕТ поради лоша преживяемост (нРЕТ) брой и (%)	P value
Максимално	155	141	28 (19,9%)	P=0,8 */**	14 (9,0%)	P=0,06 */**
Добро	164	138	29 (21,0%)	P=0,02 */***	26 (15,9%)	P<0,0001 */***
Лошо	53	33	1 (3,0%)	P=0,02 **/***	20 (37,7%)	P=0,0008 **/***

\*/\*\* сравнение на нРЕТ и КБ при РЕТ на ембриони с максимално и с добро качество

\*/\*\*\* сравнение на нРЕТ и КБ при РЕТ на ембриони с максимално и с лошо качество

\*\*/\*\*\* сравнение на нРЕТ и КБ при РЕТ на ембриони с добро и с лошо качество

Беше наблюдаван сходен процент бременности при РЕТ на ембриони с максимално или добро качество преди криоконсервацията (P=0,8). Не се отчита, статистически значима разлика (P=0,06) в нРЕТ, когато се сравняват ембриони с изходно максимално или добро качество. При замразяването на ембриони с лошо качество статистически се увеличават случаите с нРЕТ и намалява процентът КБ. НРЕТ достига до 37,7% при витрифицирани ембриони с изходно лошо качеството.

### Възрастта на пациентката

При изследване на 675 РЕТ на база на възрастта на пациентките бяха оформени две групи: Група 1, съдържаща РЕТ при пациентки  $\leq 35$  години и Група 2, пациентки  $\geq 36$  години по време на криопрезервацията (Табл. 15).

**Таблица 15. КБ и нРЕТ спрямо възрастта на пациентката по време на замразяването на ембрионите**

Възраст	Брой РЕТ	Брой извършени РЕТ	Клинични бременности (КБ) Брой и %	P value	нРЕТ брой и %	P value
Група 1	518	456	144 (31,6 %)	P=0,04	62 (12 %)	P=0,5
Група 2	157	135	30 (22,2 %)		22 (14 %)	

Получените резултати показват статистически по-висок процент КБ (P=0,04) в групата на по-младите пациенти, без да има разлика при канселираните РЕТ.

### Метод на оплождане на яйцеклетките

За получаването на ембриони, които по-късно бяха криоконсервирани, бяха използвани двата метода - класическо IVF и ICSI, както и комбинация от двата метода при една и съща пациентка (IVF/ICSI). В таблица 16 са представени резултатите по отношение на нРЕТ и реализираните КБ при анализиранияте 372 цикъла.

**Таблица 16. Метод за оплождане на яйцеклетките - КБ и нРЕТ**

Метод на оплождане	Брой изследвани РЕТ	Брой извършени РЕТ	Клинични бременности (КБ) брой	Клинични бременности (КБ) %	нРЕТ брой	нРЕТ %
IVF	139	123	23	18,7%	16	11,5 %
ICSI	163	129	19	14,7 %	34	20,9 %
IVF/ICSI	70	60	16	26,7%	10	14,3%

Отчетохме най-висок процент бременности при използването на комбинацията от двата метода IVF/ICSI. Не беше отчетена разлика при сравнение на IVF с ICSI (P=0,4), IVF с IVF/ICSI (P=0,2), както и между ICSI и IVF/ICSI (P=0,05).

#### **Деня от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията**

За оценка на влиянието на деня от развитието на ембрионите, които те бяха витрифицирани бяха изследвани 610 PЕТ с ембриони замразени от ден втори до ден шести включително.

Получените резултати (Табл. 17) показаха липса на статистическа разлика в процента реализирани КБ при сравнение на витрификация на ембриони на ден 2 с 3 (P=0,9) и ден 2 с 4 (P=0,6). При замразяване на ембриони на ден пети се достига до статистическо увеличаване на процента реализирани КБ в сравнение с ембриони замразени на ден трети (P=0,01) и ден четвърти (P=0,002). На ден шести не бяха реализирани клинични бременности.

**Таблица 17. КБ и нРЕТ в зависимост от деня от *in vitro* култивирането на ембрионите, на който е извършена витрификацията**

Ден на замразяване	Брой изследвани PЕТ	Брой извършени PЕТ	Клинични бременности (КБ) брой	Клинични бременности (КБ) %	нРЕТ брой	нРЕТ %
Ден 2	6	6	1	16,7 %	0	0 %
Ден 3	248	214	42	19,6 %	34	13,7 %
Ден 4	71	55	5	9,1 %	16	22,5 %
Ден 5	274	246	73	29,7 %	28	10,2 %
Ден 6	11	7	0	0 %	4	36,4 %

#### **Модифициране на метода за витрификация на ден пети**

Модификацията на метода за витрификация на бластоцисти, чрез увеличаване на концентрацията на човешкия серумен албумин, доведе до статистически значимо увеличение на преживяемостта на бластоцистите. По-тази причина бяха анализирани резултатите по отношение на процентите нРЕТ и КБ. Данните от изследваните 126 PЕТ са представени в таблица 18.

**Таблица 18. КБ и нРЕТ в зависимост от модификацията на метода за витрификация на бластоцисти**

Метод	Брой РЕТ	Брой извършени РЕТ	Клинични бременности (КБ) брой	Клинични бременности (КБ) %	нРЕТ брой	нРЕТ %
Преди модификацията (5% HSA)	54	47	8	19,1%	7	13,0%
След модификацията (10% HSA)	72	65	24	36,9%	7	9,7%

Наблюдава се статистически значимо увеличение ( $P=0,04$ ) на процента реализирани бременности след модификацията на метода за витрификация на бластоцисти.

#### **Типа на инфертилитета - първичен или вторичен**

При сравнение на нРЕТ и процента КБ в зависимост от типа на инфертилитета бяха разгледани 372 РЕТ (Табл. 19). Не беше открита статистически значима разлика, но беше наблюдаван по-нисък процент нРЕТ и по-висок процент бременности в случаите с вторичен инфертилитет.

**Таблица 19. Тип на инфертилитета - КБ и нРЕТ**

Вид инфертилитет	Брой РЕТ	Брой извършени РЕТ	Клинични бременности (КБ) брой и (%)	P value	нРЕТ брой и (%)	P value
Първичен	211	174	31 (17,8%)	P=0,8	37 (17,5%)	P=0,4
Вторичен	161	138	26 (18,8%)		23 (14,3%)	

#### **Срока на съхранение на ембрионите**

В таблица 20 са данните от 610 РЕТ, при които ембрионите бяха съхранявани от 1 до 54 месеца преди размразяването и използването им. Образувани бяха 2 групи: група

1 - използваните за PЕТ ембриони бяха съхранявани в течен азот до 12 месеца и група 2 - съхранението беше по-продължително - над 12 месеца.

**Таблица 20. КБ и нРЕТ в зависимост от срока на съхранение на замразените ембриони**

Срок на съхранение	Брой случай	Брой извършени PЕТ	Клинични бременности (КБ) брой и (%)	P value	нРЕТ брой и (%)	P value
Група 1	565	492	108 (22,0%)		73 (12,9%)	
Група 2	45	36	10 (27,8%)	P=0,4	9 (20,0%)	P=0,2

Не беше открита статистически значима разлика в процентите нРЕТ и КБ в зависимост от срока на съхранение на ембрионите.

**Прилагането на ко-култивиране на ембрионите с автоложни ендометриални клетки преди витрификацията**

Бяха анализирани 22 PЕТ на витрифицирани ембриони, ко-култивирани предварително с автоложни ендометриални клетки. Ембрионите бяха замразени на ден трети (8 PЕТ) или пети (14 PЕТ) от развитието им. В случаите на PЕТ с ембриони предварително ко-култивирани с автоложни ендометриални клетки нямаше нРЕТ. Реализираните КБ бяха 5 (22,7%). Бременностите бяха само в групата със замразените ембриони на ден пети. Процентът бременности в тази група беше 35,7%.

**Използването на отворена и затворена система за витрификация**

В таблица 21 са представени резултатите от извършения анализ върху 87 PЕТ в зависимост от използваната система за витрификация.

**Таблица 21. КБ и нРЕТ спрямо системата за витрификация**

Вид система	Анализирани PЕТ брой	Извършени PЕТ брой	Клинични бременности (КБ) брой	Клинични бременности (КБ) %	нРЕТ брой	нРЕТ %
Отворена система	44	40	15	37,5%	4	9,1%
Затворена система	43	39	15	38,5%	4	9,3%

При сравняване на двете системи за витрификация - отворена и затворена не беше открита разлика в процентите нРЕТ (P=1) и реализирани КБ (P=0,9).

## Използването на три различни витрификационни и размразителни кита

Първоначално прилагането на криопрезервация беше извършвано с приготвяни в ембриологичната ни лаборатория среди за витрификация и размразяване. След появата на търговски китове беше извършено сравняване на приготвените от нас среди и два търговски кита. Така беше оценена и сравнена ефективността на три вида среди за витрификация и размразяване. Анализирани бяха 238 PЕТ, разделени в три групи в зависимост от използвания витрификационен и размразителен кит.

1. Група 1 - **Витрификационен и размразителен кит 1** (Приготвени в ембриологичната ни лаборатория);
2. Група 2- **Витрификационен и размразителен кит 2** (Търговски кит 1);
3. Група 3- **Витрификационен и размразителен кит 3** (Търговски кит 2).

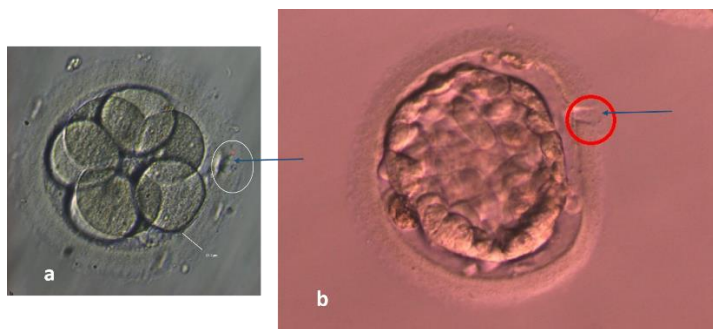
Получените резултати са представени в таблица 22. Беше установено статистически достоверно увеличение на реализираните КБ при група 3 спрямо другите две групи.

**Таблица 22. КБ и нРЕТ в зависимост от китовете за замразяване и размразяване**

Вид среда	Брой PЕТ	Брой извършени PЕТ	Клинични бременности (КБ) брой и (%)	P value	нРЕТ брой и (%)
Група 1	75	63	12 (19,0%)	м/у 1 и 2 група- p=0.3	12 (16,0%)
Група 2	101	94	24 (25,5%)	м/у 2 и 3 група p=0.01	7 (6,9%)
Група 3	62	59	27 (45,8%)	м/у 1 и 3 група p=0.002	3 (4,8%)

## Прилагането на асистиран хетчинг на ембрионите след размразяване преди PЕТ

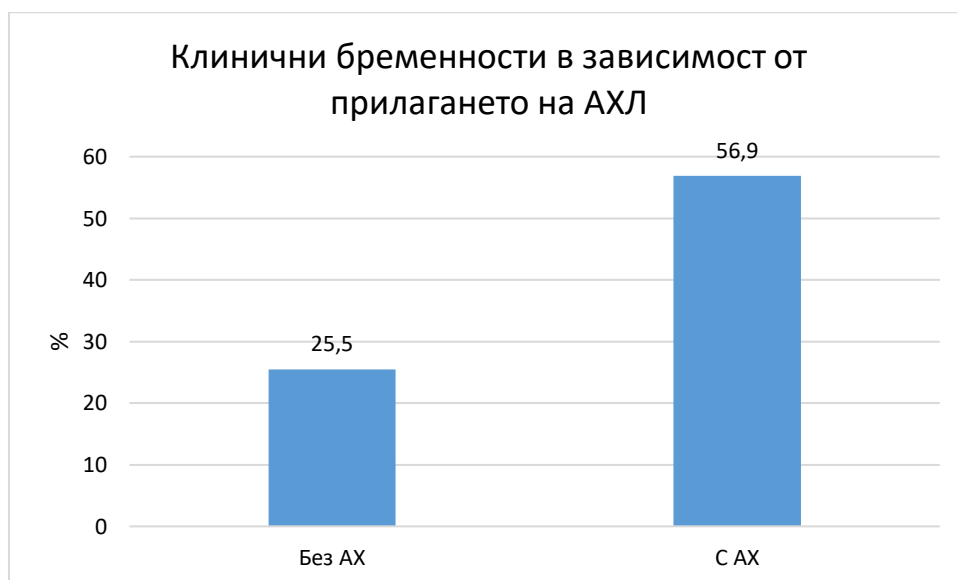
Беше проверен ефектът върху реализираните бременности от прилагането на асистиран хетчинг с лазер (АХЛ) на ембрионите след размразяване и преди PЕТ (Фиг. 9).



**Фигура 9.** Ембриони след прилагане на асистиран хетчинг с лазер (АХЛ). Тридневен ембрион (а) и бластоцист (b). Синята стрелка показва мястото на отвора след АХЛ. Увеличение 200 х, Hoffman modulation contrast

Бяха анализирани 229 РЕТ. При 114 РЕТ беше приложен АХЛ и бяха постигнати 50 КБ, докато 115 РЕТ бяха без АХЛ, като постигнатите КБ бяха 21. При извършването на АХЛ се достигна до статистически по-висок процент бременности ( $P < 0,0001$ ). Реализираните бременности са представени на фигура 10.

**Фигура 10**



Ембрионите бяха витрифицирани на ден трети и ден пети от развитието им. Беше проверено има ли разлика по отношение на реализираните КБ след АХЛ в зависимост от деня на витрификация на ембрионите. Бяха образувани четири групи в зависимост от деня на замразяване на ембрионите и приложението на АХЛ (Табл. 23 ).

**Таблица 23. КБ в зависимост от деня от *in vitro* развитието на ембрионите, на който са замразени и приложението на АХЛ**

Ден на замразяване и метод	Брой PЕТ	Клинични бременности (КБ) брой	Клинични бременности (КБ) %
Трети ден без АХЛ	68	9	13,2%
Трети ден с АХЛ	49	13	26,5%
Пети ден без АХЛ	47	12	25,5%
Пети ден с АХЛ	65	37	56,9%

При витрифицирани ембриони на ден трети (между Група I и II) не се открива статистически значима разлика ( $P=0,07$ ) след извършване на АХЛ, докато при витрифицирани ембриони на ден пети (Група III и IV), при тези с АХЛ, процентът КБ е значимо по-висок ( $P=0,001$ ) в сравнение с групата без АХЛ. Беше наблюдаван и статистически значимо увеличен процент КБ ( $P=0,001$ ) при PЕТ с АХЛ на ден пети в сравнение с PЕТ с АХЛ на ден трети (Група II и Група IV).

#### **Извършване на изкуствен колапс на бластоцистите преди витрификация**

Анализирани бяха 251 PЕТ с ембриони на стадий бластоцист. При 129 от тях бластоцистите бяха витрифицирани без предварително прилагане на ИК, докато 122 PЕТ бяха замразени след извършване на ИК. Резултатите са представени в таблица 24.

**Таблица 24. КБ и nPЕТ спрямо приложението на изкуствен колапс преди витрификацията бластоцистите**

Метод	Брой PЕТ	Брой извършени PЕТ	Клинични бременности (КБ) брой и (%)	nPЕТ брой и (%)
Без изкуствен колапс (ИК)	129	114	30 (26,3%)	15 (11,6%)
С изкуствен колапс (ИК)	122	119	49 (41,2%)	3 (2,5%)



От таблицата се вижда постигането на статистически значимо по-висок процент КБ при извършването на ИК преди замразяването на бластоцистите ( $P=0,02$ ), както и статистически по-нисък процент ( $P=0,005$ ), неизвършване на РЕТ.

Обобщено ефектът на различните фактори върху преживяемостта на ембрионите и реализираните клинични бременности (КБ) е представен в таблица 25.

**Таблица 25. Фактори и тяхното влияние върху преживяемостта на ембрионите след размразяване и реализираните клинични бременности**

Фактор	Преживяемост	Клинични бременности
Качество на ембрионите преди замразяване	+	+
Възраст на пациентката	-	+
Метод за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI	-	-
Ден от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията	-	+
Модификация на метода за замразяване на ембриони на ден пети	+	+
Тип на инфертилитета -първичен или вторичен	-	-
Срок за съхранение на ембрионите	-	-
Прилагане на отворена и затворена система за витрификация	-	-
Извършване на изкуствен (artificial collapse) преди витрификацията	+	+
Прилагане на ко-култивиране на ембрионите с автоложни едометриални клетки преди витрификацията	-	-
Използване на различни витрификационни и размразителни среди	NA	+
Брой на замразените ембриони	NA	-
Брой на трансферираните ембриони	NA	+

Преживяемост на трансферираните ембриони	NA	+
Прилагане на асистиран хетчинг (асистирано излюпване) след размразяването на ембрионите преди PET	NA	+

NA- не е изследван.

**Да се анализира преживяемостта на ембрионите и развиващите се бременности в случаите, когато не се извършва свеж ембриотрансфер, а всички развиващи се ембриони се замразяват и се използват в последващ PET (“freeze all” програма или стратегия).**

Тази програма представлява случаите, при които след ART процедура не се извършва свеж ET, а всички получени ембриони с добро качество се замразяват и използват за PET в следващ менструален цикъл при пациентката, след предварителна хормонална подготовка на ендометриума.

За пет годишен период (2012-2016г.) установихме, че „freeze all” случаите бяха 28,9% от всички PET или 202 PET от 698. На фигура 11 се вижда тенденцията на увеличаване на „freeze all” програмата през годините. Започвайки от 15% и стигайки до 40,7 % от всички PET за съответната година.

**Фигура 11**



Подробно бяха проучени 189 PET, по програмата „freeze all”, извършени в рамките на четири годишен период (2013-2016г.). Размразени бяха 499 ембриони. От

изследваните PЕТ 49 бяха с ембриони замразени на ден трети и 140 с ембриони замразени на ден пети. Възрастта на пациентките беше от 24 до 46 години, със средна възраст 33 години. Средният брой трансферирани ембриони беше 2,3 (от 1 до 4). Случаите с PЕТ на 4 ембриона бяха 9, като при тях беше достигнато до едноплодна бременност. Беше извършван АХЛ на всички ембриони преди PЕТ. нPЕТ беше регистриран при 5 случая (2,6%), а реализираните КБ бяха 92 (50%). Беше направено разделяне на две групи според възрастта на жената: Група 1 (жени  $\leq$  35 години) - 132 PЕТ и Група 2 (жени  $\geq$  36 години) - 57 PЕТ (Табл. 26). Всяка група беше разделена на две подгрупи в зависимост от деня, от развитието на ембрионите, на който те бяха витрифицирани.

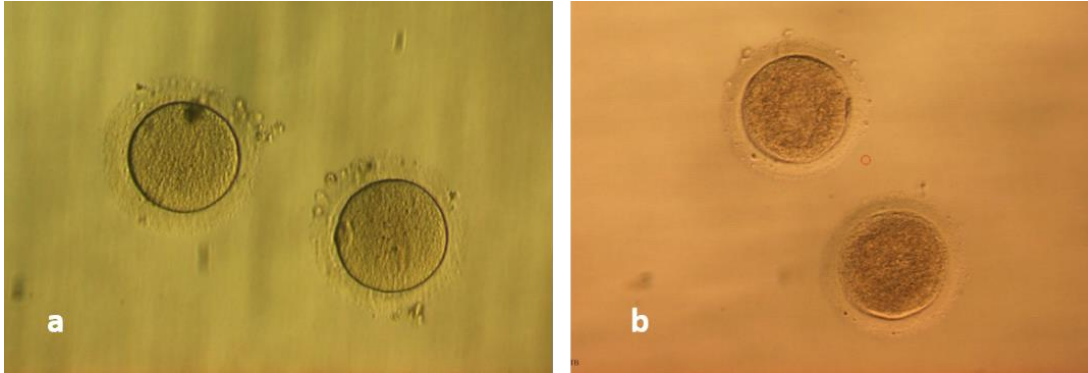
**Таблица 26. Сравнение на резултатите при прилагане на freeze all програма в зависимост от възрастта на жената и витрификация на ембрионите на ден трети или пети от *in vitro* развитието**

	<b>PЕТ брой</b>	<b>Брой извършени PЕТ</b>	<b>Клинични бременности (КБ) брой и %</b>	<b>нPЕТ брой и %</b>
	<b>189</b>	<b>184</b>	<b>92 (50%)</b>	<b>5 (2,6%)</b>
<b>Група 1</b>	<b>132</b>	<b>131</b>	<b>70 (53,4%)</b>	<b>1 (0,8%)</b>
<b>Пети ден</b>	107	106	63 (59,4%)	1 (0,9%)
<b>Трети ден</b>	25	25	7 (28%)	0 (0%)
<b>Група 2</b>	<b>57</b>	<b>53</b>	<b>22 (41,5%)</b>	<b>4 (7%)</b>
<b>Пети ден</b>	33	31	16 (51,6%)	2 (6,1%)
<b>Трети ден</b>	24	22	6 (27,3%)	2 (8,3%)

Беше открита статистически значима разлика в нPЕТ ( $P=0,02$ ), като в групата на по-възрастните жени, той беше по-висок (7%), спрямо по-младите - 0,8. При процентите КБ в двете групи не беше отчетена статистическа разлика. В група 1 бяха постигнати 53,4%, а в група 2 те бяха 41,5% ( $P=0,1$ ). Беше установено статистически значимо увеличение в процента КБ при PЕТ на бластоцисти в сравнение с ден трети ембриони при по-младите жени (Група 1): 59,4% (пети ден) и 28% (трети ден) ( $P=0,005$ ). В Група 2 (по-възрастни жени) резултатите бяха: 51,6% (пети ден) и 27,3% (трети ден), което не достигна до статистически значима разлика ( $P=0,08$ ), въпреки много по-високия процент бременности при витрификация на бластоцисти (ден пети).

## Оценка на преживяемостта, последващото оплождане и развитие на човешки яйцеклетки при прилагане на витрификация.

Бяха анализирани 64 витрифицирани и размразени зрели (метафаза II, MII) яйцеклетки при 14 жени. Фигура 12 показва различна преживяемост на яйцеклетките след размразяването.



**Фигура 12. Зрели яйцеклетки след размразяване.** На панел а са представени успешно преживели размразяването си, оценени на база на морфологията си, яйцеклетки. Панел b са непреживели процедурата яйцеклетки. Увеличение 100 x, Hoffman modulation contrast

След размразяване, преживяемостта на яйцеклетките беше 78,1%. След прилагане на ICSI метода на преживелите яйцеклетки, 72% бяха правилно оплодени с наличие на два пронуклеуса 18-20 часа по-късно (Фиг. 13).



**Фигура 13. Оплождане.** Оплодена с два пронуклеуса яйцеклетка (2PN). Синята стрелка показва двата пронуклеуса. Увеличение 200 x, Hoffman modulation contrast

От оплодените яйцеклетки бяха получени 77,8 % развиващи се ембриони, от тях 14,3 % бяха с максимално, 25 % с добро и 16,7 % с лошо качество за съответния ден на развитие. Витрифицираните и размразени яйцеклетки бяха разделени на две групи (автоложни или собствени и донорски) спрямо жените, от които са добити.

Собствените яйцеклетки бяха получавани след хормонална стимулация от пациентки, желаещи тяхното съхранение с цел автоложно използване след период от

време (с цел запазване на фертилитета) или при невъзможност за получаване на сперматозоиди в деня на пункцията на фоликули.

Донорските яйцеклетки бяха от млади жени, отново след хормонална стимулация, които ги даряваха за ползване от реципиентки. Това са жени, при които не се образуват собствени яйцеклетки или се налага по различни причини, те да не бъдат използвани. Резултатите са представени в таблица 27.

**Таблица 27. Преживяемост и ембриони, получени след размразяване на собствени и донорски яйцеклетки**

Произход на яйцеклетките	Брой размразени яйцеклетки	Брой преживели яйцеклетки	Брой оплодени яйцеклетки	Брой развиващи се ембриони	Брой ембриони с максимално качество	Брой ембриони с добро качество	Брой ембриони с лошо качество
Собствени	31	20	14	10	2	1	7
Донорски	33	30	22	18	2	6	10

По отношение на преживяемостта след размразяване беше установена статистическа значимо по-добра при донорските (90,9%) в сравнение със собствените яйцеклетки (64,5%) ( $P=0,01$ ). При останалите параметри, като оплождане след извършване на ICSI процедура, развитие, и качество на ембрионите не се наблюдава статистически значима разлика между групата с донорски спрямо тази с автоложни яйцеклетки.

## ОБСЪЖДАНЕ

В литературата съществуват изследвания на различни клинични и ембриологични фактори с възможен ефект върху резултата от ПЕТ. Голяма част от тези изследвания са при ембриони, замразени чрез програмно (бавно) замразяване. Съществена част от проучванията за влиянието на тези фактори обхващат ембриони замразени на стадии зигота (ден първи), ден втори и ден трети от *in vitro* развитието им.

Доказано е, чрез различни проучвания и метаанализи, че витрификацията е по-успешният метод за криопрезервация на човешки дялящи се ембриони и бластоцисти в сравнение с бавното замразяване (4–9).

Тези два факта определиха интереса ни да проверим влиянието на важни ембриологични и клинични фактори върху преживяемостта на човешките предимплантационни ембриони и реализираните КБ при витрифицирани ембриони, замразени на различни дни (от втори до шести ден, включително) от *in vitro* развитието им.

Повечето проучвания проверяват влиянието на различните фактори върху резултата от PЕТ, а именно реализираните бременности, затова ние решихме да проверим какво е влиянието на определени параметри върху преживяемостта на витрифицираните ембриони, защото считаме, че това е основата за извършване на PЕТ, което след това има пряко отражението в процента реализирани КБ. Тези данни са обособени в първите два раздела, единият разглеждащ преживяемостта на ембрионите, а вторият реализираните КБ.

Преживяемостта на ембрионите е от ключово значение след размразяването им. Затова ние проверихме кои клинични и ембриологични фактори оказват влияние върху нея. Получените от нас резултати показват статистически значимо влияние върху преживяемостта на ембрионите след размразяване на следните фактори: качеството им преди замразяване, модифицирането на метода за витрификация на бластоцисти, както и прилагането на изкуствен колапс (ИК) преди витрификацията на бластоцисти.

Данните ни показаха, че замразяването на ембриони с максимално (група 1) и добро (група 2) за съответния ден качество, води до статистически значима по-висока преживяемост след размразяването спрямо тези с лошо качество. Преживяемостта беше съответно 83,4% и 84,7% спрямо 76,5% на ембрионите с лошо качество (група 3). Между група 1 и група 2 не беше установена статистически значима разлика ( $P= 0,5$ ). Между група 1 и група 3, и група 2 и група 3 беше  $P=0,03$ , и  $P=0,02$ , съответно. Тези резултати са в съответствие с резултатите на Salumets и съавтори (1), като и на Велева и съавтори. Поради липсата на разлика в резултатите между ембриони с максимално и добро качество, започнахме да прилагаме витрификация в случаите при наличие на ембриони и от двете групи. При наличие дори на един ембрион с максимално качество и други с добро, е подходящо да се извършва криопрезервация. Прекратихме замразяването на ембриони с лошо изходно качество за съответния ден от *in vitro* развитието.

Поради по-голямата чувствителност на бластоцистите и протективната способност, на човешкия серумен албумин, ние решихме да проверим дали увеличаването на концентрацията му във витрификационните и размразителните разтвори би довело до по-висока преживяемост на бластоцистите. При двойното увеличаване на съдържанието на човешки серумен албумин от 5% на 10%, постигнахме 88% преживяемост, което се оказва със статистическа значимост ( $P=0,005$ ). След получаването на тези резултати, започнахме рутинно прилагане на по-високата концентрация на човешки серумен албумин в криопрезервационните разтвори.

Прилагането на изкуствен колапс (ИК) за премахване на течността от бластоцела, преди витрификацията на бластоцисти не е всеобщо използвана техника. Някои екипи (10) не намират подобрене в преживяемостта на ембрионите и получените бременности, докато други имат обратно становище (11–15). Нашите данни са в подкрепа на извършването на ИК при пълните, експандираните и излюпващите се бластоцисти, защото показват статистически достоверно увеличаване на процента преживяемост при прилагане на ИК преди замразяването (85,20%) спрямо 78,10% при случаите без ИК ( $P=0,005$ ). На база на литературните и нашите данни ние прилагаме ИК преди витрификацията на бластоцисти.

Изследваните параметри: възраст на пациентката, метод за оплождане на яйцеклетките: IVF или ICSI, тип на инфертилитета (първичен или вторичен), ден от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията, както и срок за съхранение на ембрионите показаха липса на статистически значима разлика върху преживяемостта на ембрионите.

Ко-култивирането на ембриони с автоложни ендометриални клетки е метод, използван при пациенти с няколко неуспешни опита или развитие на ембриони с лошо качество в предишен опит. Целта на метода е да доведе до получаване на ембриони с по-добро качество и най-вече да се увеличат процентите бременности и живи раждания. В литературата се срещат публикации за положителното влияние върху качеството на ембрионите и реализираните бременности на ко-култивиране на ембриони с автоложни ендометриални клетки (16), по наши данни няма много изследвания върху влиянието им при витрифицирани и размразени ембриони. Затова ние проверихме преживяемостта на тези ембриони. Въпреки, че ко-култивирането с автоложни ендометриални клетки се прилага в усложнени случаи на АРТ, при витрификацията и размразяването на получените ембриони се достига до добри резултати, сравними с тези при ембрионите, които не са подлагани на ко-култивиране, а именно 87,5% и 85,3% общата преживяемост и 43,8% и 40,6% интактни ембриони, съответно.

Вторият раздел от настоящото изследване касае влиянието на разгледаните фактори върху процента реализирани клинични бременности (КБ). Анализирани, описани и изследвани са единствено развиващи се КБ, доказани чрез ехографски преглед с ултразвуков апарат и наличие на сърдечна дейност. Не са включени биохимични и извънматочни бременности, както и много ранните спонтанни аборти. В този раздел са изчислени и анулираните цикли поради лоша преживяемост на всички ембриони (nPET).

Колкото по нисък е процентът нРЕТ и по-висок е процентът КБ, толкова по-сигурна е криопрезервационната програма.

Статистически значимите параметри по отношение на реализираните КБ са: качеството на ембрионите преди замразяване, денят от развитието на ембрионите, на който е извършена витрификацията, модифицирането на метода за витрификация на бластоцисти, възрастта на пациентката, прилагането на асистирани хетчинг и изкуствен колапс, броят на трансферираните ембриони, преживяемостта на трансферираните ембрионите, както и използването на определени витрификационни и размразителни среди.

Качеството на ембрионите преди замразяване оказва влияние, както на преживяемостта след размразяване, така и на реализираните КБ. Ембрионите с максимално и добро качество преди витрификация водят до достоверно по-висок процент КБ спрямо ембрионите с лошо качество ( $P=0,02$  и за двете групи). Тези резултати отново предполагат да не се криопрезервират ембриони с лошо качество. Фактът, че реализираните КБ са сходни при ембриони с максимално и добро качество за съответния ден от *in vitro* развитието ( $P=0,8$ ), прави групата на ембрионите с добро, а не само с максимално качество, подходящи за криопрезервация. Тези наши данни потвърждават резултатите и на други автори (17).

Въпреки липса на разлика в преживяемостта, установихме статистическа разлика в процента КБ в зависимост от деня, на който е извършена витрификацията. Витрифицирането на бластоцисти доведе до по-висок процент бременности спрямо ембрионите на 3 и 4 ден ( $P=0,02$  и  $P=0,002$ , съответно). На базата на този и предишния резултати, както и на данни, че бластоцистният трансфер не оказва негативно влияние върху акушерския резултат (18) ние взехме решението да замразяваме ембрионите на ден 5 (бластоцисти). Нашите данни, показващи липса на бременности при РЕТ на шести ден от *in vitro* развитието на ембрионите, както и такива на други автори (19,20) доведе до прекратяване на изчакването на ембрионите до на ден шести и витрифицирането им.

При модифицирането на метода за замразяване и размразяване на бластоцисти, чрез увеличаване на концентрацията на HSA, статистически значимата по-висока преживяемост доведе и до достоверно по-висок процент бременности ( $P=0,04$ ). Поради тази причина използвахме тези разтвори до момента, в който започнахме прилагането на витрификационен и размразителен търговски кит, водещ до по-висок процент КБ.

Доказано е влиянието на възрастта на пациентката върху резултата от АРТ. Ние си поставихме за цел да проверим влиянието на възрастта на жената върху резултата от



РЕТ. При сравняване на броя на извършените РЕТ, той е много по-голям в групата на жените  $\leq 35$  години. Въпреки, че няма разлика в преживяемостта на ембрионите и нРЕТ ( $P=0,5$ ) в зависимост от възрастта на пациентките, в процента КБ (36,1% спрямо 22,2%) се наблюдава статистически значима разлика ( $P=0,04$ ) в полза на по-младите при пациентки ( $\leq$  до 35 години).

Прилаганият, най-често, в последно време метод за асистиран хетчинг (АХ) е чрез лазерни пулсации, или АХ с лазер (АХЛ). Въпреки, че повечето проучвания намират увеличаване на процента бременност след АХ, той не се прилага рутинно. Повечето изследвания касаят АХ при замразени ембриони на ден втори (21) или трети (22,23). Ние решихме да проверим ефекта на АХ върху витрифицирани и размразени тридневни дялящи се ембриони и бластоцисти. Резултатите ни показват достоверно по-висок процент бременни при извършването на АХ с лазер на бластоцисти след размразяването им преди РЕТ (25,5% спрямо 56,9%, с  $P=0.001$ ). На база на тези и подобни резултати от други автори (24,25), ние считаме, че РЕТ е индикация за рутинно прилагане на асистиран хетчинг с лазер (АХЛ).

Нашите данни са в подкрепа на извършването на ИК, като показват статистически достоверно увеличаване на процента преживяемост на бластоцистите при прилагане на ИК преди замразяването ( $P=0,007$ ), както и увеличаване на реализираните КБ: с ИК 41,2% в сравнение с 26,3% без ИК,  $P=0,005$ . Тези резултати, както и подобни на други автори (11–13,15) доведоха до рутинното му приложение при всички пълни, експандирани и излюпващи се бластоцисти преди криопрезервация.

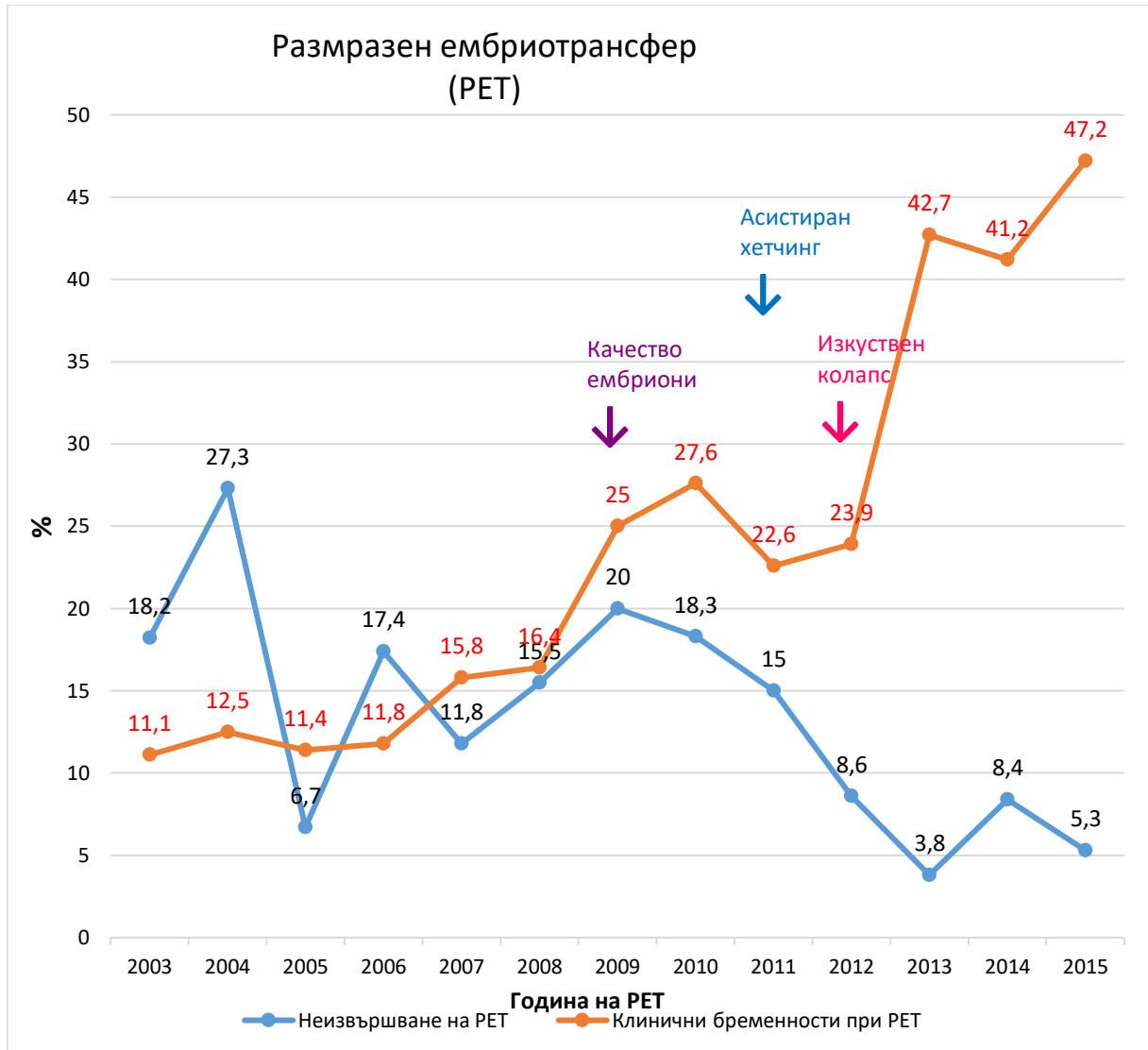
Параметри, които не оказват влияние на реализираните КБ при РЕТ са: методът на оплождане на яйцеклетките (IVF или ICSI), типа на инфертилитета (първичен или вторичен), срокът на съхранение на ембрионите, броят на замразените ембриони, както и системата за витрификация (отворена и затворена).

След анализирането на РЕТ с ембриони, ко-култивирани предварително с автоложни ендометриални клетки бяха установени КБ само в случаите с РЕТ с витрифицирани ембриони на ден пети (бластоцисти). Поради липсата на реализирани бременност от ко-култивирани ембриони на ден трети, се прилага култивиране до ден пети и тогава при наличие на бластоцисти с максимално или добро качество те се витрифицират.

Анализирахме използването на витрификация при предимплантационни ембриони за 13 годишен период от 2003 до 2015 година. Бяха сравнени резултатите от 941 РЕТ. Данните са представени на фигура 14. Установихме статистически значимо

намаление в процента нРЕТ (анулирани РЕТ поради липса на преживяемост на размразените ембриони) от 18,2 % до 5,3 % ( $P=0,0003$ ) и увеличение на реализираните КБ от 11,1 % до 47,2 % ( $P=0,03$ ) от 2003 до 2015 година.

**Фигура 14. Прилагане на различни методи с влияние върху резултата от РЕТ**



На база на получаваните добри резултати бяха въведени в рутинната практика различни параметри, водещи до намаляване на нРЕТ и увеличаване на процента КБ.

Добрата криопрезервационна програма и успешното прилагането на РЕТ намалява неудобствата и разходите на пациентите и води до реализирани бременности, сравними със, или понякога по-висок процент, от свежия ЕТ. Получените данни в тези два раздела показват много добра преживяемост на ембрионите и добър процент КБ. Те съвпадат с различни статии, които дават данни за безопасност при прилагане на

криопрезервация на ембриони чрез витрификация, като резултатите не се различават или са по-добри от тези при свежия ЕТ (26–29).

Следващият раздел от получените от нас резултати касае набиращата популярност напоследък „freeze all“ програма или стратегия. Тя представлява неизвършване на свеж ЕТ и замразяване на всички развиващи се ембриони с добро качество. За да бъде използвана тази програма от определена лаборатория тя трябва да има добре работещата замразителна програма, за да може да гарантира добра преживяемост, на всички ембриони и да няма риск от загуба на развиващ се ембрион. Първоначално тази стратегия се прилагаше при жени с овариален хиперстимуляционен синдром, наличие на полип или поява на преждевременно маточно кървене. Сега се предлага и при нормално отговарящи на стимулацията пациентки, при които се очаква голямо количество яйцеклетки или при преждевременна лутеинизация, което представлява повишени серумни нива на прогестерона ( $P > 1.5 \text{ ng/ml}$ ) по време на хормоналната стимулация (30–32). Повечето автори получават много добри проценти бременност при използването на “freeze all“ програма, а някои дори достигат до по-висок процент бременни при нея в сравнение със свежите ЕТ (30,33).

Бяха разгледани случаите с “freeze all“ за пет годишен период (2012г.-2016г.). Установихме тенденция към увеличаване на приложението на този метод. През 2012 година 15 % от всички РЕТ бяха по програмата “freeze all“ докато през 2016 година те бяха 40,7 %.

Поради увеличаващата се възраст на пациентките, подлагащи се на АРТ и търсенето на успешно лечение, с постигане на бременност и раждане при тях, ние решихме да проверим дали възрастта на жената оказва влияние при резултатите от “freeze all” програмата. При разделянето на жените на две възрастови групи не се установи влияние на възрастта на жените върху процента КБ. Ние установихме, че и жени в напреднала репродуктивна възраст ( $\geq 36$  години) могат да участват в тази програма без да се застрашават ембрионите им и да се намалява вероятността за настъпване на бременност. Проверихме дали има разлика при витрификация за “freeze all” на ембриони на ден трети и ден пети (бластоцисти). Беше установено статистически значимо увеличение в процента КБ при РЕТ на бластоцисти в сравнение с ден трети ембриони при по-младите жени: 59,4% (пети ден) и 28% (трети ден) ( $P=0,005$ ). В групата на по-възрастните жени резултатите бяха: 51,6% (пети ден) и 22,7 % (трети ден), което не достигна до статистически значима разлика, въпреки много по-високия процент бременности при витрификация на бластоцисти ( $P=0.08$ ).

Последният раздел от настоящия дисертационен труд разглежда витрификацията, размразяването и оплождането на яйцеклетки, както и проследяване на ембриони, получени от тях. Изследваните от нас витрифицирани, неоплодени човешки яйцеклетки показват задоволителен и сравним с повечето автори процент преживяемост и оплождане, но незадоволителен процент развиващи се ембриони с добро качество. При разделянето на групите става ясно, че при използване на донорски яйцеклетки получаваме статистически значимо по-висок процент преживяемост. Този резултат би могъл да се обясни с по-високата средна възраст (36.3 години) на изследваните пациентки, които замразяват собствени яйцеклетки, спрямо донорките на яйцеклетки, които по Закона за Здравето и Наредба 28, регулираща Дейностите по Асистирана репродукция, трябва да са жени до 34 години и да имат поне едно живо родено дете. Криопрезервацията на яйцеклетки е препоръчително да се извършва преди 35 години, като с увеличаване на възрастта, се увеличава и необходимият брой замразени яйцеклетки, за да се осигури по-голяма вероятност за успешен резултат.

Данните от този раздел показват нуждата от по-голям брой изследвани яйцеклетки. Ефективна би била проверка на изследваните параметри при различни възрастови групи пациентки, както и включването на реализираните КБ. Трудното натрупване на данни в тази област се дължи на малкият брой жени, които прибегват до замразяване на яйцеклетки и отложеното им използване във времето.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В настоящето проучване бяха изследвани различни клинични и ембриологични фактори, като се установи, тяхното влияние върху преживяемостта на ембрионите при размразяване и върху процента реализирани КБ. Взимането им под внимание при замразяването и последващ РЕТ би довело до по-пълноценното прилагане на криопрезервацията, увеличаване на процента КБ, а от там и до увеличаване на процента живородени деца, което е целта на асистираната репродукция. С получените от нас резултати, ние потвърждаваме, че витрификацията на ембриони и яйцеклетки е ефективен и сигурен метод и доказваме, че приложението на допълнителни техники – АХЛ, ИК, както и криоконсервация само на ембриони с максимално или добро качество, води до по-добри резултати.

Прилагането на програмата “freeze all” осигурява възможност, при определени групи пациентки, да се отложи ембриотрансферът, което да увеличи шансовете за бременност и раждане. От голямо значение е и успешното прилагане на тази програма, при жени в напреднала репродуктивна възраст. Броят на пациентките в споменатата

група, се увеличава постоянно, поради отлагането на бременността и майчинството във времето. Тази група жени са предизвикателство за реализиране бременност и живо раждане, поради което всички методи, помагачи за постигането на този резултат са изключително важни.

Бъдещо проследяване на родените деца след прилагане на витрификация и тяхното развитие би дало допълнителна информация за сигурността на метода.

Относно замразяването на яйцеклетки, получените от нас резултати са добри по отношение на преживяемост, оплождане и развитие на ембрионите. Те биха могли да бъдат оптимизирани, чрез анализиране на по-голям брой яйцеклетки, с отчитане на реализираните бременности и родените деца. Криопрезервацията на женски гамети би могла да се прилага по-широко, като е препоръчително да се извършва при по-млади жени, поради вече доказаната ефективност, но винаги след пълно информиране на пациентите за реалните възможности и резултати.

## **Изводи**

1. Анализирани фактори, които оказват влияние върху преживяемостта на ембрионите след размразяване и реализираните КБ от РЕТ са: качеството на ембрионите в деня от *in vitro* развитието, на който се извършва витрификацията, увеличаването на съдържанието на човешки серумен албумин в замразителните и размразителните разтвори при криопрезервация на бластоцисти, както и извършването на изкуствен колапс преди витрификацията им.
2. Преживяемостта на ембрионите след размразяване и реализираните КБ при РЕТ не се влияят от: метода за оплождане на яйцеклетките, типа на инфертилитета, продължителното съхранение в течен азот, както и прилагането на отворена или затворена система за витрификация.
3. Извършването на асистиран хетчинг с лазер (АХЛ) на ембрионите след размразяване води до статистически достоверно увеличаване на реализираните КБ при витрифицирани бластоцисти.
4. Въпреки липсата на разлика в преживяемостта на ембрионите в зависимост от възрастта на пациентката, такава се отчита в процента реализирани КБ. В случаите на криоконсервация на оставащите след свеж ЕТ ембриони, реализираните КБ след РЕТ са статистически достоверно по-голям процент при пациентките  $\leq 35$  години, спрямо тези  $\geq 36$  години.

5. Преживяемостта на ембрионите след размразяване, както и броят на трансферираните при PЕТ ембриони, оказват влияние върху реализираните бременности. При PЕТ на ембриони с преживели под 50% от клетките не се достига до клинична бременност.
6. При прилагането на програмата „freeze all” възрастта на пациентките не оказва негативен ефект върху реализираните КБ. Витрифицирането на бластоцисти води до статистически достоверно по-висок процент реализирани КБ в сравнение с ембриони на ден трети, при пациенти  $\leq 35$  години.
7. След установяване на факторите с положителен ефект върху криоконсервацията на ембриони и рутинното им прилагане в практиката се наблюдава статистически достоверно увеличаване на реализираните КБ (от 11,1% през 2003 година до 47,2% през 2015 година).
8. Витрификацията на донорски в сравнение със собствени яйцеклетки води до достоверно по-висок процент преживяемост след размразяване.

## **Приноси**

1. За първи път у нас е направен подробен анализ на метода витрификация, като са определени факторите, влияещи върху преживяемостта на ембрионите след размразяване и реализираните клинични бременности при размразен ембриотрансфер.
2. Анализът на получените данни доведе до оптимизиране на метода със съществено увеличение на клиничните бременности след въвеждане в практиката на:
  - модифициран метод за криоконсервация на бластоцисти
  - замразяване на ембриони само с максимално или добро качество за съответния ден
  - канселиране на размразения ембриотрансфер при наличие, след размразяване, само на ембриони, с преживели под 50 % от клетките
  - рутинно прилагане на изкуствен колапс преди криопрезервацията на бластоцисти и асистиран хетчинг с лазер след размразяване на ембрионите преди размразен ембриотрансфер.
3. Показано е, че при прилагане на стратегията „freeze all“ криоконсервирането на бластоцисти води до увеличаване на реализираните клинични бременности.

## Статии, свързани с темата на дисертацията

1. Lyuboslava D. **Valkova**, Petya M. Andreeva, Tanya V. Milachich, Boryana R. Bandreva, Petya V. Penkova, Ivan M. Bochev, Boryana D. Petkova, Tanya N. Timeva Atanas D. Shterev, How many vitrified human autologous or donor oocytes are needed for one live birth, Problems of Cryobiology and Cryomedicine, *in press*, ISSN 23076143
2. Lyuboslava **Valkova**, Tanya Milachich, Tanya Timeva, Atanas Shterev, Combined artificial collapse and assisted hatching increase the success rate in frozen embryo transfer, Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences, *in press*, ISSN 1310–1331.
3. Tanya Timeva, **Luboslava Vulkova**, Maria Yunakova, Atanas Shterev, Endometrial thickness in assisted reproduction and treatment outcomes, 17, World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Congress Melbourne, Australia, 6-9 September 2019, Ultrasound in medicine and biology, Volume 45, Supplement 1, Page S123, DOI 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.07.401
4. **Вълкова Л.**, Милачич Т., Тимева Т., Бандрева Б., Щерев А., Живо раждане след двуплодна бременност получена от размразени яйцеклетки и размразени сперматозоиди, Репродуктивно здраве, брой 27, 2018, 9-11, ISSN 1312-6180.
5. **Вълкова Л.**, Милачич Т., Антонова И., Бандрева Б., Пенкова П., Тимева Т., Щерев А., Влияние на изкуствения колапс на бластоцистите преди витрификация върху преживяемостта им и резултата от размразения ембриотрансфер, Репродуктивно здраве, брой 24, 2016, 15-20, ISSN 1312-6180.
6. **Вълкова Л.**, Милачич Т., Антонова И., Бандрева Б., Пенкова П., Юнакова М., Тимева Т., Щерев А., Прилагане на асистирани хетчинг с лазер при ембриотрансфер на размразени ембриони, Репродуктивно здраве, брой 23, 2016, 14-18, ISSN 1312-6180.
7. **Петкова Л.**, Милачич Т., Баров Д., Тимева Т., Савова Д., Румен Димитров, Кюркчиев С., Щерев А., Култивиране на човешки ендометриални клетки за автоложно ко-култивиране с ембриони: предварително съобщение, Репродуктивно здраве, Брой 13, 2007, 14-16, ISSN 1312-6180.
8. **Петкова Л.**, Ко-култивиране на ембриони с автоложни ендометриални клетки при пациенти с повтарящ се неуспех при АРТ, Репродуктивно здраве, Брой 13, 2007, 12-13, ISSN 1312-6180.

9. Timeva T, Milachich T, **Petkova L**, Barov D, Shterev A. Number of retrieved oocytes as a prognostic factor for IVF/ICSI outcome., *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2006; 59(7): 805-808, ISSN 1310–1331.

#### **Абстракти от конгреси публикувани в списания**

10. **Valkova L.**, Magunskan N., Petkova B., Milachich T., Kawamura K., Shterev A., Drug free In Vitro Activation for woman with very advanced maternal age, ESHRE Virtual 36 Annual meeting, July, 2020, *Hum. Reprod.* 35 (suppl 1): i413-i414, P-603, DOI 10.1093/oxfordjournals.humrep.a002489, ISSN 0268-1161.
11. **Valkova L.**, Milachich T., Timeva T, Yunakova M, Shterev A., Freeze all strategy for patients with advanced maternal age, The 6th World Congress of the International society for fertility preservation (ISFP), New York, USA, November 14-16, 2019, *J Assist Reprod Genet* (2020), page 16, DOI 10.1007/s10815-020-01754-1, ISSN 1058-0468.
12. **Petkova L.**, T. Milachich, D. Barov, M. Aleksandrov, A. Shterev., Zygotes, cleavage stage embryos, blastocysts formation., 22 Annual meeting of ESHRE, Prague, Czech Republic, June, 2006, *Hum. Reprod.* 21 (suppl 1): i159-i163, P-416, DOI 10.1093/oxfordjournals.humrep.a002489, ISSN 0268-1161, EISSN 1460-2350.
13. Bochev I, **Valkova L**, Kyurkchiev S, Shterev A., Marked pregnancy rate improvement after embryo co-culture with frozen endometrial stromal cells, 28<sup>th</sup> Annual Meeting of ESHRE, Istanbul, Turkey 1-4 July, 2012, *Hum. Reprod.* 27 (suppl 2): i162-i205, P-155, DOI 10.1093/humrep/27.s2.77, ISSN 0268-1161, EISSN 1460-2350.
14. I. Antonova, T. Milachich, **L. Petkova**, A. Shterev, Embryo transfer on day 4<sup>th</sup> pro and contra, 28<sup>th</sup> Annual Meeting of ESHRE, Istanbul, Turkey 1-4 July, 2012, *Hum. Reprod.* 27 (suppl 2): i162-i205, P-122, DOI 10.1093/humrep/27.s2.77, ISSN 0268-1161, EISSN 1460-2350.
15. Antonova I., T. Milachich, **L. Petkova**, M Yunakova, P. Chaveeva, A. Shterev, (2010) Morula stage embryo on day 5: what to expect? 26<sup>th</sup> Annual Meeting of ESHRE, Rome, Italy, 27 June-30 June, 2010, *Hum. Reprod.* 25, supplement 1, 2010, DOI 10.1093/humrep/de.25.s1.140, P-175, i184, ISSN 0268-1161, EISSN 1460-2350.
16. Milachich T., **L. Petkova**, D. Barov, A. Shterev (2010) Predictive value of embryos with top quality score does not correlate with female age. 26<sup>th</sup> Annual Meeting of ESHRE, Rome, Italy, 27 June-30 June, 2010, *Hum. Reprod.* 25, supplement 1, 2010, DOI 10.1093/humrep/de.25.s1.140, P-157, i176, ISSN 0268-1161, EISSN 1460-2350.



### Участия в научни форуми:

17. **Любослава Вълкова**, Запазване на фертилитета при жени и момичета преди пубертета, Седма годишна научна конференция с международно участие, БАМО (Българска асоциация по медицинска онкология), юни 2019, София, България.
18. **Вълкова Л.**, Актуалното място на криопрезервацията в асистираната репродукция, XII Софийски симпозиум - Асистиран репродуктивни технологии, бременност и раждане, Ноември, 2018, София, България.
19. **Valkova L.**, Milachich T, Dimcheva A., Antonova I., Timeva T., Shterev A., Impact of patient age and day of vitrification on the result of “freeze all” strategy, 17th World Congress on Human Reproduction, Rome, March 15-18 2017, OP 14.
20. **Вълкова Л.**, Криопрезервация от сперматозоида до ембриона. Кой е най подходящият стадий? Българският опит. XVII Национален конгрес на БАСРЗ по стерилитет и репродуктивно здраве с международно участие, Боровец, България, 10-13 март 2016.
21. **Valkova L.**, T. Milachich, I. Antonova, T. Timeva, P. Andreeva, M. Yunakova, A. Shterev Influence of the embryo quality before vitrification on the result of frozen embryo transfer , **21st COGI Congress: Innovation in Reproductive Medicine**, Frankfurt, Germany, May 14-16, 2015, P 32.
22. **Вълкова Л.**, Методи за изследване на яйчниковата тъкан за наличие на туморни клетки и риск при трансплантация, VIII-ми Софийски симпозиум “Репродуктивна медицина и онкологични заболявания”, София, България, 07-08 Ноември, 2014.
23. **Valkova L, Milachich T, Antonova I, Timeva T, Shterev A, Improved pregnancy rate after laser assisted hatching of vitrified blastocysts**, The 3rd International Congress on Controversies in cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue & Organs (CRYO), Berlin, Germany, 21-23 March, 2013.
24. **Вълкова Л.**, Милачич Т., Баров Д., Антонова И., Бандрева Б., Тимева Т., Ганева Г., Андреева П., Юнакова М., Кюркчиев С., Щерев А., Преживяемост и клинични бременности след прилагане на витрификация на ембриони, XII Национален конгрес по стерилитет, контрацепция и хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия с международно участие, Боровец, България, март 2011, Репродуктивно здраве, 2011, март, (19), 17, OP05.

## Литературна справка

1. Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilska S, Husu L, Tainio R, et al. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2003;18(9):1890–5.
2. Gardner D, Schoolcraft W. In-vitro culture of human blastocysts. 1999.
3. Милачич Т. Оценка на информативната стойност на генетични и морфологични критерии за предимплантационна диагностика, Дисертация. 2009;
4. Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. A randomized comparison of the cryopreservation of one-cell human embryos with a slow controlled-rate cooling procedure or a rapid cooling procedure by direct plunging into liquid nitrogen. *Hum Reprod* 1997;12(7):1554–60.
5. Aigner S, Elst J van Der, Siebzehnriibl E, Wildt L, Lang N, Steirteghem ACV. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1992;7(6):857–64.
6. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil. Steril.* 2002; 78(3):44-54.
7. Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, et al. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: Vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008;23(9):1976–82.
8. Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, et al. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(1):53-7.
9. Abdelhafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: A systematic review and meta-analysis. *Reprod. Biomed. Online.* 2010;20(2):209–22.
10. Van Landuyt L, Polyzos NP, De Munck N, Blockeel C, Van De Velde H, Verheyen G. A prospective randomized controlled trial investigating the effect of artificial shrinkage (collapse) on the implantation potential of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2015;30(11):2509–18.
11. Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2006;21(12):3246–52.
12. Levi-Setti PE, Menduni F, Smeraldi A, Patrizio P, Morengi E, Albani E. Artificial shrinkage of blastocysts prior to vitrification improves pregnancy outcome: analysis of 1028 consecutive warming cycles. *J Assist Reprod Genet* 2016;33(4):461–6.
13. Darwish E, Magdi Y. Artificial shrinkage of blastocoel using a laser pulse prior to vitrification improves clinical outcome. *J Assist Reprod Genet* 2016;33(4):467–71.
14. Iwayama H, Hochi S, Yamashita M. In vitro and in vivo viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification. *J Assist Reprod Genet* 2011;28(4):355–61.
15. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, Van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: Effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 2002;17(3):744–51.
16. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, et al. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990;5(1):7–13.
17. Solé M, Santaló J, Rodríguez I, Boada M, Coroleu B, Barri PN, et al. Correlation

- between embryological factors and pregnancy rate: Development of an embryo score in a cryopreservation programme. *J Assist Reprod Genet* 2011;28(2):129–36.
18. Wikland M, Hardarson T, Hillensjö T, Westin C, Westlander G, Wood M, et al. Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. *Hum Reprod* 2010;25(7):1699–707.
  19. Sunkara SK, Siozos A, Bolton VN, Khalaf Y, Braude PR, El-Toukhy T. The influence of delayed blastocyst formation on the outcome of frozen-thawed blastocyst transfer: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2010;25(8):1906–15.
  20. Ferreux L, Bourdon M, Sallem A, Santulli P, Barraud-Lange V, Le Foll N, et al. Live birth rate following frozen-thawed blastocyst transfer is higher with blastocysts expanded on Day 5 than on Day 6. *Hum Reprod* 2018;33(3):390–8.
  21. Gabrielsen A, Agerholm I, Toft B, Hald F, Petersen K, Aagaard J, et al. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved-thawed embryos. A randomized prospective study. *Hum Reprod* 2004;19(10):2258–62.
  22. Balaban B, Urman B, Yakin K, Isiklar A. Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave in vitro after thawing: A prospective randomized study. *Hum Reprod* 2006;21(8):2136–40.
  23. Li D, Yang D-L, An J, Jiao J, Zhou Y-M, Wu Q-J, et al. Effect of assisted hatching on pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep* 2016;6:31228.
  24. Ghannadi A, Kazerooni M, Jamalzadeh F, Amiri S, Rostami P, Absalan F. The effects of laser assisted hatching on pregnancy rates . *Iran J Reprod Med* 2011;9(2):95–8.
  25. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, Bollen N, Van Roosendaal E, et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: Application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 2003;18(7):1504–11.
  26. Shi W, Xue X, Zhang S, Zhao W, Liu S, Zhou H, et al. Perinatal and neonatal outcomes of 494 babies delivered from 972 vitrified embryo transfers. *Fertil Steril* 2012;97(6):1338–42.
  27. Wennerholm UB, Henningsen AKA, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: A Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod* 2013;28(9):2545–53.
  28. Pinborg A, Henningsen AKA, Malchau SS, Loft A. Congenital anomalies after assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.* 2013;99(2):327–32.
  29. Ozgur K, Berkkanoglu M, Bulut H, Humaidan P, Coetzee K. Perinatal outcomes after fresh versus vitrified-warmed blastocyst transfer: Retrospective analysis. *Fertil Steril* 2015;104(4):899–907.
  30. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: Fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril* 2015;103(5):1190–3.
  31. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil. Steril.* 2014;102(1):3–9.
  32. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: A prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfers in high responders. *Fertil Steril* 2011;96(2):516–8.
  33. Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013;99(1):156–62.