

---

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН



ФАКУЛТЕТ „ЗДРАВНИ ГРИЖИ“  
КАТЕДРА “АКУШЕРСКИ ГРИЖИ”

---

**Д-Р ГЕОРГИ СТАМЕНОВ СТАМЕНОВ**

**МАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА ЕМБРИОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ  
ПРИ НЕСТИМУЛИРАН ЦИКЪЛ.  
РАЗРАБОТВАНЕ НА МОДЕЛ ЗА ПРЕДСКАЗВАНЕ НА  
ИМПЛАНТАЦИОННИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА ЧОВЕШКИ ЕМБРИОНИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен  
“Доктор”

Научна специалност 03.01.45. Акушерство и гинекология

*Плевен , 2013 г.*



---

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН



ФАКУЛТЕТ „ЗДРАВНИ ГРИЖИ“  
КАТЕДРА „АКУШЕРСКИ ГРИЖИ“

---

**Д-Р ГЕОРГИ СТАМЕНОВ СТАМЕНОВ**

**МАРКЕРИ ЗА ОЦЕНКА НА ЕМБРИОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ  
ПРИ НЕСТИМУЛИРАН ЦИКЪЛ.  
РАЗРАБОТВАНЕ НА МОДЕЛ ЗА ПРЕДСКАЗВАНЕ НА  
ИМПЛАНТАЦИОННИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА ЧОВЕШКИ ЕМБРИОНИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен  
“Доктор” Научна специалност 03.01.45. Акушерство и гинекология

***Научен ръководител:***  
**Доц. Д-р Светлозар Николов Стойков, д.м.**

---

***Рецензенти:***

проф. д-р Благовест Пехливанов, д.м.н.

проф. д-р Стефан Иванов, д.м.н.

**Плевен , 2013 г.**

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на разширен Катедрен съвет на катедра „Акушерски грижи“ към факултет „Здравни грижи“, МУ Плевен на заседание, състояло се на 05.12.2012г.

Дисертацията съдържа 282 страници, включително 41 фигури, 76 таблици и 8 приложения. В библиографията са включени 531 литературни източника.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на: 26.06.2013 г. От 11:00 часа в зала „Амброаз Паре“ на Телекомуникационен ендоскопски център (ТЕЛЕЦ) на МУ Плевен.

Материалите по защитата са на разположение на сайта на МУ-Плевен:  
[www.mu-pleven.bg](http://www.mu-pleven.bg)

# СЪДЪРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| I. УВОД  | 1  |
| II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ   | 2  |
| III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ  | 4  |
| IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ   | 9  |
| 1. Възраст на пациентите   | 9  |
| 2. Морфология на яйцеклетките  | 11 |
| 3. Резултат от оплождането   | 17 |
| 4. Морфология на ембрионите  | 19 |
| 5. Имплантационен потенциал на ембрионите                                    | 23 |
| 6. Взаимовръзка между изследваните показатели                                | 30 |
| 7. Прогностична сила и подбор на показателите                                | 33 |
| 8. Логистични регресионни модели   | 37 |
| 8.1. Разработване на прогностичен модел                                      | 37 |
| 8.2. Оценка на ефективността на разработения модел                           | 37 |
| 8.3. Дискриминация на прогностичния модел                                    | 38 |
| 8.4. Вътрешно валидиране на прогностичния модел                              | 40 |
| 8.5. Комбиниране на двете регресионни уравнения в общ модел                  | 41 |
| V. ИЗВОДИ  | 44 |
| VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ   | 46 |
| VII. ПРИНОСИ   | 49 |
| VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С<br>ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 51 |

# ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**AP-1** – activator protein 1

**ART (АРТ)** - Assisted reproductive technology (асистирани репродуктивни технологии)

**cAMP (цАМФ)** – Cyclic adenosine monophosphate (цикличен Аденозинмонофосфат)

**COC** – cumulus-oocyte complex (кумулус-ооцитен комплекс)

**COH (КОХ)** – Controlled ovarian hyperstimulation (Контролирана овариална хиперстимулация)

**EGF** – Epidermal growth factor

**ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay (Ензим-свързан имуносорбентен метод)

**FACS** – Fluorescence-activated cell sorting (Флуоресцентно активирано клетъчно сортиране)

**FGF** – Fibroblast growth factor

**FSH** – Follicle-stimulating hormone (фоликуло-стимулиращ хормон)

**G-CSF** – Granulocyte colony-stimulating factor

**GH** – Growth hormone (растежен хормон)

**Gly** – Glycodelin (Гликоделин)

**GnRH** – Gonadotropin-releasing hormone (Гонадотропин-освобождаващ хормон)

**GV** – germinal vesicle (герминален везикул)

**hCG** – Human chorionic gonadotropin (Човешки хорион гонадотропен хормон)

**ICFALS** – Insulin-like growth factor acid-labile subunit

**ICSI** – Intra-cytoplasmic sperm injection (вътре цитоплазмено инжектиране на сперматозоиди)

**IFN- $\gamma$**  – Interferon-gamma (интерферон гама)

**IGFBP3** – Insulin-like growth factor-binding protein 3

**IGF-I** – Insulin-like growth factor 1

**IGF-II** – Insulin-like growth factor 2

**IL-12** – Interleukin-12 (Интерлевкин-12)  
**IL-12R-β1** – Interleukin-12 receptor beta 1  
**IL-12R-β2** – Interleukin-12 receptor beta 2  
**IL-1α** – Interleukin-1 alpha (Интерлевкин-1 алфа)  
**IL-1β** – Interleukin-1 beta (Интерлевкин-1 бета)  
**IL-2** – Interleukin-2 (Интерлевкин-2)  
**IL-2R** - Interleukin-2 receptor  
**IL-6** – Interleukin-6 (Интерлевкин-6)  
**IL-8** – Interleukin-8 (Интерлевкин-8)  
**IP10 (CXCL10)** – Interferon gamma-induced protein 10 (C-X-C motif chemokine 10)  
**IU** – International unit (Международна единица)  
**IVF (ИВФ)** – In vitro fertilization (ин витро фертилизация)  
**LF** – lactoferrin (лактоферин)  
**LH** – Luteinizing hormone (лутеинизиращ хормон)  
**LIF** – Leukemia inhibitory factor (Левкемия инхибиторен фактор)  
**LP** – Long protocol (Дълъг протокол)  
**LPA** – Lysophosphatidic Acid  
**LTB4** - Leukotriene B4 (Левкотриен B4)  
**LUF syndrome** – Luteinized unruptured follicle (лутеинизиран неруптурирал фоликул)  
**MCP-1 (CCL2)** – Monocyte chemotactic protein-1 (Chemokine (C-C motif) ligand 2)  
**MCP-2 (CCL8)** – Monocyte chemotactic protein-2 (Chemokine (C-C motif) ligand 8)  
**MI** – metaphase I (метафаза първа)  
**MII** – metaphase II (метафаза втора)  
**MIP 1α (CCL3)** – Macrophage inflammatory protein-1 α (Chemokine (C-C motif) ligand 3)  
**MIP 1β (CCL4)** – Macrophage inflammatory protein-1β (Chemokine (C-C motif) ligand 4)  
**MMP-9** – matrix metalloproteinase 9 (Матриксна металопроотеиназа 9)  
**MMPs** - Matrix Metalloproteinases (Матриксни металопроотеинази)  
**NGF** – Nerve growth factor

**NPB** – nucleolar precursor bodies (нуклеоларни прекурсорни телца)  
**OHSS** – Ovarian hyperstimulation syndrome (Овариален хиперстимулационен синдром)  
**OSM** – Oncostatin M  
**PB** – polar body (полярно телце)  
**PCOS (ПКОС)** – Polycystic ovary syndrome (поликистозен овариален синдром)  
**PDGF** – Platelet-derived growth factor  
**PGE2** – Prostaglandin E2  
**PN** – pronucleus (пронуклеус)  
**PRL** – Prolactin (пролактин)  
**RANTES (CCL5)** – Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted (Chemokine (C-C motif) ligand 5)  
**rFSH** – recombinant Follicle-stimulating hormone (рекомбинантен фоликуло-стимулиращ хормон)  
**ROS** – Reactive oxygen species  
**SP** – Short protocol (Къс протокол)  
**TCR** – T-cell receptor  
**TGF- $\beta$**  - Transforming growth factor beta  
**TIMPs** – Tissue inhibitor of metalloproteinases  
**TNF-R1** – Tumor necrosis factor-alpha receptor 1  
**TNF-R2** – Tumor necrosis factor-alpha receptor 2  
**TNF- $\alpha$**  – Tumor necrosis factor-alpha  
**VEGF** – Vascular endothelial growth factor  
**E2** – естрадиол  
**ЕЕК** – Ендометриалните епителни клетки  
**ЕТ-2** – Endothelin 2 (Ендотелин 2)  
**ЕТ-RB** – Endothelin receptor B  
**ЕТ-RA** – Endothelin receptor A  
**P** – прогестерон  
**ФТ** – фоликулярна течност



## I. УВОД

По данни на световни и наши статистики е известно, че честотата на безплодието в семейството се движи между 10 и 15%. В България повече от 270 000 семейства се борят с безплодието, което е 15 % от населението във фертилна възраст, или всяко шесто семейство. По данни на Националния статистически институт от 1989 г. След този период България има отрицателен естествен прираст - населението намалява годишно с около 45 хиляди души, което за последните 15 години прави около 1,3 милиона души. Ако тази тенденция се запази, то към 2050 г. българите ще наброят приблизително 5 милиона. Това прави борбата с безплодието в България и света особено важна. Ето защо, този въпрос стои в основата на проучванията на много научни институти и клиники в света, където широко се използват и развиват методите на асистирания репродукция или т. нар. ин-витро оплождане.

Успеваемостта на методите на асистирания репродукция засега е около 30-40%, която стойност не е много висока. Това налага продължаване на научните и технологични изследвания, които могат да доведат до усъвършенстване на методиките и повишаване на тази успеваемост. Големи усилия в последните години са насочени към развиването на *неинвазивни диагностични методи за определяне на качеството на гаметите, на техния потенциал да образуват ембриони, с оптимална функционалност и потенциал за имплантиране и подходи за оценка на рецептивността на ендометриума и готовността му да приеме ембриона.* Това е необходимо за подобряване на резултатите от все по-широко навлизащите ART технологии в съвременния свят. Усилията са насочени към *изследване на морфологични параметри, широк спектър от биомолекули (протеини, липиди, полизахариди РНК- и ДНК-мoleкули) и метаболитни продукти от жизнената дейност на изследваните клетъчни компоненти.*

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### ЦЕЛ

Да се разработят и въведат неинвазивни подходи с добра прогностична стойност за оценка на добитите при пункция ооцити, използвайки стойностите на изследваните аналити и тяхната връзка с основни параметри, ползвани в практиката по асистирана репродукция.

### ЗАДАЧИ

*1. Да се изследват нивата и взаимовръзките на разтворими белтъчни фактори (интерлевкени, хемокини, растежни фактори) и отношението между тях, в зависимост от:*

- възрастта на пациентите
- серумните нива на естрадиола
- резултата от оплождането
- морфологичното качество на яйцеклетките
- морфологичното качество на ембрионите
- биохимичния тест за бременност

*2. Да се изследват нивата и взаимовръзките на редица биохимични показатели в зависимост от:*

- възрастта на пациентките
- серумните нива на естрадиола
- резултата от оплождането
- морфологичното качество на яйцеклетките
- морфологичното качество на ембрионите
- биохимичния тест за бременност

*3. Да се изследват нивата и взаимовръзките на левкоцитните субпопулации, в зависимост от:*

- възрастта на пациентките

- серумните нива на естрадиола
- резултата от оплождането
- морфологичното качество на яйцеклетките
- морфологичното качество на ембрионите
- биохимичния тест за бременност

*4. Да се изследва взаимовръзката между подбран комплекс от биохимични показатели, белтъци, пептиди, растежни фактори, цитокини и цитологични показатели на фоликулярната течност.*

*5. Да се анализира прогностичната сила на изследваните групи от показатели и потенциалната им възможност за включване в математически модел за предсказване на случаите на успешна бременност.*

*6. Да се разработи статистически модел за прогнозиране на възможностите за успешно имплантиране на ембрионите и протичането на успешна бременност. Да се оцени ефективността на модела и да се проведе процедура за вътрешното му валидиране.*

### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

В настоящото изследване са анализирани стойностите получени за разтворими фактори във фоликулярната течност на две групи нестимулирани пациентки (пациентки оставени на естествен цикъл) (група А – 66 пациентки и група В – 96 пациентки) събрани и анализирани в периода от септември 2009 до септември 2012 г. в ЦРЗ „Надежда“ - гр. София.

Относно анализа на факторите във фоликулярната течност са използвани данни основно от втората група – група В (96) пациентки. Фоликулярните течности от пациентките от група А (66) е използвана за анализ само на няколко фактора (IL-1 $\alpha$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-12, Calcitonin) и концентрациите са свързани с възрастта на пациентките, нивата на естрадиола във ФТ, морфологичното качество на яйцеклетките, резултата от оплождането и морфологичното качество на ембрионите.

Фоликулярните течности от пациентките от група В (96) е използвана за анализ на всички останали аналити и концентрациите са свързани с възрастта на пациентките, нивата на естрадиола във ФТ, морфологичното качество на яйцеклетките, резултата от оплождането и морфологичното качество на ембрионите и с биохимичния тест за бременност.

В група А, данните получени за аналитите, са отнесени за всички изследвани ембриологични параметри, освен за имплантационния потенциал на ембрионите, защото ембрионите на пациентките от група А са замразявани и резултатът от ембриотрансфера не може да се отнесе за конкретен ембрион (при трансфер на повече от един ембрион).

Пациентките са подписали информирано съгласие за участие в изследването (Приложение №6). Резултатите, представени в настоящата работа, са част от инфраструктурен проект към Министерството на Образованието и Науката, спечелен през 2009 на тема „Създаване на център за изследване на факторите, повлияващи имплантацията на човешкия ембрион и оценка и модулиране рецептивността на ендометриума“.

### **Клинични методи**

1. Гинекологична анамнеза и статус
  - 1.1. Гинекологична анамнеза
- 1.2. Гинекологичен статус (оглед и палпация на ЖПО)
2. Инструментални образни методи
  - 2.1. Трансвагинален ултразвук
3. Клинични инвазивни (оперативни) методи
  - 3.1. Овариална пункция под ултразвуков контрол.
  - 3.2. Ембриотрансфер под ултразвуков контрол

### **Лабораторни методи**

1. Анализ на еякулата
2. Обработка на яйцеклетките
3. Инсеминиране на ооцитите
4. Оценка на зиготите
5. Морфологичен анализ на ембрионите
6. Култивиране, асистиран хетчинг и трансфер на ембрионите
7. Ензим-свързан имуносорбентен метод (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay)
8. Флоуцитометричен анализ на множество анализи в биологични течности
9. Определяне на клетъчния състав във фоликулярната течност и обработване на пробите за анализ
10. Определяне на биохимичните показатели във фоликулярната течност

### **Статистически методи**

1. Рангов Spearman корелационен анализ - за изследване на взаимовръзките между отделните показатели
2. t-тест на Student, еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), U-тест на Mann-Whitney и Kruskal-Wallis еднофакторен рангов дисперсионен анализ (ANOVA on Ranks) - за установяване на значими различия между отделните показатели

3. Критерий на Пирсон ( $\chi^2$ ) – за сравняване на честотите (%)
4. Стъпков регресионен анализ – “Backward elimination” – за подбор на прогностични показатели
5. Логистичен регресионен анализ – за разработване на прогностичния модел
6. Тест на Hosmer-Lemeshow – за калибриране на прогностичния модел
7. ROC криви и оценяване на AUC – за определяне на дискриминацията на модела
8. Тест на вероятностното съотношение (Likelihood Ratio Test Statistic),  $\chi^2$  тест на Пийърсън (Pearson Chi-Square ( $\chi^2$ ) тест) и  $-2 \log$  – вероятностна статистика – за отчитане на ниво на съответствие
9. Степен на различие между  $(e^{\beta_1 + \beta_2 + \beta_3} - 1)$  и  $(e^{\beta_1} - 1) + (e^{\beta_2} - 1)$  и RERI – за оценка на ефектите на взаимодействие
10. Статистика на Уолд (Wald statistic) – за анализ на ефективността на модела
11. Показатели на Кук (Cook’s distances) – за диагностика на влиянието на отделните резултати върху модела
12. Процедура на зареждане („bootstrapping”) - за вътрешно валидиране на модела

Проведените тестове за различие, дескриптивен, корелационен и регресионен статистически анализ са извършени със софтуер SigmaStat (v. 3.5). За графично представяне на резултатите чрез бокс-плотове е използван софтуер SigmaPlot (v. 9.0). За изготвянето на ROC криви и пресмятането на AUC е използван софтуер SPSS (v.16.0).

### **Изготвяне на предиктивен модел - алгоритъм на действие**

#### **Избор на показатели**

За конкретния модел са изследвани 75 показателя, принадлежащи към 4 основни групи – 1. общи биохимични показатели, 2. белтъци, пептиди и растежни

фактори, 3. цитокини и 4. цитологични показатели (клетки на имунната система) (фиг. 2)

|   |
|---|
| <b>1. Биохимични показатели (мерни единици):</b>  |
| <p><b>Na</b> (mmol/l), <b>K</b> (mmol/l), <b>Calc</b> (mmol/l), <b>Glu</b> (mmol/l), <b>Alb</b> (g/l), <b>TP</b> (g/l)</p> <p><b>AST</b> (U/L), <b>ALT</b> (U/L), <b>ALP</b> (U/L), <b>GGT</b> (U/L), <b>TBIL</b> (<math>\mu\text{mol/l}</math>), <b>DBIL</b> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</p> <p><b>AMY</b> (U/L), <b>CHOL</b> (mmol/l), <b>TG</b> (mmol/l), <b>HDLD</b>, <b>BUN</b> (mmol/l), <b>CR-S</b> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</p> <p><b>URIC</b> (<math>\mu\text{mol/l}</math>), <b>FE</b> (<math>\mu\text{mol/l}</math>), <b>OSMO</b> (mOsm/L), <b>A/G</b>, <b>IND BIL</b> (mg/dl), <b>BUN/CREA</b>, <b>LDL</b></p> |
| <b>2. Белтъци, пептиди и растежни фактори (мерни единици):</b>  |
| <p><b>LIF</b> (pg/ml), <b>Gly</b> (pg/ml), <b>LIF/Gly</b>, <b>G-CSF</b> (pg/ml), <b>Endothelin 2</b> (pg/ml), <b>IGFBP 3</b> (pg/ml), <b>Лактоферин</b> (ng/ml), <b>Трансферин</b> (pg/ml), <b>LTB 4</b> (pg/ml), <b>MMP9</b> (ng/ml), <b>Leptin</b> (ng/ml), <b>Calcitonin</b> (-), <b>HGF</b> (+) (ng/ml)</p>   |
| <b>3. Цитокини и хемокини (мерни единици):</b>  |
| <p><b>IL8</b> (pg/ml), <b>IL-6</b> (pg/ml), <b>IL-1a</b> (pg/ml), <b>IL 2</b> (+/-) (pg/ml), <b>IFN g</b> (+/-) (pg/ml), <b>IL12</b> (-) (pg/ml), <b>Rantes</b> (+) (pg/ml), <b>TNF a</b> (+) (pg/ml), <b>IL1 b</b> (+/-) (pg/ml), <b>IL4</b> (+/-) (pg/ml), <b>IP 10</b> (+/-) (pg/ml), <b>IP10</b> (pg/ml), <b>IL 10</b> (+) (pg/ml), <b>MIG</b> (+) (pg/ml), <b>IL1 a</b> (+/-) (pg/ml), <b>MIP 1b</b> (pg/ml), <b>MIP1a</b> (pg/ml), <b>CCL2</b> (pg/ml)</p>  |
| <b>4. Цитологични показатели (мерни единици):</b>   |
| <p><b>обем FF/ml</b>, <b>Leu</b> (<math>10^3/\text{mm}^3</math>), <b>PLT</b> (<math>10^3/\text{mm}^3</math>), <b>Sg</b> (%), <b>N Sg</b> (cell N/<math>\text{mm}^3</math>), <b>Ab N Sg cells</b> (cell N), <b>Ly</b> (%), <b>N Ly</b>, <b>ab N Ly</b> (cells/<math>\text{mm}^3</math>), <b>Mo</b> (cell N), <b>N</b> (%), <b>ab.N Mo</b> (cell N), <b>T</b> клетки (%), <b>B</b> клетки (%), <b>NK</b> клетки (%), <b>16+56+</b> (cell N), <b>56+16-br</b> (cell N), <b>56+16-dim</b> (cell N), <b>NKT</b> клетки (%)</p>   |

Фиг. 1 Изследвани потенциални прогностични показатели



Фиг. 2 Основни етапи в подготовката, разработката и оценката на модела



## IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

В настоящото изследване се анализира връзката на основни клинични и ембриологични събития (възраст, качество на яйцеклетки, качество на ембриони, оплождане, биохимична бременност) с над 70 показатели, разпределени в три големи групи:

1. група - цитокини, хемокини и белтъчни фактори;
2. група - биохимични показатели
3. група - клетъчни елементи

### 1. Възраст на пациентите

Табл.1 Показатели с достоверни различия при пациенти с различна възраст

| Показател         | 1 група<br>(≤ 34 год.) | 2 група<br>(> 34 год) | P - стойност |
|-------------------|------------------------|-----------------------|--------------|
| МIP-1β<br>(pg/ml) | 41,76 ± 14,26          | 39,33 ± 18,64         | <u>0,052</u> |
| Лептин            | 200,0 ± 154,9          | 288,2 ± 190,0         | <u>0,020</u> |
| ТВIL<br>(μmol/l)  | 3.13 ± 2.71            | 2.38 ± 0.98           | <u>0,036</u> |
| ДВИL<br>(μmol/l)  | 2.66 ± 0.78            | 2.06 ± 0.88           | <u>0,006</u> |

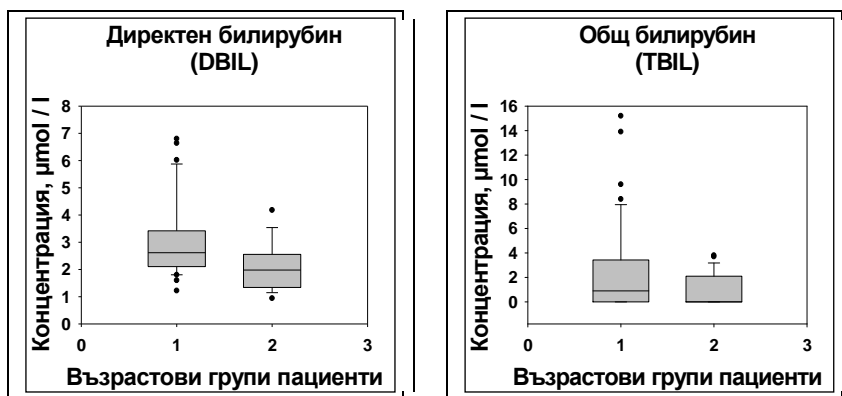
При сравняване на концентрацията на **МIP-1β** във ФТ при пациенти от различни възрастови групи се установява минимална разлика (табл. 1), която е статистически достоверна (P=0,052) (фиг.4). Вероятно, понижаването в експресията на МIP-1β следва възрастовите промени в яйчника и би могъл да се използва като предиктивен белег за физиологично остаряване на яйчника.

Освен за МIP-1β получените резултати за **лептина** също се различават значимо в зависимост от възрастта на пациентите (p=0,02). Наблюдават се повишени нива на лептина в групата на пациентите над 34 год., докато при тези под 34 г. стойностите са по-ниски (табл.1).

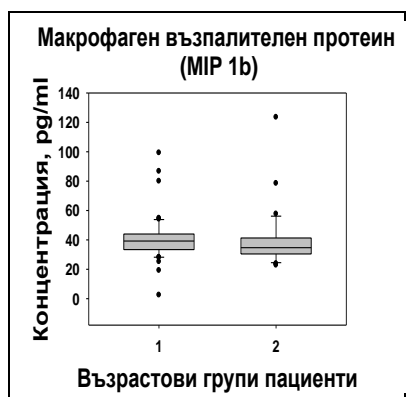
Получените резултати ни дават основание да приемем лептина като предиктивен маркер за биологично стареене, за морфологично и функционално качествени яйцеклетки. Необходими са допълнителни изследвания, за да потвърдим или отхвърлим предиктивността на този фактор и по отношение на качеството на ембионите и имплантационния им потенциал.

Вероятно по-високите нива на лептина във ФТ подтискат яйчниковия отговор към гонадотропини, овариалната стероидогенеза, продукцията на естрадиол, зреенето на фоликула и образуването на компетентни яйцеклетки, всичко това рефлектира и върху крайния резултат – забременяването. Получение резултати показват, че лептинът е подходящ прогностичен показател за стареенето на яйчника.

По-високи стойности на **DBIL** и **TBIL** са отчетени в групата < 34 г.,  $p=0,036$ ). Концентрацията на конюгираният (директен) билирубин също се променя съществено с възрастта (по-високи стойности в групата <34 г.,  $p=0,006$ ). **Директният и тоталният билирубин (DBIL и TBIL)** са анализите, при които се установяват статистически значими различия в зависимост от възрастта на пациентите, морфологичното качество на ембрионите, клиничните групи и имплантация. Първото впечатление, което остава след анализа на резултатите е, че по-високите нива на билирубините се свързват с по-добра прогноза на почти всички параметри.



Фиг. 3 Концентрация на (а) Директен билирубин DBIL и (б) Тотален билирубин TBIL, в зависимост от възрастовите групи пациенти (1гр.  $\leq 34$  год; 2 гр.  $> 34$  год.)



Фиг. 4 Графично разпределение на стойностите на MIP1- $\beta$  по групи (група 1  $\leq$  34 години; група 2  $>$  34 години) спрямо параметъра „възраст на пациентките“.

## 2. Морфология на яйцеклетките.

При сравняване на изследваните анализи при пациенти с различно качество на яйцеклетките се разграничават 10 анализа, при които се отчитат статистически достоверни различия (табл 2).

Табл.2 Показатели с достоверни различия при пациенти с различна морфология (качество) на яйцеклетките

| Показател           | 1 група<br>(добра<br>морфология) | 2 група<br>(лоша<br>морфология) | P - стойност        |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Ca (pg/ml)          | 2.01 $\pm$ 0.14                  | 6.58 $\pm$ 3.86                 | <u><b>0.022</b></u> |
| AST (U/L)           | 20.57 $\pm$ 3.55                 | 22.48 $\pm$ 3.50                | <u><b>0.072</b></u> |
| ALT(U/L)            | 9.08 $\pm$ 1.50                  | 10.10 $\pm$ 1.97                | <u><b>0.048</b></u> |
| URIC ( $\mu$ mol/l) | 191.7 $\pm$ 42.6                 | 212.1 $\pm$ 43.6                | <u><b>0.028</b></u> |
| Лептин              | 201,3 $\pm$ 164,0                | 284,6 $\pm$ 175,0               | <u><b>0,048</b></u> |
| IL4 (pg/ml)         | 15,87 $\pm$ 5,28                 | 11,512 $\pm$ 5,21               | <u><b>0,002</b></u> |
| MIG (pg/ml)         | 59,57 $\pm$ 24,63                | 47,16 $\pm$ 15,96               | <u><b>0,040</b></u> |

|  |              |              |                     |
|--|--------------|--------------|---------------------|
| <b>MMP9</b> (ng/ml)                            | 20,57 ± 8,28 | 25,24 ± 7,84 | <b><u>0,04</u></b>  |
| <b>Leu</b> (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 0.73 ± 0.90  | 1.36 ± 1.19  | <b><u>0.027</u></b> |
| <b>NSg</b> (cell N/ml)                         | 468.68 ± 558 | 949.76 ± 933 | <b><u>0.045</u></b> |

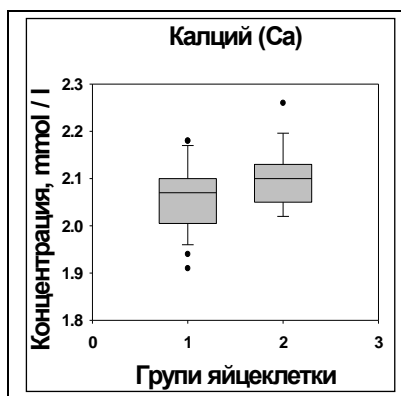
Добре известно е, че **калцият** е въввлечен във физиологията на ооцита от оогенезата, през съзряването на яйцеклетката до нейното оплождане от сперматозоида (Homa S, 1995; Carroll J et al., 1996; Stricker S, 1999). Въпреки големия интерес към калциевите осцилации, калций-опосредстваните процеси, протичащи в клетката и изследването на калций-свързващите белтъци и тяхната роля в различни процеси, нивата на калциевите йони във фоликуларната течност и връзката им с репродуктивните процеси, не е изследвана задълбочено.

Анализът на данните за концентрацията на **калциеви йони** във фоликуларната течност на пациентите доказва наличие на достоверни разлики с качеството на яйцеклетките ( $p=0,022$ ). Разликата на средните стойности за анализа в група 1 и група 2 е минимална (средни стойности – 1 гр. 2,014 mmol/L и 2 гр. 2,14), но статистически достоверна. Нивата на калция са по-високи в групата на яйцеклетките с лошо качество. В литературата почти липсват изследвания, свързващи нивата на този елемент с ембриологичните показатели при ART. От получените резултати следва, че нивата на калциевите йони във ФТ могат да послужат като негативен маркер за морфологичното качество на яйцеклетките.

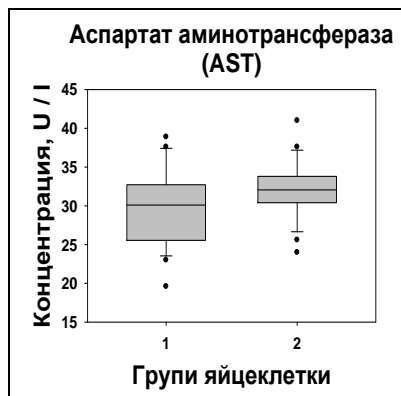
Ооцитите на бозайниците метаболизират аминокиселини посредством кумулусните клетки. Кумулусните клетки съдържат високи концентрации на два важни за метаболизма на аминокиселините ензима – **аланинаминотрансфераза (ALT) и аспаргатаминотрансфераза (AST)** (Cetica P. et al, 2003). Авторите предполагат, че соматичните клетки предоставят на ооцитите аминокиселини и други субстрати. Ооцитите също притежават AST и ALT, но в по-малки количества от кумулусните клетки, затова те продължават да метаболизират аминокиселини и след дисоцииране с кумулуса (Cetica P. et al, 2003).

**ALT** също показва наличие на достоверни различия между случаите с яйцеклетки с различно морфологично качество ( $p=0,048$ ). Средната стойност в групата на яйцеклетките, с лошо качество е по-висока (10,6 U/L) от тази в групата с добро качество (9,3 U/L). Макар „ $p$ ”-стойността при сравняване на средните стойности за **AST** с качеството на яйцеклетките да надвишава 0,05 ( $p=0,072$ ), подобно на **ALT** тук също се отчитат повишени стойности в групата на „лошите“ яйцеклетки (23,5 U/L срещу 20,6 U/L).

**Пикочната киселина** във ФТ се отличи с различни стойности при пациенти с различно качество на яйцеклетките. По-високи средни стойности се откриват в група 2 – 223,4  $\mu\text{mol/L}$  (яйцеклетки с лошо качество) в сравнение с група 1 – 191,8 (яйцеклетки с добра морфологична оценка). Подобна зависимост се установява и за възрастта, и за качеството на ембрионите, но тя не е статистически достоверна.



а)



б)



неефективна фоликулогенеза. Тези данни се потвърждават в нашето изследване - по-високи стойности на анализа се наблюдават в групата на морфологично „добрите“ яйцеклетки (табл. 2). Авторите доказват по-ниски стойности от анализа и в групата на неуспешно оплодените яйцеклетки. Нашите данни подкрепят това наблюдение, но „р“ стойността е по-малка от 0,05 (табл. 2).

Досега няма публикувани данни за експресията на **MIG** във фоликуларната течност, както и за участието му в патогенезата на репродуктивни събития, по време на овулаторния процес.

Резултатите, получени от екипа ни, се оказват изключително интригуващи, особено при анализите, сравняващи нивата на хемокина във ФТ, спрямо качеството на яйцеклетките и резултата от трансфера. По-висока е концентрацията на хемокина в групата на яйцеклетките, с добра морфологична оценка (табл. 2). По-висока е стойността за анализа и по отношение на морфологията на ембрионите, но докато резултатите спрямо яйцеклетките са статистически достоверни, то спрямо ембрионите „р“ стойността надвишава 0,05 (табл. 2)

Статистически достоверна разлика се установява при сравняването на концентрацията на **ММР9** във ФТ с качеството на яйцеклетките ( $p=0,038$ ), както и с изхода от ЕТ ( $p=0,018$ ).

В настоящото изследване откриваме по-високо, статистически значимо, повишаване на концентрацията на ензима във фоликуларни течности, от които произлизат яйцеклетки с „лоша“ морфология ( $p=0,038$ ) (табл. 2). Без да е статистически значимо ( $p=0,336$ ) това наблюдение се прехвърля и при анализа на фактора в групите на „добрите“ и „лошите“ ембриони, където по-високи концентрации откриваме отново в групата на морфологично „лошите“ ембриони.

Друг анализ показва статистически значима връзка с морфологията на яйцеклетките е **лептина**. Резултати показват наличие на значима връзка на изследвания анализ и с възрастта на пациентите ( $p=0,02$ ) като в групата на по-възрастните пациентки стойностите му са по-високи. Подобен е и случаят в групите на яйцеклетките – високи стойности на лептина се измерват във ФТ от лоши

яйцеклетки (284,6 ng/ml), а в групата на морфологично добрите те са по-ниски (201,3 ng/ml).

В публикация от 2005 г., Анифандис и колектив (Anifandis G et al., 2005) свързват повишените нива на лептин в серума на IVF-пациентки с намален отговор към стимулация, забавено развитие на фоликулите, лошо качество на ембрионите и понижени нива на забременяване. В нашето изследване повишените нива на лептин във ФТ също се свързват с наличието на яйцеклетки с лошо качество, като разликите са статистически достоверни ( $p=0,048$ ).

Подобно на резултатите, получени за тоталния клетъчен брой, анализът на резултатите за **левкоцитите** показва наличие на по-ниски средни стойности за групите на яйцеклетките и ембрионите, с добра морфологична характеристика. Този резултат е логичен, като се има предвид, че левкоцитите представляват по-голям процент от негранулозните клетки във ФТ.

Левкоцитите секретират биологично активни молекули, оркестриращи процеси като фоликулогенеза, овулация, формиране и разрушаване на корпус лутеум (Brannstrom M § Norman R, 1993; Vinatier D et al., 1995; Terranova PF § Rice V, 1997). Ненормалното повишение на тоталния брой левкоцити във фоликулярната течност, обаче, както се вижда от нашето изследване, се свързва с лоша морфологична оценка на яйцеклетките и ембрионите.

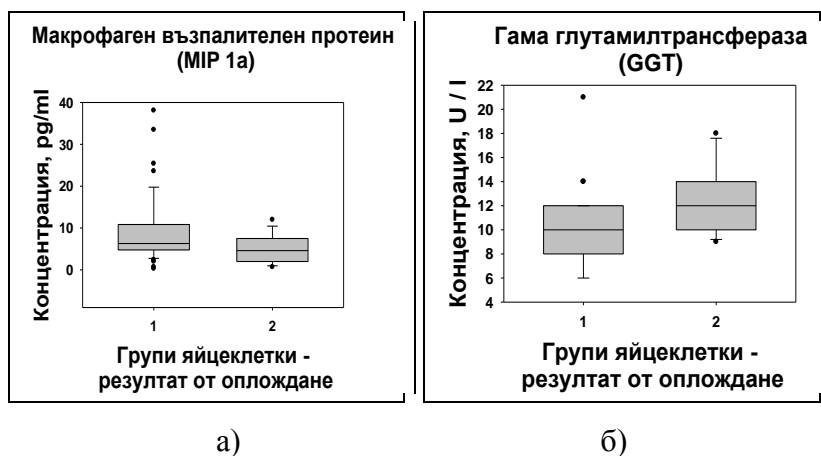
Подобно на резултатите за общия брой клетки и за левкоцитите във ФТ, анализът на данните за **гранулоцитите** показва наличие на по-високи средни стойности за този клетъчен тип при яйцеклетките и ембрионите с лош морфологичен скор (група 2 за яйцеклетките и група 4 за ембрионите). Това важи, както за клетъчния брой, изчислен за милилитър, така и за абсолютния брой гранулоцити, а също и за процентния им дял. Така или иначе тенденцията е ясно видима, а именно, по големият брой сегментоядрени клетки се свързва с лошо качество яйцеклетки и ембриони.



### 3. Резултат от оплождането

Табл.3 Показатели с достоверни различия при пациенти с различен резултат от оплождането. 1 група включва нормално оплодени яйцеклетки (с 2 пронуклеуса). 2 група включва аномално оплодени яйцеклетки (с 0, 1 или 3 пронуклеуса), както и лизирани или незрели ооцити.

| Показател              | 1 група<br>(2 PN) | 2 група<br>(0; 1; 3 PN) | P - стойност |
|------------------------|-------------------|-------------------------|--------------|
| MIP-1 $\alpha$ (pg/ml) | 56,58 $\pm$ 178,9 | 38,55 $\pm$ 139,2       | <u>0,027</u> |
| Rantes (pg/ml)         | 17,37 $\pm$ 5,55  | 20,85 $\pm$ 6,06        | <u>0,007</u> |
| GGT (U/L)              | 9.98 $\pm$ 2.25   | 12.10 $\pm$ 2.13        | <u>0,013</u> |



Фиг.6 Концентрация на (а) MIP1- $\alpha$  (б) гама глутамилтрансферазата (GGT) във фоликуларната течност в зависимост от резултата от оплождане. 1 гр. включва нормално оплодени яйцеклетки (с 2 пронуклеуса); 2 гр. включва аномално оплодени яйцеклетки (с 0, 1 или 3 пронуклеуса), както и лизирани или незрели ооцити.

Условно разделихме зиготите на изследваните пациентки в две групи: група 1 (2 PN – тук влизат всички яйцеклетки, при които след оплождане се образуват 2 пронуклеуса 2PN, т.е. оплождането е преминало нормално) и група 2 (тук се

включват останалите варианти на този параметър – 1PN, 3PN, незрели, лизирани), т.е всички случаи, при които оплождането се отклонява от нормата.

За разлика от MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  показва връзка с параметъра „резултат от оплождане на яйцеклетки”. Установяват се по-високи средноаритметични стойности за този хемокин във фоликулярната течност на група 1 (правилно оплодените), в сравнение с група 2 (неоплодените или неправилно оплодените) (56,6 pg/ml към 38,6 pg/ml съответно).

Публикациите за наличието на **RANTES** във фоликулярната течност са оскъдни. Леди и колеги (Le'de'e N, 2008) намират значително по-високи концентрации на CCL5 във ФТ, от която произхождат яйцеклетки, даващи ембриони с високо качество. Авторите считат, че продуцираният CCL5 от Т-клетките, които заобикалят гранулозните клетки, служи като хемоатрактант. Ние не установяваме подобна зависимост в настоящата работа, напротив, малко по-високи са нивата на хемокина в групата на яйцеклетките, с лоша морфологична оценка (табл.3). Още повече, анализирайки връзката на CCL5 с резултата от оплождането, доказваме статистическо значимо ( $p=0,007$ ) повишаване на хемокина в групата на неуспешно оплодените яйцеклетки (табл.3). Получените резултати показват, че **RANTES** може да се използва като негативен предиктор за резултата от оплождането.

В публикация на Tetsuya и колектив (Tetsuya I. et al., 2002) откриват мРНК в сперматозоиди при човек, за два рецептора за този хемокин – CCR-1 и CCR-5, като той се открива освен във ФТ и в семиналната плазма. Авторите съобщават за средна концентрация на RANTES във ФТ от 234 pg/ml, значително по-високо от средната стойност изчислена в настоящия труд.

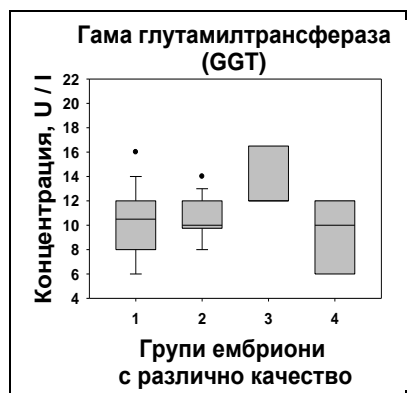
Подобно на резултатите, получени за RANTES по-високи средни стойности на **GGT** (12,1 U/L) се откриват в групата на неуспешно оплодените яйцеклетки (група 2 - 0PN, 1 PN, 3 PN, лизирани), докато в групата на нормално оплодените тази стойност е по-ниска (10,32 U/L).

#### 4. Морфология на ембрионите

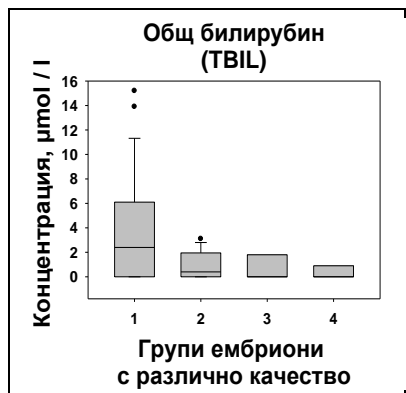
Качеството на ембрионите се определя по няколко критерии: пронуклеарен скор, скорост на делене, брой бластомери, симетрия на бластомерите, наличие на фрагментация, многоядреност. Използвайки горните критерии ембрионите се подреждат в 4 групи като в 1-ва група са представени морфологично най-качествените а в 4-та ембрионите с най-лоша морфология (табл.4).

Табл.4 Показатели с достоверни различия при пациенти с различна морфология (качество) на ембрионите

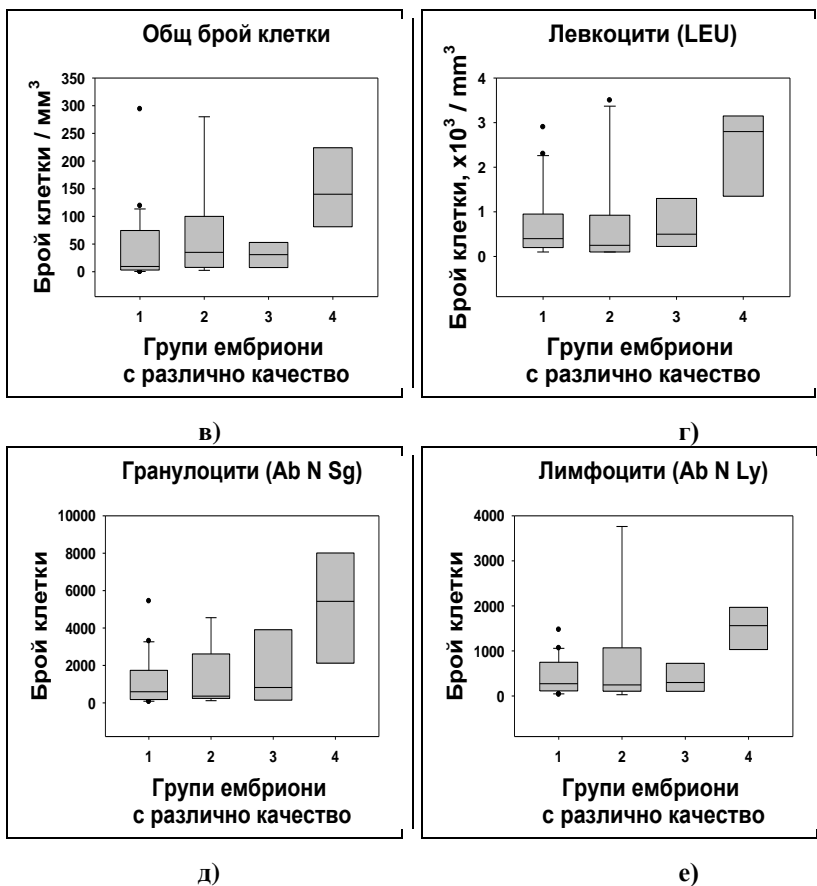
| Показател                               | 1 група<br>(отлични) | 2 група<br>(добри) | 3 група<br>(лоши) | 4 група<br>(много лоши) | P -<br>стойност     |
|---|----------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| GGT (U/L)                               | 10.32 ± 2.77         | 10.64 ± 1.74       | 12.00 ± 0.03      | 8.80 ± 2.68             | <b><u>0.045</u></b> |
| TBIL (µmol/l)                           | 4.45 ± 2.62          | 1.63 ± 1.00        | 2.40 ± ---        | 0.90 ± 0.71             | <b><u>0.045</u></b> |
| N (cells/mm <sup>3</sup> )              | 35 ± 37              | 40 ± 49            | 40.61 ± 16.82     | 100.83 ± 54.57          | <b><u>0.048</u></b> |
| Leu (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 0.63 ± 0.63          | 0.44 ± 0.67        | 0.68 ± 0.59       | 1.35 ± 0.35             | <b><u>0.025</u></b> |
| Ab N Sg cells<br>(cell N)               | 1141 ± 1404          | 1272 ± 1821        | 1625 ± 2158       | 3224 ± 2017             | <b><u>0.037</u></b> |
| NSg (cell N/ml)                         | 388 ± 458            | 473.56 ± 665       | 487.44 ± 496      | 830.00 ± 139            | <b><u>0.029</u></b> |
| N Мо/мл<br>(cells/mm <sup>3</sup> )     | 35.21 ± 37.51        | 39.89 ± 48.89      | 40.61 ± 16.82     | 100.83 ± 54.57          | <b><u>0.048</u></b> |
| Ab N Ly (cell N)                        | 449.07 ± 411         | 388.75 ± 509       | 375.92 ± 345      | 1512.08 ± 535           | <b><u>0.038</u></b> |



а)



б)



Фиг. 7 Концентрация на:

(а) гама-глутамилтрансферазата (GGT), (б) Общ билирубин (TBIL)

(в) общ брой клетки,

(г) левкоцити

(д) гранулоцити,

(е) лимфоцити

във фоликуларната течност в случаи с различно качество на ембрионите:

1 гр. – ембриони, с отлично качество, 2 гр. – ембриони, с много добро качество,

3 гр. – ембриони, с добро качество, 4 гр. – ембриони, с лошо качество

Анализът показва наличието на връзка на 8 параметъра с морфологията на ембриона (табл. 4). Два спадат към групата на биохимичните показатели (GGT и TBIL) а останалите 6 принадлежат към клетъчните елементи (N, Leu, Ab N Sg, N Sg, N Mo, Ab N Ly)

Нашите резултати показват статистически достоверни различия при сравняване на нивата на GGT освен с резултата от оплождането и с качество на ембрионите. По-високи средни стойности от **GGT** (12,1 U/L) се откриват в групата на неуспешно оплодените яйцеклетки (група 2 - 0PN, 1 PN, 3 PN, лизирали), докато в групата на нормално оплодените тази стойност е по-ниска (10,32 U/L) (табл.3). Подобна е ситуацията при сравняване на стойностите за анализа с качеството на ембрионите – по-високи нива се забелязват в групата на ембрионите с лоша морфология (G1 спрямо G2 и G3), изключение прави стойността в G4 групата, която е най-ниска (табл.4). Прекалено високите или ниски стойности характеризират ембриони с лоша морфологична оценка. Статистически достоверни са отместванията на G1 спрямо G3 и на G3 спрямо G4.

Стойностите на **TВІL** са значително по-високи в групата на ембрионите с добра морфология ( $p=0,045$ ). Ембрионите, с най-добра морфологична оценка, са с най-високи средни стойности за анализа (G1-3,836  $\mu\text{mol/L}$  към G4-0,36  $\mu\text{mol/L}$ ).

Най-голям е средният **брой тотални клетки (N)** във фоликулите, от които произлизат ембриони, с най-лоша морфологична оценка – група 4 (150,1  $\text{cells/mm}^3$ ). Разликата с останалите групи е достоверна ( $p=0,048$ ). Явно по-големият брой клетки на имунната система във ФТ компроментира оогенезата и влошава качеството на ембрионите. Вероятно натрупването им там е резултат от възпалителен процес или друг тип имунна дисрегулация *in situ*. По-голяма разлика в общата клетъчна концентрация се установява и за показателя “морфологично качество на яйцеклетките”, където в групата с лошо качество клетъчната концентрация е  $72,56/\text{mm}^3$ , а в групата на яйцеклетките, с добра морфология тази стойност пада до  $23,12/\text{mm}^3$ . В групата на нормално оплодените, на пациентките под 34 години, и на тези с положителен тест за бременност, общият клетъчен брой е по-нисък, в сравнение с противоположната група.

Може да се каже, че тоталният клетъчен брой (N) може да се използва като негативен предиктор на морфологичното качество на ембрионите.

Подобно на резултатите, получени за тоталния клетъчен брой, анализът на резултатите за **левкоцитите (Leu)** показва наличие на по-ниски средни стойности за групите на яйцеклетките и ембрионите, с добра морфологична характеристика. Този резултат е логичен, като се има предвид, че левкоцитите представляват по-голям процент от негранулозните клетки във ФТ. Отместването е статистически значимо спрямо качеството на ембрионите ( $p=0,025$ ). Относно качеството на ембрионите, групата с най-лошо качество (G4) се различава значимо от останалите 3 групи (G1, G2 и G3).

По-високите нива на левкоцити във ФТ могат да се използват като негативен прогностичен белег за качеството на яйцеклетките и ембрионите при *in vitro*-процедурата.

От информацията, предоставена в литературния обзор става ясно, че във ФТ, около времето на овулацията, активно се инфилтрират **сегментоядрени клетки (Sg)** (основно неутрофили). Счита се, че те вземат дейно участие в процесите на лизиране на стената на яйчника и освобождаване на яйцеклетката във Фалопиевата тръба.

Подобно на резултатите за общия брой клетки и за левкоцитите във ФТ, анализът на данните за гранулоцитите показва наличие на по-високи средни стойности за този клетъчен тип при яйцеклетките и ембрионите с лоша морфологична оценка (група 2 за яйцеклетките и групи 3 и 4 за ембрионите). Това важи, както за клетъчния брой, изчислен за милилитър (концентрация – N Sg), така и за абсолютния брой гранулоцити (Ab N Sg) (табл. 4).

Изследванията на клетъчния състав на фоликуларната течност на пациентки от IVF- цикли, установяват значителен брой **макрофаги** и **моноцити** в течността и документират присъствието им в срези на нормален яйчник (Loukides J, 1990). Подобно на резултатите, получени за общия процент клетки и левкоцитите, прегледът на данните за моноцитите установява подобна зависимост по отношение на качеството на ембрионите и яйцеклетките. Повече моноцити (изчислени като брой за милилитър - NMo/ml и като общ брой – AbNMo), се откриват в групата на

ембрионите с лоша морфология, като резултатите са статистически достоверни табл. (p=0,048 и p=0,044 съответно) (табл. 4).

От данните, получени за левкоцитите и връзката им с изследваните от нас ембриологични параметри, може да се обобщи, че покачването на левкоцитите като цяло, а също и на сегментоядрените гранулоцити и на моноцитите във ФТ е свързано с лошо качество на яйцеклетките и ембрионите (p<0,05).

Данни, относно връзката на Т- и В-клетъчни **лимфоцити** във фоликулярната течност с ембриологичните показатели и изхода от АРТ процедурите почти липсват в литературата.

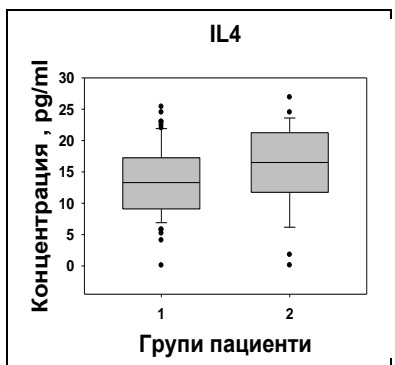
Подобно на резултатите, получени за левкоцитите анализът на данните за лимфоцитите показва наличие на по-високи средни стойности за този клетъчен тип при яйцеклетките и ембрионите, с нарушена морфология (група 4 за ембрионите) (табл. 4). Това важи както за абсолютния брой лимфоцити, така и за процентния им дял. По отношение качеството на ембрионите единствено абсолютният брой лимфоцити във ФТ (AbNLY cells) показва статистически достоверни различия (P=0,038).

## **5. Имплантационен потенциал на ембрионите**

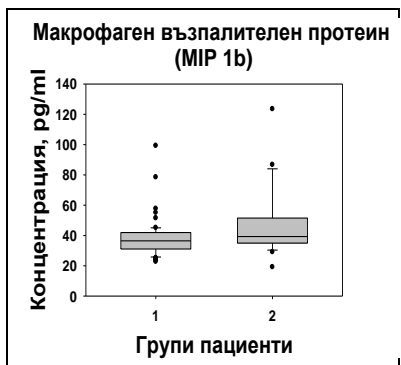
При сравняване на концентрацията на **изследваните аналити** с имплантационния потенциал на ембрионите, ние разделихме трансферираните ембриони на две групи: група 1 – обединени случаи, при които след ЕТ не се установява имплантация (- hCG тест) и група 2 – случаи, при които след осъществен ЕТ, се установява положителен тест за бременност (+hCG).

Табл.5 Показатели с достоверни различия при пациенти с различен имплантационен потенциал – резултат от биохимичния тест за бременност

| Показател             | 1 група<br>(отлични) | 2 група<br>(добри) | Р - стойност        |
|-----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| <b>IL4</b> (pg/ml)    | 13,28 ± 5,48         | 15,84 ± 6,65       | <u><b>0,068</b></u> |
| <b>MIP-1β</b> (pg/ml) | 37,86 ± 12,06        | 47,27 ± 22,56      | <u><b>0,002</b></u> |
| <b>CCL2</b> (pg/ml)   | 385,4 ± 389,2        | 288,0 ± 90,5       | <u><b>0,071</b></u> |
| <b>MIG</b> (pg/ml)    | 50,56 ± 17,49        | 66,5 ± 20,46       | <u><b>0,001</b></u> |
| <b>MMP-9</b> (ng/ml)  | 22,66 ± 8,49         | 18,27 ± 7,02       | <u><b>0,018</b></u> |
| <b>Лактоферин</b>     | 528,4 ± 243,6        | 400,9 ± 179,6      | <u><b>0,015</b></u> |
| <b>DBIL</b> (μmol/l)  | 2.30 ± 0.83          | 2.80 ± 0.82        | <u><b>0,015</b></u> |
| <b>TBIL</b> (μmol/l)  | 2.27 ± 2.41          | 3.62 ± 2.30        | <u><b>0,002</b></u> |

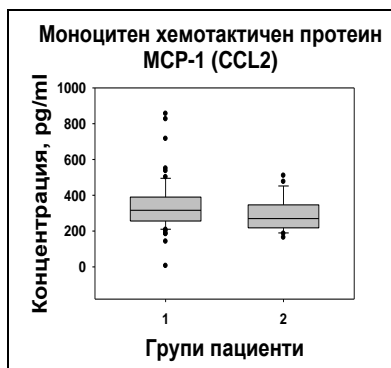


а)

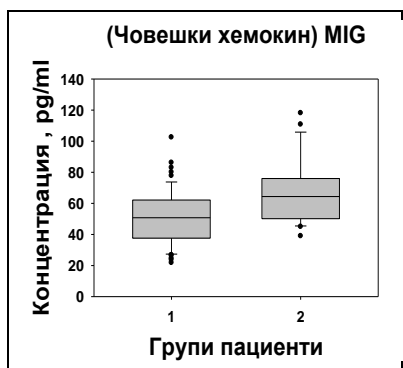


б)

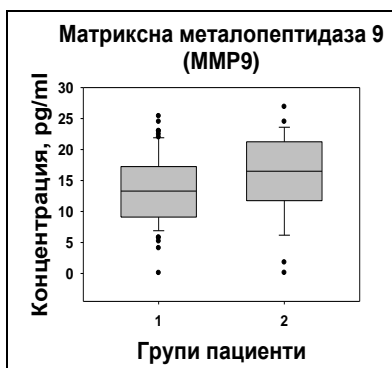




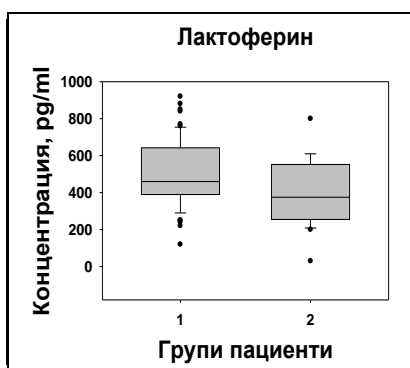
в)



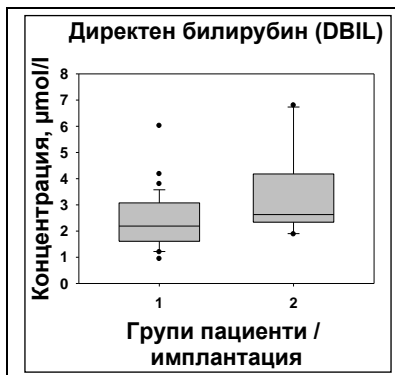
г)



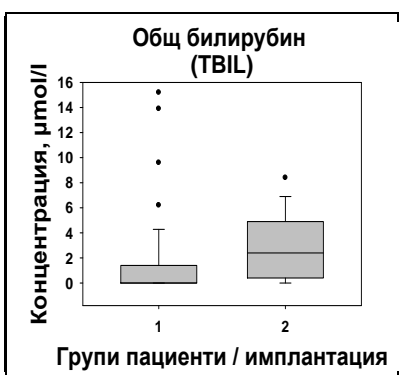
д)



е)



ж)



з)

Фиг. 8 Концентрации на (а) IL4, (б) MIP1-β, (в) MCP-1 (CCL2), (г) MIG (човешки хемокин CXCL9), д) (MMP9), е) (лактоферин), ж) (DBIL), з) (TBIL) във фоликуларната

течност на 2 групи пациенти с различен резултат на биохимичния тест за бременност (hCG) (група 1 – „-hCG”; група 2 – „+hCG”)

Анализът установи 6 молекули (citoкени, хемокини, ензими, др. белтъци) имащи отношение към най-важния клиничен показател – достигането на биохимична бременност (+/- hCG)

При изследване на нивата на **IL4** във фоликулна течност във връзка с имплантационния потенциал на ембрионите, Ostanin и колеги (Ostanin A, 2007) доказват по-ниски стойности на анализа в групата на незабременелите жени. Нашите резултати напълно подкрепят резултатите на руските колеги. По-високи са отчетените стойности в групата на успешно имплантираните ембриони, което прави **IL4** един от важните анализи за предскаване на имплантационния потенциал.

Анализът на данните показва наличие на статистически достоверна разлика между горните групи. Средните стойности за анализа в първата група е 37,86 pg/ml, докато при втората е значимо по-висока – 47,27 pg/ml (P=0,002) (табл. 5). Това свързва по-високите нива на **MIP-1 $\beta$**  във ФТ с по-голям шанс на ембриона, произлязъл от съответната яйцеклетка да се имплантира след трансфер. Тези резултати ни дават основание да приемем MIP-1b, като предиктивен маркер за имплантационен потенциал.

От получените резултати (табл. 5) за концентрацията на **CCL2** във фоликуларната течност се вижда, че няма параметри, с които да свържем този хемокин. Близки до статистическата достоверност са получените различия за качеството на яйцеклетките (p=0,087) и положителния тест за бременност (p=0,071). Освен това ембрионите, които достигат до ембриотрансфер, а след това и до имплантация (група 2 +hCG) произлизат от фоликули, в които концентрацията на CCL2 е по-ниска (288 pg/ml) спрямо тази при групата с отрицателен тест за бременност (385 pg/ml).

Различни проучвания (Arici A, 1997; Yin-Yan He et al., 2007) предполагат участието на хемокина CCL2 в процесите на въвличане и активиране на макрофаги от периферията през стените на яйчника във фоликула, където този клетъчен тип е

силно представен и участва в крайните етапи на фоликулогенезата. Експресията на MCP-1 (CCL2) в ин-витро култивирани стромални яйчникови и лутеални-гранулозни клетки се повишава дозо- и време-зависимо, след прилагане на IL-1a и TNF-a, за които се вижда, че са представени във фоликуларната течност.

Определянето на концентрацията на CCL2 във фоликуларната течност на изследваните пациентки показват стойности на хемокина, съпоставими със стойностите, определени от други автори (Xu H et al., 2006). Те установяват, че концентрацията на този хемокин е по-ниска при пациентки, с ендометриоза ( $330 \pm 29.2$  pg/ml), сравнена с тази при жени, с тубарен фактор ( $420.5 \pm 46.6$  pg/ml). Съответно процентът на оплождане на яйцеклетките при групата с ендометриоза е значително по-нисък (54%) отколкото при групата с тубарен фактор (73%,  $p < 0.05$ ), както и процентът на забременяване (19% срещу 35% съответно,  $p < 0.01$ ).

Екипът на Кавано (Kawano Y, 2001) установява значително по-високи нива на CCL2 във ФТ, сравнени с тези в серум ( $p < 0.01$ ). Освен това концентрацията на хемокина е по-висока във фоликули със зрели яйцеклетки в сравнение със такива с незрели яйцеклетки ( $p < 0.05$ ). Подобно на изследванията на Кавано, в нашето проучване нивата на CCL2 са по-високи в групата на морфологично по-добрите яйцеклетки, но не се установява статистически достоверна разлика между групите - „добри“ и „лоши“ яйцеклетки. Стойностите са близки – 366,8 pg/ml и 359,5 pg/ml, ( $p = 0,087$ ).

По отношение на теста за бременност, по-ниски нива на хемокина се установяват в групата с положителен тест, в сравнение с тези, при които имплантация не се е осъществила (288 към 385 pg/ml, съответно).

Би могло да се предположи, че по-високите нива на CCL2 са по-скоро негативен предиктор за имплантационен потенциал, отколкото обратното, но за да се потвърди или отхвърли това предположение, е необходимо изследване с повече пациентски проби.

Досега няма публикувани данни за експресията на **MIG** във фоликулярната течност, както и за участието му в патогенезата на репродуктивни събития, по време на овулаторния процес.

Нивата на **MIG** са статистически значимо повишени и в групата на успешно имплантираните ембриони (табл.5), което го прави идеален позитивен предиктор за имплантационния потенциал на трансферираните ембриони, получени от естествен цикъл.

Друг анализ, който показва връзка с имплантационния потенциал е **MMP9**. Статистически достоверна разлика се установява при сравняването на концентрацията на **MMP9** във ФТ с качеството на яйцеклетките ( $p=0,038$ ), както и с изхода от ЕТ ( $p=0,018$ ). Разглежданите случаи са разделени на две групи, в зависимост от резултата от биохимичния тест за бременност (положителен или отрицателен).

Lee D.M. и колеги (Lee D, 2005) измерват експресията на **MMP-9** във ФТ и проби от културална среда, посредством зимография. Активността и експресията на **MMP-9**, според тези автори, строго корелира с по-високи нива на оплождане и бременност - активността на този ензим е значително по-висока в групата на бременните, сравнена с тази на неуспелите да забременеят ( $p<0,01$ ). За разлика от Lee D.M. ние установяваме, статистически значими ( $p=0,018$ ), по-високи средни стойности за **MMP9** във фоликулярните течности на пациентки, с отрицателен **hCG** тест (22,66 ng/ml), в сравнение с групата, с положителен тест (18,27 ng/ml).

Освен това, в нашето изследване откриваме по-високи, статистически значими, стойности за концентрацията на ензима във фоликулярни течности, от които произлизат яйцеклетки с „лоша“ морфология (фиг. 8, д). Без да е статистически значимо ( $p=0,336$ ) това наблюдение се прехвърля и при анализа на фактора в групите на „добрите“ и „лошите“ ембриони, където по-високи концентрации откриваме отново в групата на „лошите“ ембриони.

Вака S. и сътрудници (Вака S et al., 2005) намират по-високи нива на **MMP-9** при пациентки с поликистозни яйчници (**PCOS**), сравнени с нормално овулиращи

жени. Това дава основание на авторите да предположат, че жени с PCOS имат значително увеличена желатинолитична активност и по-интензивно ремоделиране на екстрацелуларния матрикс, дължащо се на развитието на множество фоликули и формирането на кисти.

От нашето проучване и изследванията на Lee D.M. (Lee D, 2005) и Вака S. (Вака S et al., 2005) може да се предположи, че MMP-9 играе ключова роля в овулацията и има отношение към определяне качеството на яйцеклетките и имплантирането на ембрионите. От противоречията в получените резултати при различните изследователски групи не може еднозначно да се заключи дали нивото на тази металопроотеиназа във ФТ е показателно за успешното постигане на бременност. При сравняване на данните трябва да се има предвид използването на различни методи за детекция и анализ на данните от различните групи. Лии използва денситометричен анализ на зимографии, Бака работи с конвенционална ELISA, а ние използваме флуоцитометричен мултиплексен кит. Само по себе си това понякога е достатъчна причина за получаване на разлики. Зимографията е полуколичествен метод и отчита активност на ензима, а тя не винаги е съпоставима с молекулната концентрация на протеина.

Може да се предположи, че е необходимо нивата на MMP-9 във ФТ да бъдат в определени граници, под или над които факторът да компроментира изхода от ин-витро процедурата. И все пак нашите резултати ни дават основание да използваме нивата, отчетени във ФТ като предиктивен белег за развитието на женските гамети и най-важно за определяне на изхода от ембриотрансфера.

Друг протеин, присъстващ във ФТ, за който се установява връзка с имплантационния потенциал на ембриона е **лактоферина**

Тамура и колеги (Tamura T, 2005) предполагат, че лактоферинът подтиска експресията на гамааминомаслена киселина в рецептор 2 и модулира нивата на вътреклетъчния cAMP, а зрението на ооцита се повлиява от нивата на cAMP. Вероятно контролът на cAMP чрез лактоферин оказва влияние върху процесите на зреене на ооцита.

Можем да кажем, че откриваме значима връзка на лактоферина само с положителния тест за бременност – по-високите нива се свързват с неуспешна имплантация и обратно. Данните предполагат използването му като маркер за отдиференциране на функционален ембрион, с по-добри шансове за имплантация. След статистическа обработка на данните се установи връзка между концентрацията на LF във ФТ и имплантацията на ембрионите ( $p=0,015$ ). От табл. 5 и фиг. 8 се вижда, че концентрацията е по-ниска в групата, с положителен тест за биохимична бременност (+hCG - 400,9 pg/ml) и по-висока при тези, с отрицателен тест (-hCG - 528,4 pg/ml). За останалите изследвани параметри не се установяват статистически достоверни различия.

Относно имплантацията **ТВІІ** и **ДВІІ** показват статистическа достоверност (ТВІІ  $p=0,002$ ; ДВІІ  $p=0,015$ ). И при тоталния и при директния билирубин, по-високи средни стойности получаваме за 2 група (2,86  $\mu\text{mol/L}$  и 3,4  $\mu\text{mol/L}$  съответно), в сравнение със стойностите за група 1 (1,44  $\mu\text{mol/L}$  и 2,4  $\mu\text{mol/L}$  съответно).

Като цяло и общият и директният билирубин са повишени в групата на жените под 34 г., с яйцеклетки с добро качество (важи само за ТВІІ), с нормално оплождане (важи само за ТВІІ), морфологично добри ембриони, положителен тест за бременност, което ги прави добри кандидати за позитивни предиктивни маркери.

## **6. Взаимовръзка между изследваните показатели**

При изследването на взаимовръзките между изследваните показатели са отчетени сравнително голям брой силни корелации между показателите, които принадлежат към една и съща група (табл. 6). Тази особеност е най-силно проявена при групата на биохимичните и цитологични показатели.

Биохимичните показатели натрий ( $\text{Na}^+$ ), общ белтък (TP) и калций ( $\text{Ca}^{2+}$ ) се характеризират с най-голям брой корелационни зависимости, в сравнение с останалите изследвани показатели. Цитологичните показатели, които засягат броя на

гранулоцитите, левкоцитите и лимфоцитите са силно свързани както помежду си, така и с някои от останалите изследвани параметри.

В групата на белтъците, пептидите и растежните фактори са установени много малък брой силни корелации. Те засягат взаимовръзки на протеините трансферин, IGFBP3 и ендотелин с цитологичните показатели, описващи клетъчните субпопулации на периферните CD56+CD16+ bright/dim NK-лимфоцити и естествените клетки убийци (NKT-cells). Калцитонинът прояви взаимовръзка с броя на Т-клетките.

Цитокините проявяват най-малък брой силни взаимовръзки, както между самите тях, така и с другите групи изследвани показатели. Единствено Il-1a и Rantes се отличават със сравнително висок корелационен коефициент, спрямо CD56+CD16+ NK лимфоцитите.

Определен дял от показателите ((1) Sg%, N Sg, Ab N Sg; (2) Lif, Gly, Lif/Gly; Ly, (3) N Ly, Ab N Ly; (4) Mo, Ab N Mo; (5) 16+56+, 16+56+ bright, 16+56+ dim) са зависими, тъй като се определят напълно или частично от изменението на един и същ фактор на средата. Така например някои показатели представляват съотношения, в които е включен някой от останалите показатели. Тази тяхна особеност определя наличието на силна корелационна връзка между тях. Това обуславя и възможността в прогностичния модел да бъде включен само един показател от посочените корелационни двойки.

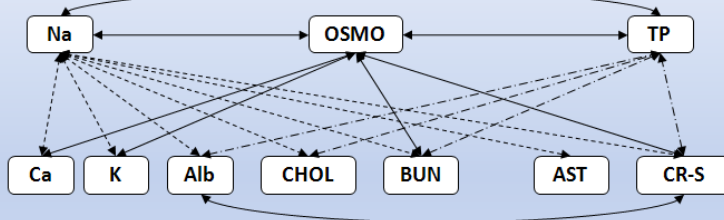
Табл.6 Двойки показатели, със силна взаимовръзка / високи корелационни коефициенти (  $R > 0.5$ ;  $P < 0.05$  )

| <b>(1) Биохимични показатели</b>  |   |  |   |  |   |
|---|---|--|---|--|---|
| Na – K (0.665)<br>Na – Ca (0.697)<br>Na – Alb (0.618)<br>Na-TP (0.658)<br>Na-AST (0.586)<br>Na-CHOL (0.527)<br>Na-BUN (0.557)<br>Na- CR-S (0.608)<br>Na- OSMO (0.969) | K – OSMO (0.586)  | Ca – Alb (0.620)<br>Ca – TP (0.650)<br><br>Ca-OSMO (0.802) | TP – Alb (0.889)<br><br>TP – CHOL (0.608)<br>TP – BUN (0.537)<br>TP – CR-S (0.554)<br>TP – OSMO (0.700) | BUN – OSMO (0.568)   | CR-S-OSMO (0.609)   |
| Alb - CR-S (0.534)  | CR-S-BUN/CREA (-0.602)  | GGT – T cell (0.517)                                       | DBIL - 56+16-br (-0.569)  | A/G - обем FF/ml (0.592)   |   |
| <b>(2) Белтъци, пептиди и растежни фактори</b>  |   |  |   |  |   |
| Gly-LIF/Gly (-0.727)  |   | Calcitonin – T cells (0.583)                               | Transferrin-56+16 br (-0.602)<br>Transferrin -56+16-dim (-0.561)  | Endothelin 2 – NKT cells (0.642)                                     | IGFBP 3 – 56+16-br (-0.522)   |
| <b>(3) Цитокини</b>   |   |  |   |  |   |
|   |   |  |   | 16+56+ - Rantes (+) (0.601)  |   |
|   |   | HGF (+)-IL12 (-0.507)                                      | IL-1a-16+56+(-0.508)  |  |   |
| <b>(4) Цитологични показатели</b>   |   |  |   |  |   |
|   | N Sg - Ab N Sg (0.959)<br>N Sg – N Ly (0.649)<br>N Sg – ab N Ly (0.716) | Sg – Ly (-0.909)   | Ab N Sg – N Ly (0.638)<br>Ab N Sg– ab N Ly (0.752)  | PLT - Ab N Sg (0.493)<br>PLT – N Ly (0.609)<br>PLT – ab N Ly (0.590) | Leu – N Sg (0.910) Leu – Ab N Sg (0.857)<br>Leu – N Ly (0.870)<br>Leu – ab N Ly (0.887) |
| N Ly – ab N Ly (0.940)<br>N Ly – N (0.575)  | ab N Ly – N (0.536)<br>ab N Ly – ab.N Mo (0.500)                        | Mo – N (0.599)<br><br>Mo – ab.N Mo (0.974)                 | NKT-cells– ab.N Mo (-0.542)   |  |   |
|   | FF/ml – 16+56+ (-0.562)<br>FF/ml – 56+16-br (-0.720)                    | T-cells – 56+16-br (-0.791)<br>T-cells – NK (-0.503)       | NK cells – 16+56+ (0.712)<br>NK cells – 56+16-br (0.583)<br>NK cells – 56+16-dim (0.784)                | 16+56+ - 56+16-br (0.757)<br>16+56+ - 56+16-dim (0.616)              |   |

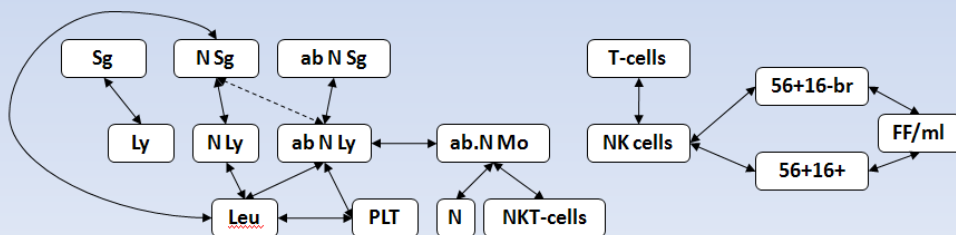


## Изследване на взаимовръзките между прогностичните показатели

### Биохимични показатели



### Цитологични показатели



Фиг.10 Установени значими взаимовръзки между изследваните биохимични и цитологични групи показатели.

## 7. Прогностична сила и подбор на показатели.

При избора на прогностични показатели е отчетена дискредитивна им сила за разграничаване на различни състояния на ART и други параметри - възраст, резултат от оплождане, качество на яйцеклетките, качество на ембрионите, стойности на естрадиола и резултат от биохимичния тест за бременност (табл. 65). Трябва да се вземе под внимание фактът, че факторите „възраст” и „естрадиол” имат добре известна прогностична сила за резултата от биохимичния тест за бременност (562). За да бъде анализиран ефектът на възрастта и нивата на естрадиол върху изследваните потенциални прогностични показатели, пациентите са разделени на две

равни групи, в зависимост от възрастта си. При провеждането на дескриптивен статистически анализ е установено, че 34-годишната възраст на пациентите е медиана на цялата изследвана извадка и поради тази причина тя е избрана за разделяне на пациентите на равни части. По аналогичен начин са формирани две групи за анализ и в зависимост от нивото на естрадиола, с установена медиана 185.

За да могат да бъдат оценени достатъчно голям брой прогностични показатели, които да бъдат потенциално включени в разработения прогностичен модел, нивото на достоверност на проведените тестове за различия е либерално ( $P < 0.1$ ).

Останалите изследвани фактори – качество на яйцеклетките и ембрионите, както и резултатът от оплождането, определят изборително продължаване на процесите на оплождане, трансфериране и имплантиране с яйцеклетки, ооцити и ембриони с конкретно качество. По този начин част от изследваните 4 групи от показатели, които проявяват различия в зависимост от упоменатите фактори, биха могли да отразят тяхното влияние при прогнозирането на крайния резултат от оплождането.

Приблизително еднакъв брой от изследваните показатели показват статистически значими различия при яйцеклетките и ембрионите с различно качество. Групата от показатели, които имат достоверни различия в зависимост от резултата от биохимичния тест за бременност включва такива, които се различават, в зависимост от възрастта на пациентите (DBIL и MIP1b), качеството на яйцеклетките (MMP, IL4, MIG) и качеството на ембрионите (TBIL). В гореспоменатата група се включват и показатели, които не се различават съществено в зависимост от всички изследвани фактори, с изключение именно на биохимичния тест за бременност (табл. 65). Такива са биохимичните показатели K, TP, а също и гликопротеина лактоферин и хемокина CCL2. В резултат на тази особеност евентуалното включване в прогностичния модел на показатели от последната група би избегнало съпътстващото влияние на споменатите фактори възраст, качество на яйцеклетките и ембрионите.

Стъпковият регресионен анализ (Backward Elimination) е проведен поотделно за отделните 4-те групи от показатели, с цел да се запази мощността на теста и желаното съотношение между броя на проведените изследвания и броя на проверените прогностични показатели. Отношението е по-голямо от 10:1 ( $EPV > 10$ ). Първоначално всяка една от 4-те групи биологични параметри са анализирани поотделно. Впоследствие е извършен стъпков регресионен анализ и на подобраните от първите тестове показатели (табл. 7).

Табл. 7 Показатели, подобрани с провеждането на стъпков регресионен анализ – Backward Elimination

| Етапи от стъпковото елиминиране на прогностични показатели |   |             |   |            |  |
|--|---|-------------|---|------------|--|
| Исходна група от показатели                                | Разширена група прогностични показатели |             | Съкратена група прогностични показатели |            | Група с минимален брой прогностични показатели |
|  |   |             |   |            |  |
| (1) Биохимични показатели (25 бр.)                         | TP<br>TBIL<br>CHOL<br>BUN               | TP          | TP                                      | TP         | TP   |
| (2) Белтъци, пептиди и растежни фактори (15 бр.)           | лактоферин                              | лактоферин  | лактоферин                              | лактоферин |  |
| (3) Цитокини (16 бр.)                                      | MIG<br>CCL2<br>IL8                      | CCL2<br>IL8 | CCL2<br>IL8                             | IL8        |  |
| (4) Цитологични показатели (19 бр.)                        | PLT                                     | PLT         |   |            |  |

По този начин са получени комбинации с различен брой прогностични показатели. Чрез последователен анализ на точността на всеки модел, включващ определен брой показатели са подобрани уравненията, които позволяват прогнозирането на резултата от биохимичния тест за бременност.

След симулирането на различни комбинации от показатели, които да бъдат включени в регресионните уравнения, показателят „брой на тромбоцитите” (PLT), който е единствен представител на групата от цитологични показатели отпадна, тъй

като неговото участие довежда до влошаване на точността на модела. Установява се, че при оптималния вариант могат да бъдат включени показатели от първите 3 групи, а именно TP от групата на биохимичните показатели, лактоферин от групата на белтъците, пептидите и растежните фактори и хемокините CCL2 и IL8, принадлежащи към групата на цитокините.

Хемокинът CCL2 играе ключова роля в процесите на миграция на левкоцитите (563). Големи популации от клетки на имунната система се акумулират в ендометриума по време на лутеалната фаза като се смята, че те изпълняват ролята на важни модулатори на процесите на имплантация на ембриона. Установена е взаимовръзка между отделните етапи на имплантиране и етапи на миграция на левкоцитите. Доказано е, че CCL2 е мощен атрактант и активатор за утеринните клетки (uNK) убийци. Големият им брой от своя страна е свързан с процеси на безплодие и неуспешна бременност (564). Това дава обяснение на отчетените пониски нива на секреция на CCL2 при случаите с успешна имплантация и положителен тест за бременност, които са установени и при други проучвания. В резултат на описаните характеристики на MCP-1, той е включван при разработката на други прогностични модели за предсказване на успешна имплантация и бременност (565).

Известно е, че двата хемокина CCL2 и IL8 имат сходна локализация при човешкия ендометриум в жлезистия и луменен епител, както и в ендотелните клетки. Човешкият бластоцист не произвежда големи количества от тези хемокини. От друга страна той регулира положително синтеза на IL-8 в споменатите тъкани, но не и неговата секреция. За разлика от него, експресията на CCL2 не се регулира от бластоциста. Двата хемокина се регулират положително и от хормона прогестерон (566).

Хемокинът IL8 стимулира клетъчния растеж на ендометриалната строма и действа като автокринен растежен фактор. Нивата му корелират с отделянето на колагеназите, което е критичен етап в ремоделирането на извънклетъчния матрикс на маточната шийка (567). Различни проучвания потвърждават повишаване на

концентрацията на IL-8 във фоликулярната течност в пред-овулационния период, което е сигнал и за протичане на възпалителна реакция (568). Това дава обяснение и на отчетените по-високи стойности при случаите с положителен тест на бременност.

Общото съдържание на белтъци (TP) изразява сумарния ефект на влияние на всички протеини, които са локализиращи във фоликулярната течност и имат пряк или непряк ефект върху успеваемостта на проведената IVF процедура. Различни проучвания доказват прогностичната сила на отделни групи протеини. Такива са ендометриалния протеин PP14 (569) и обща концентрация на ренин (TSP) (570).

## **8. Логистични регресионни модели / уравнения с подобрени показатели /**

### **8.1 Разработване на прогностичен модел**

След като е отчетена степента на припокриване на извадките за всеки показател и общите „точки“ е установено, че е необходимо разделянето на показателите при провеждането на логистичния регресионен анализ на 2 групи. По този начин са използвани максимално ефективно резултатите от всички проведени изследвания. Четирите подобрени прогностични показателя са включени при съставянето на следните две регресионни уравнения:

#### **(1) Логистичен регресионен модел – с показател TP**

$$\text{Logit P} = -5.285 + (0.113 * TP)$$

#### **(2) Логистичен регресионен модел – с показатели лактоферин, CCL2 и IL8**

$$\text{Logit P} = 1.925 - (0.00606 * CCL2) - (0.00618 * \text{Лактоферин}) + (0.00528 * IL8)$$

### **8.2. Оценка на ефективността на разработения модел**

Като прогностичен показател с най-добра предиктивна сила се отличава общото съдържание на белтък (TP). Поради наличието на сравнително малък брой

общии „точки” с останалите подбрани показатели, неговото използване в модела е ограничено само до самостоятелно проведен логистичен регресионен анализ и съответно до уравнение, което включва само този показател. Изчислените точност на оценяване и връщане (precision & recall) бяха 76.92% (табл. 8).

Табл. 8 Точност на модел (1), който включва прогностичния показател TP

|   |              |
|---|--------------|
| <b>Модел с 1 прогностичен показател - TP.</b>           |              |
| <b>Праг на вероятността за положителна класификация</b> | <b>0.500</b> |
| Точност на оценяване на положителен резултат            | 76.92%       |
| Точност на връщане на положителен резултат              | 76.92%       |
| Точност на оценяване на отрицателен резултат            | 76.92%       |
| Точност на връщане на отрицателен резултат              | 76.92%       |

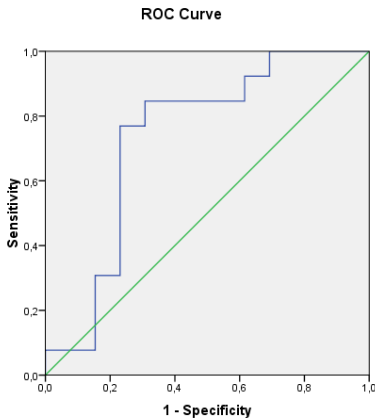
За разлика от предходния модел при втория регресионен модел, който включва гликопротеина лактоферин и хемокините CCL2 и IL8 точността на връщане на положителен резултат е по-ниска, докато другите видове точност на модела са по-добри (табл. 9).

Табл. 9 Точност на модел (2), който включва прогностичните показатели лактоферин, CCL2 и IL8.

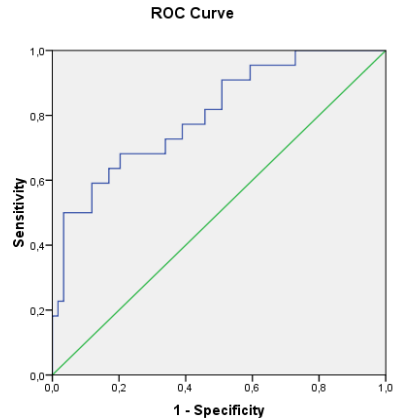
|  |              |
|--|--------------|
| <b>Модел с 3 прогностични показателя – CCL2, лактоферин и IL8.</b> |              |
| <b>Праг на вероятността за положителна класификация</b>            | <b>0.500</b> |
| Точност на оценяване на положителен резултат                       | 84.62%       |
| Точност на връщане на положителен резултат                         | 50.00%       |
| Точност на оценяване на отрицателен резултат                       | 83.82%       |
| Точност на връщане на отрицателен резултат                         | 96.61%       |

### 8.3. Дискриминация на прогностичния модел

След изготвянето на ROC (Receiver Operating Characteristic) криви (фиг. 11) е установено, че и при двата модела AUC (площта под кривата) има стойност по-голяма от 0,5. При втория модел, който включва по-голям брой прогностични показатели, AUC е по-голяма, което определя и по-високата степен на дискриминация (табл. 10). От анализа на ROC кривите, както и от подробно сравняване на таблиците с чувствителността и специфичността на моделите е установено, че най-подходящи за разделяне се явяват прагове (thresholds)  $\approx 0.500$ . Именно при тези прагове получената точност на оценяване е най-висока, което е и определящо при избора на конкретен праг на получените вероятности (P) от логистичното регресионно уравнение.



(1) модел (вкл. TP)



(2) модел (вкл. лактоферин, CCL2 и IL8)

Фиг. 11 ROC криви на изследваните регресионни модели

Табл. 10 Резултати за AUC при изследваните два регресионни модела

| <b>(1) модел (включва TP)</b>                     |                                |  |                                     |               |
|---|--------------------------------|--|-------------------------------------|---------------|
| <b>Площ под кривата (AUC)</b>                     |                                |  |                                     |               |
| AUC   | Стандартна грешка <sup>a</sup> | Значимост на асимптотата. <sup>b</sup> | Асимптотен 95% доверителен интервал |               |
|   |                                |  | Долна граница                       | Горна граница |
| <b>0,734</b>                                      | 0,106                          | 0,043                                  | 0,526                               | 0,941         |
| a. При непараметрично допускане                   |                                |  |                                     |               |
| b. Нулева хипотеза: истинската площ = 0.5         |                                |  |                                     |               |
| <b>(2) модел (включва лактоферин, CCL2 и IL8)</b> |                                |  |                                     |               |
| <b>Площ под кривата (AUC)</b>                     |                                |  |                                     |               |
| AUC   | Стандартна грешка <sup>a</sup> | Значимост на асимптотата. <sup>b</sup> | Асимптотен 95% доверителен интервал |               |
|   |                                |  | Долна граница                       | Горна граница |
| <b>0,802</b>                                      | 0,055                          | 0,000                                  | 0,694                               | 0,910         |

#### 8.4. Вътрешно валидиране на прогностичния модел

При провеждането на процедурата на зареждане („bootstrapping”) и изчисляването на AUC за 100 случая е установено, че получените „оптимизъм” и при двата анализирани регресионни модела е със сравнително ниски стойности, което предполага минимален ефект на свръхрегулиране („overfitting”). След коригиране на ефективността на двата модела, в резултат на проведеното вътрешно валидиране, е установено запазване на тяхната дискриминативна сила (табл. 11).



Табл. 11 Оптимизъм и “Bootstrap”-коригирана ефективност на изследваните регресионни модели.

| Модел   | Оптимизъм (O) * | AUC app ** | Bootstrap- коригирана ефективност |
|---|-----------------|------------|-----------------------------------|
| <b>(1) модел (включва TP)</b>                     |                 |            |                                   |
|   | 0.028           | 0.734      | 0.706                             |
| <b>(2) модел (включва лактоферин, CCL2 и IL8)</b> |                 |            |                                   |
|   | 0.011           | 0.802      | 0.791                             |

\* Средна аритметична стойност

\*\* AUC app – AUC на оригиналния модел с оригиналната извадка

## 8.5. Комбиниране на 2-те регресионни уравнения в общ модел

Директното включване на прогностичните показатели от двата разгледани регресионни модела води до подобряване на точността на модела, в сравнение със самостоятелните 2 модела. Прилагането на този подход води до два сериозни недостатъка:

1) Не е изпълнено условието за съотношението на включените показатели към „точките” на изследване, което трябва да бъде  $> 10$ . Това определя появата на проблеми, които се изразяват в понижаване на достоверността на модела (ефект на свръхрегулиране “overfitting”). Пример в това отношение са получените високи стойности на коефициента на Кук. В 20% от използваните точки той е  $>1$  при изследването на логистичен регресионен модел, включващ и четирите прогностични показателя.

2) Самостоятелно разгледаните два регресионни модела имат значително по-голяма извадка (брой „точки”) и затова обединяването им, в комбинация с прилагането на подхода за „Complete case analysis”, води до съществено намаляване на размера на използваната при калкулациите извадка, което е нежелан ефект.

Поради гореописаните причини бе избран друг подход, при който да бъде използвана прогностичната стойност и на 4-те прогностични показателя. Бяха

изследвани грешките, при конкретните точки от извадката, които се наблюдават при 2-та самостоятелни регресионни модела. Първият регресионен модел (с 1 показател - TP) има по-висока точност на оценяване на положителния резултат, докато вторият модел (с 3 показателя) проявява по-висока точност при определяне на отрицателния резултат.

В крайния модел прогнозирането на положителен или отрицателен тест се определя от сумирането на резултатите от 2-та самостоятелни регресионни модела:

$$M_c = M_1 + M_2$$

, където

$M_1 = 0$  (При резултат от 1-ото регресионно уравнение  $\text{logit} < 0.500$ )

$M_1 = 1$  (При резултат от 1-ото регресионно уравнение  $\text{logit} > 0.500$ )

$M_2 = 0$  (При резултат от 2-ото регресионно уравнение  $\text{logit} < 0.500$ )

$M_2 = 1$  (При резултат от 2-ото регресионно уравнение  $\text{logit} > 0.500$ )

$M_c = 0$  (предположен отрицателен резултат),  $M_c > 0$  (предположен положителен резултат);

Точността на прогнозиране е изчислена по начин, аналогичен на този използван при анализа на регресионните уравнения. Комбинираният модел се характеризира с изключително висока точност на предсказване на отрицателния резултат и задоволително висока точност на прогнозиране на положителен резултат (табл. 12).

табл. 12 Точност на комбинирания модел

| <b>Комбиниран модел - <math>M_c</math></b>                               |        |
|--|--------|
| Точност на оценяване на положителен резултат                             | 79.17% |
| Точност на връщане (покриваемост) на положителен резултат                | 82.61% |
| Точност на оценяване на отрицателен резултат                             | 93.10% |
| Точност на връщане (покриваемост, възвращаемост) на отрицателен резултат | 91.53% |

Независимо от това, че описаният комбиниран модел има много добри прогностични характеристики, получените данни за разширения комплекс от показатели позволява постоянно усъвършенстване на модела в процеса на натрупване на нови данни, както и добавянето на някои други от упоменатите показатели (Табл. X2) след провеждането на външно валидиране.

## **V. ИЗВОДИ**

### **Възраст на пациентите**

1. По-младите пациенти (<34 години) се отличават с повишени нива на лептин, ТВІL и DBІL и понижени нива на МІP1 $\beta$ .

### **Морфология на яйцеклетките**

2. По-високите стойности за Ca<sup>2+</sup>, URIC, ALT, AST, лептин, както и повишените левкоцитни популации са показател за яйцеклетки с лоша морфология.
3. Яйцеклетките с добро качество корелират с повишени нива на ІL4 и МІС1 във фоликулярната течност.

### **Резултат от оплождането**

4. Концентрациите на ІL12, МІP1a, RANTES и GGT във фоликулярната течност предсказват най-точно резултата от оплождането.  
Нормално оплодените яйцеклетки (2N) се отличават с по-високи нива на ІL12, МІP1a, RANTES и по-ниски нива на GGT в сравнение с тези неуспешен изход от оплождането (0PN, 1/3PN, лизирани и незрели).

### **Морфология на ембрионите**

5. За ембрионите с добра морфологична оценка е характерно наличието на повишени концентрации на GGT, ТВІL, ІL12 във фоликулярната течност.
6. За ембрионите с лоша морфологична оценка е характерно повишаване на левкоцитните и лимфоцитните популации във фоликулярната течност.

### **Имплантационен потенциал на ембриона**

7. От всички изследвани показатели най-подходящи за оценка на имплантационния потенциал на ембриона са: DBIL, ТВIL, MIC, MIP1b, IL4, CCL2, MMP9 и Лактоферин.

### **Взаимовръзка между изследваните показатели**

8. Поради различната природа на изследваните показатели взаимовръзките между тях във всяка една от изследваните групи (белтъчни фактори (интерлевкини, хемокини, растежни фактори), биохимични и цитологични показатели) са много по-силно изразени в сравнение с тези между показатели от различните групи.

### **Прогностична сила и подбор на показатели**

9. С най-голяма прогностична сила се отличават биохимичният показател „общо съдържание на белтъци” (TP), гликопротеинът лактоферин и хемокините CCL2 и интерлевкин-8 (IL8). Комбинациите от тези четири показателя са най-подходящи за включване при разработването на прогностичен модел за предсказване на успешна бременност.

### **Разработен прогностичен модел**

10. Разработеният математически модел прогнозира възможностите за успешна бременност с висока точност на оценяване на положителен (79.17%) и отрицателен (93.10 %) резултат като запазва прогностичната си сила при проведената процедура на вътрешно валидиране.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Измерването на качеството на сперматозоидите, яйцеклетките и ембрионите в контекста на ин-витро технологиите бързо стана една от основните задачи на ембриолози, лекари и все повече специалисти от други области (химици, физици, математици и др). Основна причина за това са бързото развитие на методи за криосъхранение на гамети, необходимостта от намаляване на свръхпродукцията на яйцеклетки/ембриони, необходимостта от редуциране на многоплодните бременности (често следствие от ин витро процедурите и липсата на отговори на фундаментални въпроси, засягащи човешката репродукция. Нашият център не прави изключение в тази насока. Търсенето на неинвазивни подходи за селекция на гамети и за пресказване на репродуктивни събития, е основна част от работната програма на центъра.

До настоящия момент съществуват редица методи за селекция на яйцеклетки. Изследването на морфологията на яйцеклетките (зона пелуцида, делително вретено, полярни телца, клетъчни включения), по-често води до откриване на негативни, отколкото на позитивни маркери за качество. Подобна е ситуацията и при изследване на клетъчни компартменти в яйцеклетката, с помощта на поляризирана светлина и специализирани софтуери. Някои научни групи изследват генната експресия на гранулозните клетки или на самата яйцеклетка, търсейки специфични маркери за оценка на нейното качество. Други използват биопсия на полярни телца за скриниране на ооцита за генетични дефекти, възникнали по време на двете мейотични деления. Повечето от тези техники са сложни за изпълнение, изискват скъпо лабораторно оборудване и повече време за анализ и все още не са широко застъпени като рутинни методи за анализ в повечето IVF клиники. Използването на нови морфологични маркери като добавка към класическия морфологичен анализ на яйцеклетки и ембриони, за прогнозиране и оценка на качество или състояние, не постигат голям успех. Статистически достоверни се оказват връзките на тези параметри единствено с възрастта на пациентките и

използвания протокол за стимулация. Относителният неуспех в откриването на ясен морфологичен предиктор ни накара да надградим анализа с използването на фактори, секретирани в микрообкръжението на ооцита – фоликуларната течност.

Фоликуларната течност изглежда добър кандидат за анализ. Тя е много комплексна, специфична и изключително важна среда за развитие на яйцеклетките. Продукт е от една страна на избирателен трансфер на фактори от кръвния ток през кръвнофоликулната бариера, а от друга от секреторната активност от страна на текалните клетки, гранулозните клетки и ооцита. Това дава основание на специалистите да предположат наличието на биохимични фактори във фоликуларната течност, обграждаща ооцита, които играят критична роля за детерминиране качеството на ооцита, резултата от оплождането, качеството и развитието на ембриона и имплантационния му потенциал. Изследванията в тази насока разкриват голям набор от фактори - кандидати за определяне на ембриологичните параметри. За съжаление, повечето изследователи, както и ние, не успяват да открият добър/и молекулярни фактори, с които категорично да предскажат резултата от ин витро процедурата. Това е така, поради факта, че повечето анализи са предимно корелационни, правят се върху сравнително малки групи от пациенти, поставени са на неперспективна база и са слабо контролирани. Освен това, повечето от изследванията са базирани на едновариабилен анализ на връзката на специфични молекули с ембриологичните показатели, вместо да използват мултивариабилен алгоритъм. В настоящото изследване ние започнахме анализа на тази база – връзка на конкретен анализ с избраните ART параметри. Ние доразвихме този подход, използвайки го като основа за осъществяване на мултипараметричен анализ и изготвянето на математически модел, който да улесни селекцията на ембриони с най-голям имплантационен потенциал.

Процесите на фоликулогенезата, овогенезата и ранните етапи от ембрионално развитие се определят от множество фактори, които действат в концентрационен и времеви синхрон. Плейотропността е допълнителен фактор, който затруднява избора на „добри“ кандидати за предиктивност на тези процеси.

Анализът изведе няколко фактора, които биха могли да се използват самостоятелно или в комбинация в клиничната практика за предсказване на: качество на яйцеклетки ( $\text{Ca}^{2+}$ , URIC, ALT, лептин, IL4, MIC1), на изхода от оплождането (IL12, MIP1a, RANTES, GGT), на качеството на ембриона (GGT, TBIL, IL12, Leu, AbNSg, NSg/ml, Nly/ml, Nmo/ml, AbNMo) и изхода от ин витро процедурата – (TBIL, DBIL, MIP-1b, IL4, CCL 2, MMP9 и лактоферин). Използването на комбинация от фактори в контекста на математически модел (формула) би имал по-голяма прогностична сила, защото би съчетал, прогностичните стойности на няколко конкретни маркера.

Друга перспектива и възможности за предсказване на ART-параметрите е съчетаването на морфологичния анализ с концентрационния анализ на фактори и метаболити, определящи функционалния статус на ооцита. Това съчетаване е необходимо поради факта, че сам по себе си морфологичният анализ не дава достатъчно информация за изследваните параметри. Често, морфологично добре изглеждащи яйцеклетки/ембриони, не достигат до имплантиране.

Настоящата работа ни помогна да поставим началото на целенасочена дейност по създаването на неинвазивен алгоритъм за репродуктивен анализ. Надеждите ни са, че съчетаването на морфологични маркери с цитокинов анализ, изграждането на метаболитен профил и транскриптомен анализ на гранулозните клетки, би довело до създаване на модел за предсказване на ембриологичните параметри и до свеждане на избора за яйцеклетка/ембрион до „най-добрите“.



## **VII. ПРИНОСИ**

### **НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ**

Проведеното изследване дава възможност за първи път у нас да се създаде алгоритъм за оценка на овогенезата и за прогнозиране на резултата от *in vitro* процедурата.

Създаденият модел дава възможност специфични разтворими фактори, биохимични показатели, метаболити и клетъчни типове намиращи се във фоликулната течност да се свържат с важни биологични показатели като възраст, хормонален статус, качество на яйцеклетките, резултат от оплождане, качество на ембрионите и имплантационен потенциал.

Богатият набор изследвани показатели и анализа на връзките между тях дават възможност за изграждането на хипотези и подробни картини на важни репродуктивни процеси с фундаментален характер.

Изграденият теоретичен модел може да се развие и приложи за окачествяване на ембриони при стимулирани цикли (къс и дълъг протокол) а също и при изследване на друга важна страна от имплантационния процес при човека – ендометриалната рецептивност.

### **НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИ**

Анализът на получените резултати извежда няколко фактора, които биха могли да се използват самостоятелно или в комбинация в клиничната практика за предсказване на: качество на яйцеклетки ( $Ca^{2+}$ , URIC, ALT, лептин, IL4, MIC1), на изхода от оплождането (IL12, MIP1a, RANTES, GGT), на качеството на ембриона (GGT, TBIL, IL12, Leu, AbNSg, NSg/ml, Nly/ml, Nmo/ml, AbNMo) и изхода от *in vitro* процедурата – (TBIL, DBIL, MIP-1b, IL4, CCL 2, MMP9 и лактоферин).

Разработеният от екипа математически модел прогнозира възможностите за успешна бременност с висока точност на оценяване на положителен (79.17%) и отрицателен (93.10 %) резултат като запазва прогностичната си сила при проведената процедура на вътрешно валидиране. Това дава възможност за по-прецизен и адекватен метод за оценка и избор на ембрион с висок имплантационен потенциал

## VIII. ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Публикации

1. Балтаджиева Д., Пенкова К., **Стаменов Г.**, Димитрова Д., Михайлова А., Наумова Е. Експресия на активиращи и инхибиращи рецептори върху НК клетки от периферна кръв при жени с репродуктивни неуспехи. Акушерство и Гинекология 4/2010 том 49, стр.12-17
2. **Stamenov G.**, Parvanov D., Chaushev T., Baltadzhieva D., Iliev I., Dzhambazov B. Approaches for prediction of the implantation potential of human embryos  
Journal of BioScience and Biotechnology 2013 vol.2, book 2.,79-78
3. **Stamenov G.**, Penkova K., Chaushev T., Persenska S., Dzhambazov B., Iliev I. and Baltadzhieva, D.  
Endometrial NK cell subpopulations CD16-CD56 bright CD16-CD56dim in women with recurrent implantation failure  
Biotechnology&Biotechnological Equipment (под печат)

### Постери

1. Пенкова К., **Стаменов Г.**, Персенска С., Ангелова П., Балтаджиева Д., Утеринни НК клетки при жени с повтарящи се in vitro фертилизационни неуспехи. X Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия 23-26.04.2009, Несебър
2. Baltadzhieva, D., Penkova K., **Stamenov G.**, Persenska S., Angelova P., Ivanova S.

CD16-CD56bright And CD16-CD56dim uterine NK cells subpopulations in women with recurrent implantation failure

65<sup>th</sup> Annual Meeting of the ASRM, 17-21.10.2009, Atlanta, USA

3. **Stamenov, G.S.**; Chaushev, T.A.; Penkova, K.L.; Persenska, S.K.; Rangelov, I.I.; Baltadzhieva, D.N.

Intracavitar uterine prednisolone application – a possible treatment in recurrent implantation failure (RIF)

13<sup>th</sup> WORLD CONGRESS ON CONTROVERSIES IN OBSTETRICS, GYNECOLOGY & INFERTILITY (COGI) 4-7.11.2010 Berlin, Germany

### *Изнесени доклади*

1. И. Сигридов, С. Персенска, М. Шефкетова, М. Михова, К. Пенкова, Т. Чаушев, Г. **Стаменов**, Д. Балтаджиева

Приложения на G-CSF при жени с повтарящи се репродуктивни неуспехи

XII Национален конгрес по стерилитет, контрацепция, хормонозаместителна терапия и гинекологична ендоскопия 17-20.03.2011, Боровец

2. **Stamenov G.**, Sigridov I., Persenska S., Shefketova M., Mihova M., Penkova A., Baltadjieva D.

Intracavitar uterine granulocyte-colony-stimulatory factor (G-CSF) application – a possible treatment in recurrent implantation failure

67<sup>th</sup> Annual Meeting of the ASRM, 15-19.10.2011, Orlando, USA

## **Благодарности**

Изказвам дълбока благодарност на екипа на клиника „Надежда“  
и специално на Тодор Чаушев.