

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

Факултет „Здравни грижи”

Катедра по Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология

Д-р Виолета Рилчева Славчева

**Проучване влиянието на ДНК-фрагментационния индекс
на сперматозоидите върху изхода на процедурите по
асистирана репродукция**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен
„доктор” по научната специалност „Имунология” (01.06.23)

Научен ръководител:

доц. д-р Емилияна Конова, д.м.

Официални рецензенти:

проф. Искра Петрова Алтънкова, д.м.н.

проф. Димитрина Димитрова-Диканарова, д.м.н.

доц. Мария Стаменова, д.б.

Плевен, 2015 год.

Дисертационният труд съдържа 177 страници и е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати от собствени проучвания, Изводи и Приноси. Илюстриран е с 38 таблици и 23 фигури. Библиографската справка включва 408 източника на латиница.

Включените в дисертационния труд изследвания са извършени във:

Медицински център „Клиничен институт по репродуктивна медицина” - Плевен

Секция Имунология на катедра по Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология, Медицински университет - Плевен

Институт по биология и имунология на размножаването, БАН - София

Работата по дисертационния труд е финансирана частично от научно-изследователски проекти на Медицински университет - Плевен:

Проект №29/2012 год.: Разработване на нов метод за подбор на човешки сперматозоиди, свързващи Annexin V чрез флоуцитометрично изследване.

Проект No3/2013 год.: Проучване на влиянието на оксидантния стрес върху свежа и размразена проба еякулат при фертилни и инфертилни мъже чрез изследване на общ антиоксидантен капацитет.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра по Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология, Медицински университет – Плевен, проведен на 29.06.2015 год.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от

в зала на Медицински университет – Плевен.

Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на Медицински университет – Плевен (<http://www.mu-pleven.bg>)

Съдържание

I. Въведение	4
II. Цел и задачи	5
III. Материали и методи	7
IV. Резултати	31
V. Изводи	48
VI. Приноси	49
VII. Списък на научните публикации, свързани с дисертационния труд	50

Въведение

Мъжкият фактор е сред най-често срещаните причини за стерилитет, като се приема, че дефекти на сперматозоидите водят от 30% до 50% от клиничните случаи на безплодие. Отклоненията в спермалните параметри, включващи намалена концентрация на сперматозоидите, намалена подвижност и отклонения в спермалната морфологията, водят до намалена вероятност за забременяване по естествен път. Преди 1992 г., тежките отклонения на спермалните параметри не са напълно преодоляни от съвременните асистирани репродуктивни техники (АРТ) за лечение на безплодие, като интраутеринна инсеминация (IUI) и конвенционалната процедура по ин витро оплождане (IVF). Появата на интрацитоплазменото инжектиране на сперматозоиди (ICSI) през 1992 г. е революция в лечението на мъжкия стерилитет, позволяващо мъже само с единични живи сперматозоиди, независимо от другите параметри, да се превърнат в кандидати за лечение на стерилитета. Въпреки това, в много клиники, използвайки ICSI, успеваемостта на процедурите е под очакваната, появяват се и първите съобщения за висока успеваемост на процедури с хирургично екстрахирани сперматозоиди, както и за липса на корелация между параметрите на конвенционалния семенен анализ и успеха на ICSI процедурите. Неуспешните ICSI цикли се превръщат в източник на научен дебат за специалистите по стерилитет.

В клиничната практика, етиологията на неуспешните ICSI цикли се свързва най-често с възрастта на партньорката, независимо от спермалните параметри. Поради това, на много двойки с неуспешно завършила АРТ процедура се предлага донорство на яйцеклетки. Това решение често се основава на предположението, че инжектирането на сперматозоид в цитоплазмата на яйцеклетката осигурява необходимия принос на бащиния геном и пренебрегва възможността при изкуственото оплождане, по-специално ICSI, да възникне оплождане със сперматозоиди, които съдържат скрити ДНК аномалии. Този потенциален риск се очертава, когато се установява, че значителна част от безплодните мъже имат повишени нива на увреждане на спермалната ДНК. Освен това, данни от проучване със *single cells* гел електрофореза (Comet анализ) показва, че "селекцията на сперматозоиди за ICSI по отношение на ДНК увреда е случайна". Развитието на абнормни ембриони и бластоцисти е свързано с влошени спермални параметри. Оценка на спермалната ДНК фрагментация (DFI), чрез анализ на структурата на спермалния хроматин (SCSA), показва зависимост при бременност по естествен път и чрез АРТ. Пилотни проучвания показват, че високите нива на ДНК фрагментация (DFI>27%) намаляват фертилитета при пациенти, извършващи АРТ, дори и при

мъже с напълно нормални стандартни спермални параметри. Следователно, липсата на корелация между конвенционалните параметри на семенната течност и ДНК фрагментация, определя ДНК фрагментацията като потенциален източник на безплодие при нормозооспермични мъже и изисква допълнителна оценка на спермалната ДНК фрагментация при изследване на мъжки стерилитет.

При определяне диагностичната и прогностична роля на ДНК фрагментационния анализ, трябва да се изтъкне, че изследването има роля за оценка вероятността за настъпване на оплождане, качеството на ембрионите, имплантацията и развитието на бременността при пациенти, извършващи АРТ процедура.

Съществуват редица доказателства в подкрепа на въздействието на ДНК фрагментацията на сперматозоидите върху предимплантационното и постимплантационното ембрионално развитие. Липсата на публикувани, статистически валидирани, клинични проучвания на стерилитета при големи групи АРТ пациенти, прави клиничното приложение на тези данни изключително трудно. Това налага детайлно изучаване на корелацията между фрагментацията на спермалната ДНК (чрез изследване структурата на спермалния хроматин) и оплождането, ембрионалното развитие, процента имплантации и бременност след конвенционалната IVF, IVF с ICSI, IUI и бременност по естествен път.

II. Цел и задачи

Цел: Проучване върху фрагментацията на спермална ДНК и нейното влияние върху изхода на процедурите по асистирана репродукция с цел подобряване на диагностичния подход и терапевтичното поведение при мъже, участващи в АРТ.

Във връзка с така формулирана цел, си поставихме следните основни задачи:

Задачи:

1. Определяне на референтни стойности за българската популация на спермална концентрация, подвижност, морфология и тератозооспермален индекс, спрямо нормите на СЗО, 5-то издание.
2. Определяне на референтна стойност на ДНК–фрагментационен индекс за българската популация за постигане на бременност по естествен път.
3. Определяне на корелацията на ДНК-фрагментационния индекс със стандартните параметри на спермален анализ, спрямо нормите на СЗО, 5-то издание.

4. Определяне на предсказващата стойност на ДНК-фрагментационния индекс по отношение изхода на процедурите по асистирана репродукция:
 - 4.1 По отношение на IUI
 - 4.2 По отношение на ICSI процедури (автоложни/с донорски яйцеклетки)
5. Определяне на предсказващата стойност на ДНК-фрагментационния индекс по отношение изхода на бременността след АРТ процедури
6. Проучване върху факторите, които влияят върху ДНК-фрагментацията на сперматозоиди:
 - 6.1 Ранна апоптоза
 - 6.2 Оксидативен стрес
 - 6.3 Урогенитални инфекции
 - 6.4 Криоконсервация

III. Материали и методи

III.1. Клиничен материал

Пациентите и здравите контроли, включени в проучването, са пациенти и доброволци, посещаващи клиника по репродуктивна медицина – Медицински център „Клиничен институт по репродуктивна медицина” – Плевен, в периода 2010 – 2015 год. За целта на проучването, бяха изследвани следните клинични групи пациенти и здрави контроли:

Група 1 (контролна група): 100 мъже, на възраст между 18 и 40 години, в чиито двойки има регистрирано раждане на дете до 1 година назад, спрямо датата на семенния анализ, или чиито партньорки са бременни към момента на семенния анализ със срок на бременността над 20 гестационна седмица. Проучването е ретроспективно, трансверзално.

При тази група пациенти са изследвани спермална концентрация, подвижност, морфология, тератозооспермален индекс, с цел определяне референтни стойности на изследваните параметри за българска популация, спрямо нормите на СЗО, 5-то издание, както и ДНК–фрагментационен индекс на сперматозоидите.

Група 2 (първичен стерилитет): 30 пациенти със стерилитет, провеждали непротектирани полови контакти повече от 12 месеца, без регистрирана бременност в двойката. В тази група пациенти, мъжете с нормозооспермия по отношение на концентрация на сперматозоидите са 24, а 6 са с лекостепенна олигозооспермия (10-15 000 000/мл). Проучването е трансверзално, като са получени данни от еднократен анализ на семенни проби, изследвани като свежи и замразени, след размразяването и след едночасов престой.

Семенната проба е отдадена чрез еякулация, след 3 до 5 дни полово въздържание, в стерилни, апиrogenни, цитонетоксични контейнери. Пробите са поставени в термостат, на 37°C, веднага след отдаването, с цел втечняване до 30-60 минути, обработени са по метода двойно-плътностен градиент, криоконсервирани са и след това са размразени.

Група 3 (ART група): 165 мъже от двойки, пациенти на клиниката, при които е извършена ICSI/IVF процедура. Подбора на мъжете включва пациенти без данни за инфекция в еякулата (банална флора, уреоплазма уреалитикум, микоплазма хоминис, микоплазма гениталиум) и без наличие на антитела срещу хламидия трахоматис в серума.

Подбора на пациентките от двойките в групата, включва жени със следните характеристики:

- съхранен яйчников резерв: възраст под 40 години, FSH на 3 ден от месечния цикъл <12.5 U/l;
- липса на рискови фактори за спонтанни аборти (изключено носителство на генни мутации, асоциирани с тромбофилия: фактор V Leiden, мутация G20210A в протромбиновия ген, генетичен вариант C677T в гена на метилентетраhydrofolат редуkтаза (MTHFR), генетичен вариант в гена на плазминоген активатор инхибитор 1 (PAI-1, носителство на генотип 4G/4G); периферни CD3-CD56+CD16+ NK лимфоцити в референтни стойности)
- без данни за цервикална инфекция с урогенитални микоплазми (уреоплазма уреалитикум, микоплазма хоминис, микоплазма гениталиум), без наличие на антитела срещу хламидия трахоматис в серума.
- При жените е извършена контролирана овариална хиперстимулация с GnRH-agonist, FSH-аналог по Long-down regulation протоколи, като са изключени двойки, използващи донорски яйцеклетки.

Данните в групата са обработени в ретроспективно, напречно проучване, като причините за стерилитет, довели до IVF процедура са разпределени както следва: мъжки фактор n=47; тубарен стерилитет n=77; неизяснен стерилитет n=25; LUF синдром n=16.

За cut-off стойност на ДНК-фрагментационен тест е използван праг от 30%.

Група 4 (ICSI): 282 мъже от двойки, извършили ICSI процедура в клиниката. Семенната проба е отдадена чрез еякулация, след 3 до 5 дни полово въздържание, в стерилни, апиrogenни, цитонетоксични контейнери. Пробите са поставени в термостат, на 37°C, веднага след отдаването, с цел втечняване до 30-60 минути. Извършен е семенен анализ в деня на отдаване на пробата за извършване на ICSI,

съгласно стандартите на СЗО, 10-та редакция (2010 год.). Изследването на спермалния хроматин е извършено чрез ДНК фрагментационен тест, като резултатите са изразени чрез DFI и HDS индекс. Резултатите от ISCI процедурите са отразени като положителен тест за бременност (HCG>5 mUI/l), отрицателен тест за бременност, биохимична бременност, мисед аборт, спонтанен аборт и клинична бременност.

Проучването е проспективно, като двойките са проследявани на 14-я ден след ембриотрансфера (ЕТ), при положителен тест за бременност до датата на раждане. Проучването не включва данни за здравния статус на родените деца.

За cut-off стойност на ДНК-фрагментационен тест е използван праг от 27%.

Група 5 (първичен стерилитет): Изследвани са 49 мъже със стерилитет, провеждали непротектирани полови контакти повече от 12 месеца, без регистрирана бременност в двойката. Семенната проба е отдадена чрез еякулация, след 3 до 5 дни полово въздържание, в стерилни, апиrogenни, цитонетоксични контейнери. Пробите са поставени в термостат, на 37°C, веднага след отдаването, с цел втечняване до 30-60 минути. Извършен е семенен анализ, съгласно стандартите на СЗО, 10 редакция (2010 год.), след което пробите са замразени и е извършен флоуцитометричен тест за свързване на сперматозоидите към Annexin V, като маркер за ранна апоптоза. Проучването е рандомизирано по отношение подбора на пациенти и напречно, по отношение получените данни.

Група 6 (пациенти с първичен стерилитет и здрави контроли): проучването включва 100 мъже (доказано фертилни, здрави контроли, n=50 и пациенти с първичен стерилитет, n=50). Изследвани са семенни плазми за ниво на тотален антиоксидантен капацитет (ТАС) чрез луцинометрия, както и спермални параметри (морфология, подвижност и концентрация) и ДНК фрагментационен тест на сперматозоиди. Проучването е рандомизирано и трансверзално, като отразява данни от еднократен анализ на семенна проба от един пациент, използвана за трите анализа.

Група 7 (пациенти със стерилитет, първичен или вторичен): 449 мъже със стерилитет, на възраст между 18 и 60 години, пациенти на клиниката в рамките на една календарна година (2014 год.), са изследвани за инфекция с урогенитални микоплазми чрез PCR на еякулат, ДНК фрагментационен индекс на сперматозоиди и спермален анализ, с цел установяване на зависимост между тях. Не е извършвана селекция на пациентите, като са анализирани данни за всички пациенти, изследвани за наличие на инфекция с урогенитални микоплазми в еякулата за една календарна година.

Група 8 (пациенти със стерилитет, първичен или вторичен, с процедура (IUI или ICSI): 548 двойки, извършили АРТ процедури в клиниката, разпределени както следва: 432 двойки, извършили автоложна ICSI процедура; 39 двойки, извършили ICSI процедура с донорски яйцеклетки; 77 двойки, извършили IUI, включително и с донорски сперматозоиди. Резултатите от ICSI процедурите са отразени като положителен тест за бременност (HCG>5 mUI/l), отрицателен тест за бременност, биохимична бременност, мисед аборт, спонтанен аборт и клинична бременност. Проучването е проспективно, като двойките са проследявани на 14-я ден след ембриотрансфера (ЕТ), при положителен тест за бременност до датата на раждане.

III.2. Методи

III.2.1. Спермален анализ

Спермалният анализ е осъществен съгласно утвърдени стандартни протоколи в *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th Edition, 2010*. За целта са използвани предварително етикетирани стерилни, апиrogenни, цитонетоксични контейнери. Експертизите на семенните проби са осъществени до 60 мин. след отдаване на материала, в андрологична лаборатория, чрез микроскопиране на светлинен микроскоп, снабден с обективи с фазов контраст и имерсионен обектив. Веднага след отдаването, контейнерът със семенната проба се поставя в термостат на 37°C до пълното и втечняване, като предварително се надписва лаб.№ на пациента, дата и час на отдаване. Процедурата по експертиза (спермограма) на сперматозоидите е извършвана в следния ред:

1. Отбелязва се времето за втечняване на пробата.
2. Инспектира се външния вид на пробата – цвят, наличие на желатин или мукозни нишки. Цветът може да варира от слонова кост до червено-кафяв.
3. Определя се вискозитета на пробата. Ако при потапяне и изваждане на върха на пипетата от пробата се образуват нишки по-дълги от 2 cm, пробата е с повишен вискозитет и това се отбелязва в бланката.
4. Обемът на пробата се измерва със серологична пипета за еднократна употреба с точност до 0.1 ml. Нормално той трябва варира между 1.5-6 ml. При обем под 1.5ml в бланката се отбелязва наличие на „хипоспермия”, при обем надвишаващ 6 ml се класифицира като „хиперспермия”.
5. За измерване на рН на пробата се използват рН ленти с обхват от 6.5 до 10. Нормалните стойности на рН на семенната проба варират между 7.2–8.0. Проби с рН под 7.0 са суспектни за „азооспермия”. При рН <6.8 сперматозоидите загиват. Наличието на отклонение от нормата се отбелязва в заключението на спермограмата.
6. Приготвя се свеж (нативен) препарат с цел да се установи наличие на агрегати и аглутинати в семенната проба. За целта се използва стандартно предметно стъкло и покривно стъкло с размер 22mm x 22mm.

Сперматозоидите агрегират с епителни клетки, детрит или други сперматозоиди.

7. Наличие на детрит, епителни клетки от уретралния тракт, левкоцити и други клетъчни включвания се детектират на нативните препарати.
8. За определяне наличието на левкоцити в семенната проба е използван кит LeucoScreen (FertiPro), като се спазва описаната от производителя процедура: 30 μ l от реагент 1 се смесват с 1 ml от реагент 2. Така полученият разтвор е стабилен и годен за употреба в рамките на 24 часа. Върху предметно стъкло се смесват 10 μ l от работния разтвор и 10 μ l от семенната проба, предварително добре хомогенизирана. Двете капки се размесват добре с върха на пипетата и се покриват с предметно стъкло с размери 22 x 22mm. Наблюдава се образуването на въздушни мехурчета, което се дължи на протичащата пероксидазна реакция. Броя на левкоцити се определя след 2 минути на увеличение 400x, като се броят най-малко 20 отделни зрителни полета. Във всяко поле се определя броя на левкоцитите и сперматозоидите. Крайната концентрация на левкоцитите се определя по следната формула:

(брой левкоцити/брой сперматозоиди)*концентрация на сперматозоидите в пробата мил./мл.

Нормално концентрацията на левкоцитите в семенната проба не трябва да надвишава 1×10^6 /мл.

9. Изследване за виталност на сперматозоидите. Тестът за виталност е базиран на пропускливостта на мембраната на сперматозоидите. Използван е еозин-негрозинтест- смесват се 50 μ l семенна течност с 50 μ L разтвор на еозин–негрозин. На предметно стъкло се накапват 10-12 μ l от сместа и се изготвя стандартна натривка. След като изсъхне препаратата се маунтва и се наблюдава на светлинен микроскоп. В зависимост от оцветяването, сперматозоиди с червени или тъмно розови главички се считат за мъртви, сперматозоидите, които не са оцветени (с бели главички) се считат за живи. Долната референтна стойност за живи сперматозоиди е 58% (*WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th Edition, 2010*).

10. Спермална концентрация

Определя се след съответното разреждане на спермалната проба и имобилизирането на сперматозоидите. Сперматозоидите не трябва да бъдат изгубени чрез седиментиране, агрегация или прилепване към стените на контейнера, връхчето на пипетата или епруветката, и не трябва да се допускат грешки при разреждането. Следователно, щателно смесване както преди разреждането на спермалната проба, така също и преди да бъде поставена в броителната камера, е от съществено значение. Важно изискване, за да се измери точния обем на спермалните проби, е използването на пипета с позитивно изтласкаване, поради вискозитета на

семенната течност. Следващата важна стъпка е осигуряването на точни по-малки обеми (на практика това се постига чрез дълбочината на броителната камера). За да се получи точна дебелина, покривното стъкло трябва да се постави плътно, за да бъде изследван очаквания обем на разредената проба и камерата трябва да бъде напълнена коректно и точно.

Броенето се извършва с Хемоцитометър на Neubauer. Всеки хемоцитометър има две отделни броителни камери, всяка от които съдържа микроскопична мрежа (3 mm x 3 mm). Всяка броителна зона е разделена на 9 квадратчета (1 mm x 1 mm) с дълбочина от 100 µm и обем 100 nL. В зависимост от разреждането и броя на сперматозоидите, които се броят, се използват различни части от броителната камера за определяне на спермалната концентрация.

Определяне на подходящото разреждане: Използва се свеж препарат за определяне на концентрация с цел да се избере най-подходящото разреждане. За приготвяне на свеж препарат (10 µl семенна течност, покривно стъкло 22 x 22 mm,), дълбочината на пробата в едно зрително поле е около 20 µm. При условие, че диаметърът на зрителното поле е 500 µm (при 40x увеличение), представеният брой сперматозоиди на зрителното поле може да се използва, за да се избере подходящо разреждане на пробата, както е посочено в табл. 1 (4 сперматозоида на поле приблизително съответстват на концентрация около 1млн. сперматозоиди /ml).

Табл. 1. Разреждане на еякулата за определяне на сперматозоидната концентрация чрез хемоцитометър

Сперматозоиди на микроскопско поле при обектив 40x	Разреждане	Семенна течност µl	Разредител µl
Swim up	1+1 (1:2)	100	100
<15	1+4 (1:5)	100	400
15-40	1+9 (1:10)	50	450
40-200	1+19 (1:20)	50	950
>200	1+49 (1:50)	50	2450

По този начин определени, стандартните разреждания са 1+19 и 1+9; за swim up препарати с <10 млн/мл се използва разреждане 1+1. Разрежданията могат да се съхраняват за максимален срок от четири седмици в епендорфки при температура +4°C, но е за предпочитане да се оценяват на същия ден.

Процедура:

- За всяка семенна проба разреждането се прави съобразно табл. 1. Точното количество от втечнена семенна течност се изтегля с Positive Displacement Pipette от добре миксираната проба и се добавя към разредителя в епруветки с плътни запушалки
- Поставя се покривно стъкло на камерата (Neubauer haemocytometer). При правилно поставяне се наблюдават Нютонови пръстени (>10 пръстена на Нютон – линии на иридисценция) между стъклените повърхности на двете области, където покривното стъкло се прикрепя към камерата на Neubauer. Ако само няколко линии са видими, т.е разстоянието между покривното стъкло и камерата на Neubauer се увеличава, обемът на камерата е твърде голям и резултатът от изследването ще бъде неточен.
- Епруветките, съдържащи разреждана проба се вортексират в продължение на поне 10 секунди (vortex mixer) непосредствено преди напълване на камерата за отчитане. След миксирането, се накапват 10 μ l с пипета от едната страна на камерата на Neubauer. След това, същото количество се слага и от другата страна. Всяка камера трябва да се напълни догоре. Камерата на Neubauer се оставя за 15-20 минути в покой във влажна камера, за да могат сперматозоидите да се утаят на дъното на мрежата за броене.
- Броенето на сперматозоиди се извършва на 20x и 40x увеличение (фазов контраст). Целта е да се преброят 200 сперматозоида във всяка камера, като този брой е достатъчен за сравнение между двете преброявания.
- Изчисления: сравняват се стойностите от броенето в двете камери по таблица. Получените стойности се приемат за валидни, ако разликата между двете преброявания е равна или по-малка от стойността, посочена в таблицата. Сумата от броенето на сперматозоидите в двете камери се дели на съответен фактор, за да се получи концентрацията на сперматозоидите в семенната проба (10^6 сперматозоиди/ml) (табл. 2).

Табл. 2. Фактори за превръщане и изчисляване на сперматозоидната концентрация, определена чрез хемоцитометър.

Брой на преброените квадрати в една камера	Разреждане 1+1 (1:1)	Разреждане 1+4 (1:5)	Разреждане 1+9 (1:10)	Разреждане 1+19 (1:20)	Разреждане 1+49 (1:50)
25	100	40	20	10	4
10	40	16	8	4	1,6
5	20	8	4	2	0,8

Изчисляване на общия брой сперматозоиди в еякулат:

Този параметър позволява да се оцени възможността на тестиса да произвежда сперматозоиди и функционалността на мъжкия репродуктивен тракт. Изчислява се като се умножи концентрацията на сперматозоидите по обема на целия еякулат. Долната референтна граница за общ брой сперматозоиди е 39×10^6 в еякулат. Ако не са намерени сперматозоиди на двата нативни препарата, това може да е белег за азооспермия. Прието е, терминът азооспермия да се използва само ако не са открити сперматозоиди в утайката на центрофугирана проба. При липса на сперматозоиди се прилага центрофугиране на 1000g за 15 мин.

11. Определяне подвижност на сперматозоидите.

Определянето на подвижността на сперматозоидите се определя на микроскоп (фазов контраст, 20x или 40x увеличение). Определянето на подвижността започва веднага след втечняване, за да се избегнат биологични промени, причинени от понижаване на температурата, дехидратация на препарата и др. Броят се всички подвижни и неподвижни сперматозоиди в няколко случайно избрани полета (избягват се полета, близки до ръбовете на покривното стъкло) на 40x увеличение. Ако аглутинацията на сперматозоидите е повече от 25% се преброяват само свободните сперматозоиди, не и слепени сперматозоиди.

Мокър препарат или временен микроскопски препарат - накапват се 10 μ l добре миксирана неразредена проба (+37⁰C) на чисто предметно стъкло и се покрива със стъкло (22 mm x 22 mm, дълбочина 20 μ m). Изследването на мокрия препарат трябва да започне веднага след като пробата спре да се движи. Броят се поне 200 сперматозоида (общо 400 от двата препарата) като се анализират най-малко 4 различни полета. Във всяко поле се броят първо всички бързо прогресивно подвижни сперматозоиди (клас a) и бавно прогресивно подвижни сперматозоиди (клас b). Четирите категории се съобщават в проценти (WHO: rapid; slow; non-progressive, immotile). Пробата се брои два пъти, за да се забележат и минимизират чести грешки, касаещи изменения при приготвяне и изследване на свежите препарати. Ако има такива грешки, определянето на подвижността на сперматозоидите трябва да се повтори, като за целта се приготвя нов препарат по същия начин. Средните стойности за двете преброявания се изчисляват и се отчита резултата. Ако разликата между двете преброявания за определяне на подвижност е много голяма, това означава че има грешка и се прави ново броене.

Има четири категории за определяне на подвижността на сперматозоидите при 37⁰C (табл. 3). Първо се изчислява процента за 4-те категории (СЗО: “a” , “b” , “c” , “d”) за всеки от двата препарата: общия брой на сперматозоидите във всяка група подвижност се разделя на общия брой сперматозоиди, оценен в препарата.

След това се изчисляват резултатите за доминиращата (най-голямата група) и се изчислява средно аритметичния процент за двата дубликата и разликата между дубликатите. Получените резултати се сравняват с таблица, за да се установи дали разликата е достатъчно малка, за да се приемат оценките.

Табл. 3. Разпределение на сперматозоидите по групи подвижност

WHO категории сперматозоиди	„Код”	Съответстваща скорост
бързо прогресивно подвижни	a	$\geq 25 \mu\text{m/s}$ (5 дължини на главата)
бавно прогресивно подвижни	b	5 – 24 $\mu\text{m/s}$
непрогресивно подвижни	c	$< 5 \mu\text{m/s}$ (< 1 дължина на главата)
неподвижни	d	-

Ако разликата между дубликатите е по-малка, отколкото граничната стойност в таблицата, оценките могат да бъдат приети, иначе данните се отхвърлят и се правят два нови препарата. Всички резултати за подвижността се представят като цяло число в процентна стойност. Сбора на 4-те категории подвижност (СЗО: “a” , “b” , “c” , “d”) трябва да бъде равен на 100. Ако сбора е 99 или 101 се наглася доминиращата група, така че сумата да бъде равна на 100. Процентите за четирите категории подвижност на сперматозоидите, процента подвижни сперматозоиди (a+b+c) и процента прогресивно подвижни сперматозоиди (a+b) се записват в доклада.

12. Оценка на спермална морфология

Използват се две предметни стъкла, чиито повърхности предварително се почистват с хартия. ID на пациента и датата се надписват с молив върху матирания край на едното стъкло. В задния му край се капва 5-10 μlot семенната проба, в зависимост от спермалната концентрация. С нешлифования ръб на второто стъкло капката се разстила по цялата дължина на първото, докато се стигне до шлифования му край, като двете стъкла се намират под ъгъл 45° . При обработена проба капка от спермалната суспензия се разстила върху повърхността на стъклото чрез хоризонтално придвижване на пипетата. Препаратите се оставят да изсъхнат на въздух, след което веднага се фиксират. При ниска концентрация на сперматозоиди в пробата (под 2 млн./ml за приготвянето на натривка, семенната проба се концентрира: центрофугира се при 600g за 10 минути; отстранява се голяма част от

супернатантата; утайката се ресуспендира в останалото количество на супернатанта и препаратата се приготвя по описания по-горе начин. Центрофугирането може да повлияе спермалната морфология и този метод на обработка се отбелязва на бланката.

Когато пробата е с повишен вискозитет, една капка от пробата се капва на стъклото и отгоре се поставя друго предметно стъкло, след което стъклата се издърпват в противоположни посоки, или се използва следния метод на разреждане със NaCl: част от пробата (0.2-0.5 ml в зависимост от спермалната концентрация) се разрежда с 10 ml NaCl (0.9g NaCl към 100 ml дестилирана вода); центрофугира се при 800g за 10 минути; отстранява се голяма част от супернатантата; утайката се ресуспендира в останалата супернатанта (около 20-40 μ l); приготвя се натривка, като с пастърка се изтегля около 5-10 μ l от суспензията; проверява се под микроскоп при увеличение $\times 400$, за да се уверим, че натривката е равномерна, както и че на препаратата няма струпвания или припокриване на сперматозоиди. Така приготвените препарати се оставят да изсъхнат на въздух, веднага след което натривката се фиксира. След като изсъхне на въздух, натривката се фиксира за 15 мин. в 95% C_2H_5OH , като може да се съхранява в него продължително време преди оцветяване.

Оцветяване на натривките по Papanicolaou

Необходими реагенти: етанол – фиксира и дехидратира клетките; 50% етанол – хидратира постепенно клетките за да позволи оцветяването им с водно-разтворимия хематоксилин; дестилирана вода – хидратира напълно клетките; хематоксилин – оцветява ядрото в синьо; течаща вода – измива останалия хематоксилин; кисел етанол – обезцветява цитоплазмата на клетките; течаща вода – редуцира киселината и възвръща синия цвят на ядрата; дестилирана вода – възвръща синия цвят на ядрата; етанол – дехидратира натривката, за да позволи третиране с етанол-разтворимия Orange G/EA-50 реагент; orange G/EA-50 – оцветява цитоплазмата в розово; 95% етанол – дехидратира клетките, за да могат да се третират със етанол-разтворими реагенти (табл. 4).

Така приготвените препарати се оставят да изсъхнат на въздух, след което се маунтват. Процедурата протича по следния начин: капват се две или три малки капки Маунтекс на стъклото; поставя се покривно стъкло с размери 24mm x 50mm или 24mm x 60mm директно върху натривката, като се избягва образуването на мехури; в случай че има мехури, покривното стъкло се притиска внимателно, докато мехурите се избутат до ръба на стъклото; ако част от лепилото излезе извън стъклото, се попива внимателно. Маунтваните стъкла се оставят в хоризонтално положение да изсъхнат за 24 часа.

Оценка на морфологията на сперматозоидите по стриктните критерии на Крюгер-Тайгърбърг

Всяко стъкло се микроскопира при увеличение $\times 1000$, под имерсионен обектив. Определя се морфологията на най-малко 200 сперматозоида. Морфология се определя само на цели сперматозоиди (с глава и опашка). Изследва се морфологията на всеки наличен сперматозоид в няколко систематично избрани полета. Изчислява се броя на нормалните и абнормните сперматозоиди чрез лабораторен брояч. Изследва се морфологията на сперматозоидите от два препарата на един и същ пациент (при някои изключения може и на един и същ препарат да се изследват 2×200 клетки). Сравняват се процентите на нормалните сперматозоиди от двете независими изследвания. Изчислява се средно аритметично, както и разликата между тях, и според таблицата по-долу се определя приемливостта на разликата (табл. 5). Ако тя е приемлива резултатът се отбелязва, а в случай, че е прекалено голяма – изследването се повтаря (със същите препарати). В случай, че полученият резултат не е цяло число, се закръглява към по-близкото такова.

Табл. 4. Етапи при оцветяване по Papanicolaou

№	РЕАГЕНТИ	ВРЕМЕТРАЕНЕ
1	50% C_2H_5OH	2-3 мин.
2	Дестилирана вода	10 потапяния
3	Хематоксилин на Харис	8 мин.
4	Под течаща вода	5 мин.
5	Кисел етанол (0.25% HCl , 70% C_2H_5OH)	2 потапяния
6	Под течаща вода	5 мин.
7	Дестилирана вода	1 потапяне
8	50% C_2H_5OH	10 потапяния
9	70% C_2H_5OH	10 потапяния
10	80% C_2H_5OH	10 потапяния
11	95% C_2H_5OH	10 потапяния
12	Оранж G6	4 мин.
13	95% C_2H_5OH	10 потапяния
14	95% C_2H_5OH	10 потапяния
15	EA-50	5 мин.
16	95% C_2H_5OH	5 потапяния
17	95% C_2H_5OH	5 потапяния
18	95% C_2H_5OH	5 потапяния
19	98.8 % C_2H_5OH	2 мин.

Забележка: Едно потапяне отговаря на една секунда.

Според *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen – 5th Edition*, критериите на които отговарят сперматозоидите, за да се класифицират като нормални са следните: овална форма на главата с гладки контури и с размери 4.0-5.0 μm дължина и 2.5-3.5 μm ширина; добре видима бледо оцветена акрозомна част, която представлява 40–70 % от размера на главата и добре видима по-тъмно оцветена част – ядро; акрозомата не съдържа големи вакуоли, както и не повече от две малки вакуоли (вакуолите не заемат над 20% от площта на главата); в ядрото не се наблюдават вакуоли; съотношението дължина/ширина на главата е 1.5 до 1.75.; в основата си главата не трябва да бъде плоска или да се стеснява; след главата е разположена шийката и средната част на опашката, която е малко по-дебела с максимална ширина 1 μm и е дълга 7-8 μm ; опашката на сперматозоида трябва да бъде по-тънка от средната част, прикрепена симетрично в основата на главата; опашката трябва да е само една с дължина около 45 μm , не е пречупена или огъната, може да е леко завита; като „нормални” се приемат цитоплазмени остатъци с гладки контури и с размер до 1/3 от размера на главата. Всички гранични случаи се приемат за дефектни.

Табл. 5. Допустими разлики между две преброявания за определяне на спермална морфология (при преброяване на 400 клетки)

Acceptable differences between two percentages for a given average, determined from replicate counts of 200 spermatozoa (total 400 counted)

Average (%)	Acceptable Difference*	Average (%)	Acceptable Difference*
0	1	66–76	9
1	2	77–83	8
2	3	84–88	7
3–4	4	89–92	6
5–7	5	93–95	5
8–11	6	96–97	4
12–16	7	98	3
17–23	8	99	2
24–34	9	100	1
35–65	10		

Based on the rounded 95% confidence interval.

Брое на дефектните сперматозоиди

Оценяват се основните четири части на сперматозоида – глава, шийка/средна част и опашка. Не се отдиференцират различните дефекти на главата и опашката. Ако преобладава някой конкретен дефект, това трябва да се отбележи на бланката.

Дефекти на главата. Включват голяма, малка, удължена (дължина/ширина > 2), с крушовидна форма (пириформени), кръгли, аморфни, вакуолизирани (>20% от площта на главата е заета от неочветени вакуоли), малка или голяма акрозомна

област (<40% или >70% от площта на главата), две глави или комбинацията от всички изброени. Игловидните сперматозоиди (Pinhead) не се броят.

Дефекти на шийката и средната част. Включват пречупване на средната част под ъгъл 90° спрямо дългата ос на главата, неправилно (асиметрично) прикрепяне, задебелена средна част, тънка средна част (липса или разместване на митохондриалния участък) или комбинация от изброените дефекти.

Дефекти на опашката. Включват къса, двойна (или повече), пречупена, огъната с ъгъл >90°, с неправилна ширина, завита или комбинация от всички тези дефекти. Само опашки не се броят. Високата честота на завити опашки са индикация за хипоосмотичен стрес, както и за стареенето на сперматозоидите. Ако този дефект е над 20% се отбелязва в бланката.

Цитоплазмен остатък. Цитоплазмените остатъци могат да се наблюдават от основата на главата до шийно-средната част. Цитоплазмени остатъци с гладки очертания и размер непревишаващ 1/3 от размера на главата се класифицират като норма. Следователно, ако размера на остатъка превишава 1/3 от размера на главата или контурите са с неправилна форма (оцветени в червено или зелено) се класифицира като аномалия. Някои незрели сперматозоиди могат имат цитоплазмен остатък на други места по дължината на опашката.

Изчисляване и представяне на резултатите

- Брой изследвани сперматозоиди (минимум 200)
- % Нормални сперматозоиди (Според *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen – 5th Edition* за долна референтна граница се приема стойността от 4%)
- % Абнормни сперматозоиди
- % главични дефекти, % дефекти на шийката и средната част, % дефекти на опашката и % цитоплазмени остатъци
- Тератозооспермален индекс (TZI) – среден брой на дефектите за дефектен сперматозоид. Изчислява се чрез разделяне на сумата от процента дефекти (четирите групи дефекти) на общия процент дефектни сперматозоиди. Стойностите на TZI варират между 1 и 4, според *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen – 5th Edition* за горна референтна граница се приема стойността 1.6. Всички стойности над тази граница се приемат за абнормни.
- Концентрацията на незрелите клетки (C) се определя по следната формула: $C \times 10^6 / \text{ml} = (N \times S) / 100$, където N е броя на незрелите клетки изброени за сто зрели сперматозоида, а S е концентрацията на сперматозоидите на милилитър

III.2.2. ДНК-фрагментационен тест (DNA Integrity test)

Замразените семенни проби се размразяват под течаща вода. Еякулатът (1 мл се отделя в 15 ml вакутейнери и се добавят 3 ml PBS, след което вакутейнерите се центрофугират на 2500 оборота/мин. за 5 минути и се отстранява надслющата течност. Утаените сперматозоиди се разреждат с PBS до 5×10^6 . 200 μ l от разредката се прехвърлят в епруветка за флоуцитометрия, добавят се 400 μ l ADS и точно след 40 секунди се прибавя АО. Успоредно с пробите се приготвя и празна проба – контрола на реактивите. Извършва се флоуцитометрично изследване на пробите с FACS флоуцитометър (Becton Dickinson, San Jose, CA), като се натрупват общо 5000 събития за всяка проба. Резултатите се обработват със софтуер – Flow-Jo. При тези експериментални условия и източник на светлина 488 nm, при интеркалиране на АО в двойно верижна ДНК, се излъчва зелена флуоресценция, а АО, свързан с едноверижна ДНК излъчва червена флуоресценция. По този начин, увреждането на спермалния хроматин може да се определи чрез FCM измерване на метакроматичното преминаване от зелена (нативна, двойно-верижна ДНК) до червена (денатурирана, едноверижна ДНК) флуоресценция и показва червен (фрагментирана ДНК) в сравнение със зелен (нативна ДНК) интензитет на флуоресценцията в цитограми. Компютърен гейт се използва за да се определи съотношението на сперматозоидите с повишени нива на червена флуоресценция (денатурирана едноверижна ДНК) и зелена флуоресценция. Степента на ДНК денатурация, изразена като DFI, е съотношението между червената спрямо общата (червена плюс зелена) флуоресценция, т.е. нивото на денатурирана ДНК спрямо общата ДНК (Evenson, 2002). Стойността на DFI се изчислява за всеки сперматозоид в пробата, и в резултат се получава DFI на пробата. Повечето сперматозоиди образуват унимодално разпределение и представляват нормалната спермална популация, без увреждане на ДНК. Сперматозоидите с червена флуоресценция, попадащи на хистограмата в зоната извън кривата на нормалното разпределение на сперматозоиди, представляват популацията на абнормни сперматозоиди с детектабилна ДНК фрагментация. Освен това, отчита се и популацията с висока оцветителна способностна ДНК (HDS клетки). HDS представлява друга, отделна популация сперматозоиди, която включва незрели сперматозоиди с незавършена кондензация на хроматина. Процентът на HDS клетки се изчислява чрез създаването на съответен гейт на бивариантна цитограма, като за незрели сперматозоиди се приемат тези събития, които проявяват зелена флуоресценция, с интензитет по-висок от горната граница на основния клъстер от популацията сперматозоиди с неоткриваема ДНК фрагментация.

III.2.3. Изследване на маркери за ранна апоптоза чрез оцветяване с Annexin V

Използван е Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (Ebioscience, ref. 88-8005). Семенните проби се обработват по метода двоен градиент (45%, 90%) със следните среди: Supra Sperm 100% и Sperm preparation Medium. Пробата се центрофугира на 400g за 12 минути, след което се отделя за контрола, а другата част от суспензията се обработва с флуоросцеин изотиоцианат конюгат (FITC) с Анексин V. 1 ml от свързващия буфер се разрежда с 9 ml дестилирана вода. Сперматозоидите се измиват с PBS, след което еднократно със свързващ буфер и се ресуспендират в 1 ml буфер до $1-5 \cdot 10^6/ml$. Добавят се 5 μl флуорохром-конюгиран Annexin V към 100 μl от клетъчната суспензия. Пробите се инкубират 10-15 мин. на стайна температура. Клетките се измиват с 1 μl буфер и се ресуспендират с 200 μl свързващ буфер. Добавят се 5 μl продиум йодид оцветяващ разтвор. Пробите се анализират на флуоцитометър до 4-ия час, като се съхраняват на температура 2-8°C на тъмно.

III.2.4. Изследване на тотален антиоксидантен капацитет (ТАС) на сперматозоиди чрез луцинометрия

Използван е Тас-Рeroxyl Assay Kit (Northwest, NWK-ТАС01) за луцинометър. Фиалки със замразените проби семинална плазма се размразяват под течаща вода и се разрежда всяка проба със Sample dilution buffer 1/40. Създава се проба/контрола шаблон, спрямо разположението в плаката, като се използват чисти 96-ямкови бели плаки за луциносценция. Във всяка ямка се добавят по 260 μl буфер, 7 μl Luminol реагент, 13 μl Trolox стандарт или проба и се миксира няколко пъти. След инкубация за няколко минути, се добавят 16 μl АВАР реагент с цел стартиране генериране на свободни радикали. Миксира се до 5 секунди и се поставя незабавно в луцинометър. Записът се прекратява, когато се появи максимално плато на луциносценция или след 30 мин.

Анализ на резултатите: ТАС концентрацията се изчислява по формулата:

$(S_{\text{assay}})/(C) = T_s/T_C$, където (S_{assay}) е измереният антиоксидантен капацитет в μM Trolox еквиваленти на разредената проба, (C) е концентрацията на Trolox стандарта и T_s/T_C е индукционното време на пробата и стандарта съответно.

Антиоксидантният капацитет на пробата е: $(S_{\text{original}}) = (S_{\text{assay}}) * (\text{dilution factor})$

III.2.5. Real time PCR за определяне на урогенитални микоплазми в еякулат

Материали: AmpliSens Ureaplasma species FRT, AmpliSens Mycoplasma hominis, AmpliSens Mycoplasma genitalium FRT, Кит за изолиране на ДНК-DNA sorb AM, Транспортна среда с муколитичен агент, Плаки за ECO Real Time, Покривно фолио за плаки за ECO Real Time. Изолиране на ДНК: Смесват се лизиращия разтвор, вътрешната контрола и сорбента. Към тази смес се прибавя изследваната проба. Приготвя се контрола за изолиране на ДНК по начина, описан в кита. След

центрифугиране на смесите, се отстранява супернатантата и се прибавя буфер за отделяне на ДНК. Следва центрофугиране и отделяне на супернатантата, съдържащ ДНК. Изготвяне на PCR реакционен микс: Общ обем на сместа: 20 μ l (12 μ l реакционен микс + 8 μ l изолирана проба). Смесват се PCR mix 1 и PCR mix 2 Tag polymerase. Накапва се в плаката, прибавя се изолираната ДНК, прибавят се и положителни и отрицателни контроли за амплификация.

III.2.6. Замразяване и размразяване на сперматозоиди

Използвани материали за обработване на пробата през двоен плътностен градиент, криоконсервация: 15 ml епруветки NUNC, 5 ml епруветки, 2 ml стерилни пипети, борсиликатни пастьорки, пипетор GILSON, Центрофуга Eppendorf. Среди: Sperm Preparation Medium, SupraSperm 100%, криопротектант, криоепруветки, течен азот, Cryo cane, Cryo flex.

Обработването на еякулата се извършва чрез центрофугиране с двоен плътностен градиент. Наслойват се в конична епруетка 90% гел Supra Sperm, след което се наслойва 45% SupraSperm гел в съотношение 1:2. Наслойват се 2 ml семенна течност. Пробата се центрофугира за 16 мин. на 1600 rpm, след което супернатантата се отстранява и утайката се ресуспендира в 1 ml Sperm preparation medium. Центрофугира се за 7 минути на 1400rpm. След измиването, утайката се ресуспендира в 0.5 ml Sperm preparation medium, определя се броя и концентрацията на сперматозоидите след обработката. Добавя се криопротектант (Sperm Freeze), в съотношение 1:0.7 ml. Пробата се оставя на плот за 10 мин., и след това се оставя за 15 мин. на азотни пари. Съхранява се в течен азот при -196°C .

Размразяване на сперматозоиди: Замразените проби в криоепруетка се поставят под течаща вода за 10 мин. Пробата се измива от криопротектанта, чрез добавяне на капки Sperm preparation medium двукратно. Утайката се ресуспендира в желанния обем и пробата е готова за анализ.

III.2.7. Вътрематочна инсеминация (IUI)

IUI е показана при пациенти с неизяснен стерилитет, жени без партньор, или при жени, чиито партньори имат генетично заболяване и се използва спермален донор. Нормалната проходимост на маточните тръби е доказана предварително или чрез хистеросалпингография (ХСГ) или чрез лапароскопия. IUI се извършва само в случаите с поне 5×10^6 сперматозоиди/мл. след градиентно центрофугиране. Преди IUI, пациентките се стимулират с кломифен цитрат (Clostilbegyt tabs.) за 5 дни и човешки менопаузален гонадотропин (HMG, Merional) 75 IU от ден 8 за 4 дни + 3. Когато един + 2 фоликула достигнат диаметър >18 mm, 10 000 IU HCG (Choriomon, Pregnyl) се прилагат за фоликуларно съзряване. След 36 часа, свежа проба еякулат се обработва по метода двойно-плътностен градиент, за получаване на

сперматозоидите. Процедурата за измиване и разреждане се извършва чрез Supra Sperm Origio (среда за измиване на сперматозоиди). 1 ml аликвотна част на подготвената спермална проба се използва за осеменяване със Sure view катетър.

III.2.8. IVF и ICSI

Контролирана овариална хиперстимулация: IVF/ICSI пациентите са подложени на потискане на хипофизарната функция и хормонално лечение. Накратко, пациентите са подложени на Down регулация с GnRH агонист (Декапептил 0.1 за 22 дни или Декапептил депо 3.75 една апликация), като се използва дълъг или къс протокол. Овариална стимулация се извършва с REC-FSH (Gonal F или Puregon) (с помощта на индивидуална доза между 100 и 300 IU s.c. на ден в зависимост от възрастта, обем на яйчниците, изходното FSH и BMI). Отговорът на яйчниците се следи чрез ултразвук изследване, което започва на ден 1 от стимулацията и дозата на REC-FSH се коригира, ако е необходимо.

Аспирацията на овоцитите и подготовка на спермалната проба: когато най-малко един фоликул достигне диаметър >18 mm, 10 000 IU HCG (Serono) се прилагат за индуциране узряването на фоликулите. Извличането на яйцеклетките се извършва 36 часа по-късно, под вагинален ултразвуков контрол, чрез аспирация на фоликулите. FLUSH буфериран разтвор се използва за изплакване на яйцеклетките. Стандартен метод за центрофугиране на сперматозоидите е в двойно плътностен градиент, с използването на Sperm preparation media и Supra Sperm 100% (Origio). Слединкубиране в инкубатор с подаване на 6.0% CO₂, 5% O₂ и 89% N₂ в продължение на 120 мин., яйцеклетките се промиват три пъти в IVF medium (Origio) до момента на извършване на оплождане чрез ICSI. Оголването на яйцеклетките (стрипването на кумулус) се извършва чрез излагане в среда, съдържаща хиалуронова среда (Hyadase, Origio) за максимум 30 s. Ооцитите се промиват и се култивират след стрипването в IVF medium за 60 мин. ICSI се провежда чрез използване на ICSI пипети (Cook, Бризбейн, Австралия). 5 ml поливинилпиролон (PVP) се разпростира в тънък слой върху ICSI-петри. 1 ml аликвотна част от обработената проба сперматозоиди се въвежда в единия край на PVP капка. След инжектиране, ооцитите се промиват два пъти в G.1 среда (Vitrolife). След ICSI се изплакват в G.1 и се култивират в G1, която се сменя веднъж на ден 1 от оплождането, до сутринта на ден 3. От ден 3 до ден 5, ембрионите се култивират в G2 среда (Vitrolife) до трансфера на ембриони.

III.2.9. Статистически методи

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет Statgraphics plus version 2.1. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието $p < 0.05$. Бяха приложени следните методи:

1. Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическо разсейване.
3. Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.
4. Алтернативен анализ – за сравняване на относителни дялове.
5. Точен тест на Фишер и тест χ^2 за проверка на хипотези за наличие на връзка между категорийни променливи.
6. Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк – за проверка на разпределението на емпиричните данни за нормалност.
7. Еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA)– параметричен тест за проверка на хипотези за влияние на категориен фактор върху количествен признак.
8. Т-критерий на Стюдънт– за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.

IV. Резултати

IV. 1.1 Резултати от определяне на референтни стойности на спермалните показатели за Българската популация, спрямо нормите на СЗО, 5-то издание.

Изследвани са 100 здрави български мъже (Група 1), на възраст между 18 и 40 години, в чиито двойки има регистрирано раждане на дете до 1 година назад, спрямо датата на семенния анализ, или чиито партньорки са бременни към момента на семенния анализ със срок на бременността над 20 гестационна седмица. В приложение 1 са представени резултатите от определяне референтните стойности за спермална концентрация, подвижност, морфология и тератозооспермален индекс.

Установените от нас референтни граници за отделните параметри са както следва:

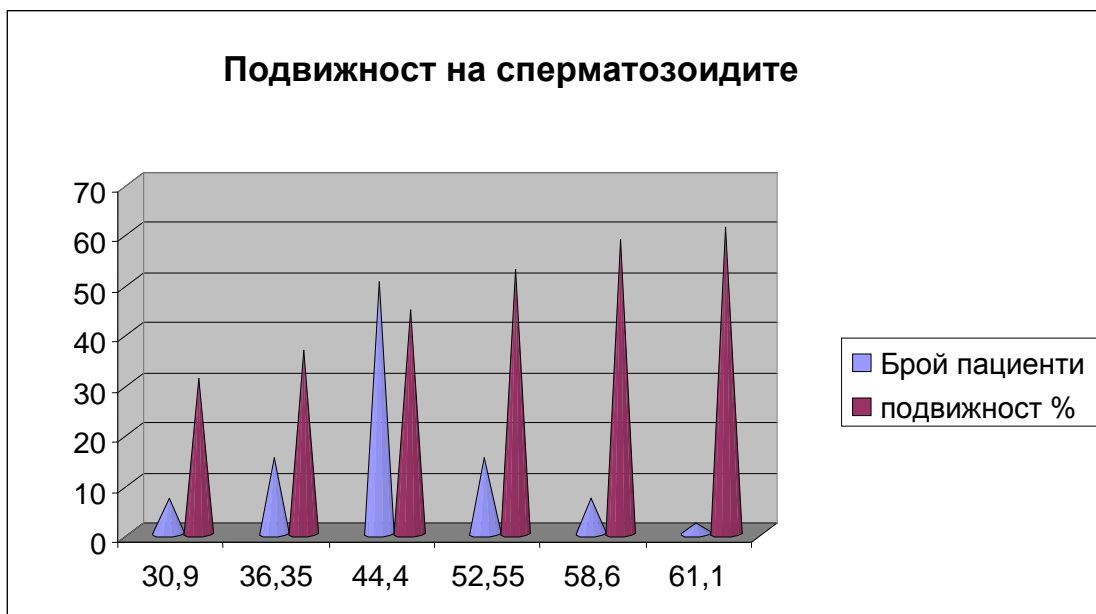
1/ Концентрация на сперматозоидите/ ml: 26 500 000 ÷ 70 500 000 (X-0.5 SD ÷ X+0.5 SD, P25÷P75)

2/ Подвижност на сперматозоидите: 36.3% ÷ 52.5% (X-0.5 SD ÷ X+0.5 SD, P25÷P75)

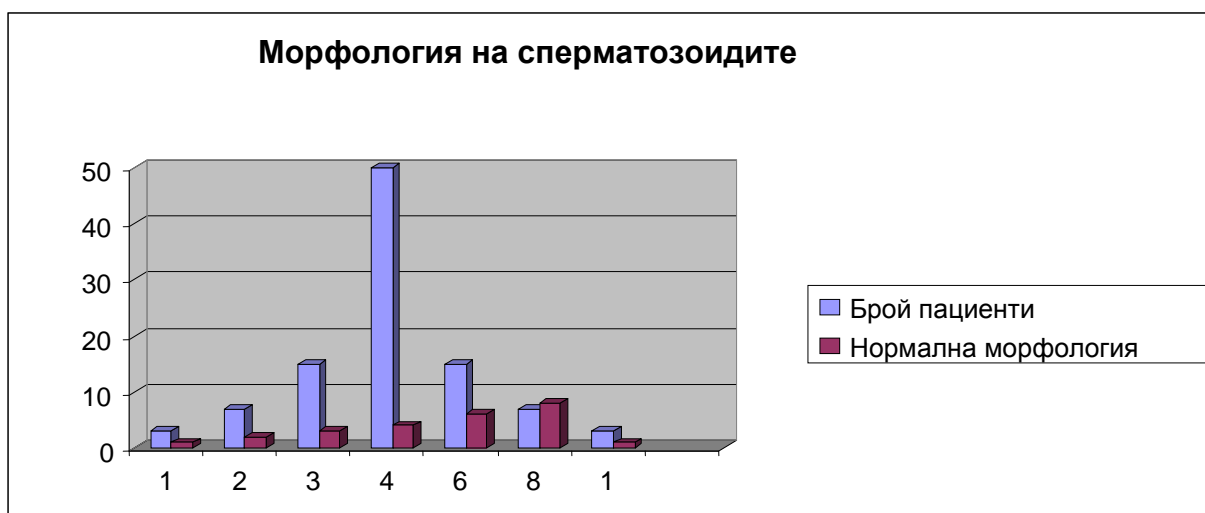
3/ Морфология: 3% до 6% (X-0.5 SD ÷ X+0.5 SD, P25÷P75)

4/ Тератозооспермален индекс: 1.22÷1.44 (X-0.5 SD ÷ X+0.5 SD, P25÷P75)

На фиг. 1 и 2. графично са представени резултатите от изследване на спермалната подвижност и морфология в контролната група здрави мъже.



Фиг. 1. Стойности за подвижност на сперматозоидите на здрави мъже от контролната група (n=100).

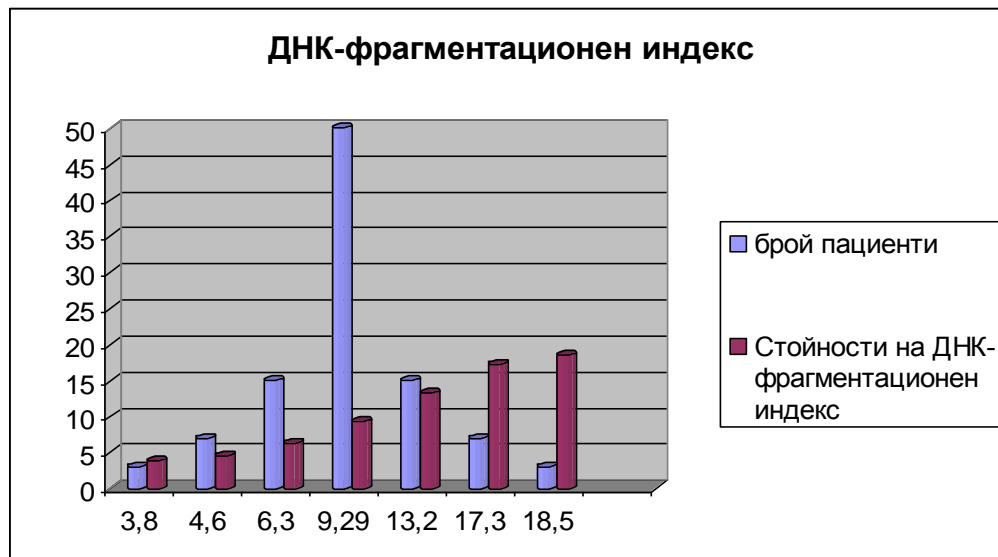


Фиг. 2. Резултати от определяне на морфология на сперматозоидите на здрави мъже от контролната група (n=100).

IV.1.2. Определяне на референтни стойности за ДНК-фрагментационен индекс

Изследвани са 100 здрави български мъже (Група 1), на възраст между 18 и 40 години, в чиито двойки има регистрирано раждане на дете до 1 година назад, спрямо датата на семенния анализ, или чиито партньорки са бременни към момента на семенния анализ със срок на бременността над 20 гестационна седмица. На табл. 11 са представени резултатите от определяне референтните стойности на ДНК-фрагментационния индекс. Установените от нас референтни граници за ДНК-

фрагментационен индекс са както следва: 6.3% ÷ 13.2% (X-0.5 SD ÷ X+0.5 SD, P25÷P75). Силно над нормата са два резултата: 18.5% и 18.9%, което потвърждава, че cut-off стойността на ДНК-фрагментационен индекс за бременност по естествен път е DFI<20%. На фиг.3 е представено разпределението на стойностите за ДНК-фрагментационен индекс при пациенти от група 1 (зdravi доброволци).



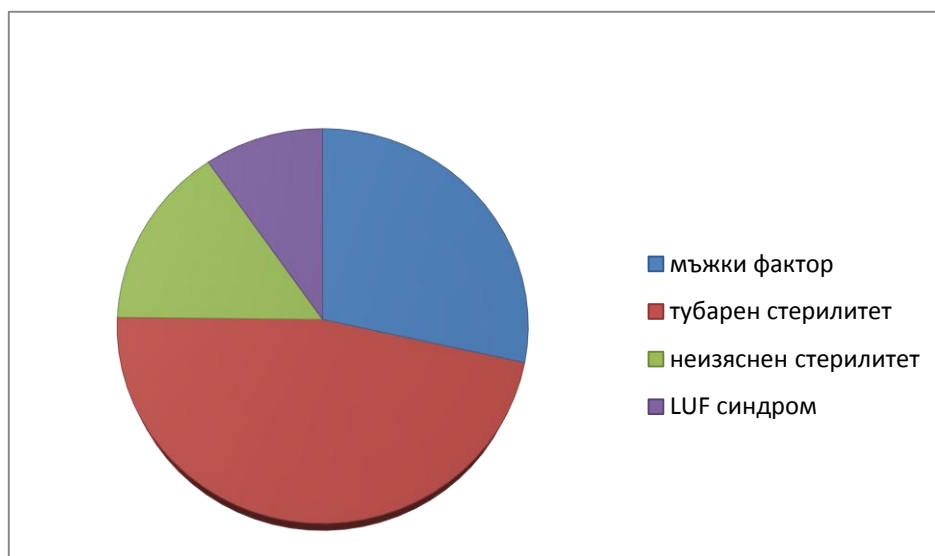
Фиг. 3. Стойности за ДНК-фрагментационен индекс на сперматозоидите при пациенти от контролната група (група 1)

IV.3. Проучване влиянието на ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоидите върху изхода на ICSI процедурите при cut-off за DFI 30%.

За целта бяха изследвани пациентите от Група 3 (165 мъже от двойки, пациенти на клиниката, при които са извършени IVF/ICSI процедури). Подбора на мъжете включва пациенти без данни за инфекция в еякулалата (банална флора, уреаплазма уреалитикум, микоплазма хоминис, микоплазма гениталиум) и без наличие на антитела срещу хламидия трахоматис в серума. При тези мъже е изследвано влиянието на ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоидите по отношение изхода на процедурата, изразен като липса на бременност, клинична бременност, биохимична бременност или аборт. По отношение причините, довели до извършване на ICSI процедура, се установи следното разпределение по причини:

1. Стерилитет при мъжа – 47 двойки (28%)
2. Тубарен стерилитет при партньорката – 77 двойки (47%)
3. Неизяснени причини за стерилитет, вкл. и предхождащи четири неуспешни IUI -25 двойки (15%)
4. LUF синдром (неруптурирал фоликул след индуциране на овулация и недостатъчност на жълтото тяло) – 16 двойки (10%)

На фиг. 4 е представено разпределението на причините за стерилитет, довели до ICSI процедура при група 3 пациенти.



Фиг. 4. Разпределение на причините за стерилитет, довели до ICSI процедура при група 3 пациенти.

Като cut-off стойност за DFI е приета граница от 30%, като съобразно този показател, пациентите са разпределени в две подгрупи. По отношение характеристиките на пациентите в групата, спрямо изследваните показатели, се установиха следните резултати за pregnancy rate на ICSI процедурите, в зависимост от DFI (табл. 6):

При сравняването на двете подгрупи по отношение на процента на регистрирани бременности на ден 14 след ембриотрансфера (ET), не се установи статистически значима разлика (OR 1.18, $p > 0.05$)

Табл. 6. Pregnancy rate при IVF/ICSI процедури в зависимост от DFI (Cut off 30%)

Характеристики на групата пациенти N= 165 двойки	DFI < 30%		DFI > 30%	
	Включени двойки (n)	131	79.39%	34
Положителен тест за бременност (n)	65		17	
Отрицателен тест за бременност (n)	66		17	
Pregnancy rate (%)	49.6%		50.0%	

В групата бе регистрирана бременност при 82 двойки, от общо 165, извършили ICSI. При тези бременности 65 са в двойки с партньори с DFI<30% и 17 бременности при DFI>30%, при рандомизирано разпределение на пациентите. При сравняване на двете подгрупи пациенти по отношение развитието на бременността след 14-^а ден от ЕТ, с цел установяване зависимост между ДНК–фрагментационния индекс на сперматозоидите и загубите на плода след ICSI, се установиха следните резултати (табл. 7).

Табл. 7. Загуби на плода (%) след IVF/ICSI в зависимост от DFI на сперматозоидите

Характеристики на 82 двойки, с регистрирана бременност след 14 ден от ЕТ	DFI<30%		DFI >30%	
	Включени двойки (n)	N=65		N=17
Клинична бременност >20 г.с (n) и %	50	77%	12	70,5%
Биохимични бременности (BP) (n) и %	3	4.6%	1	5,9%
Спонтанни аборти (SPA) (n) и %	12	18,4%	4	23,5%
Загуби на плода%	23%		29.4%	

По отношение загубите на плода при група 3 пациенти не бе установена статистически значима разлика между двете подгрупи пациенти, спрямо ДНК–фрагментационния индекс на сперматозоиди (OR 1.4, p>0.05)

IV.4. Резултати от проучване предсказващата стойност на ДНК-фрагментационен тест по отношение изхода на ICSI процедурите при cut-off за DFI 27%

За целта бяха изследвани пациенти от група 4 (292 мъже, от двойки, извършили ICSI процедура), като изследването на увредата на спермалния хроматин е извършено чрез ДНК-фрагментационен тест, резултатите са изразени чрез DFI и HDS индекс. Пациентите са разделени в две подгрупи в зависимост от DFI – под и над 27% и бяха сравнени по отношение изхода на бременността след извършена ICSI процедура, отразен като положителен тест за бременност (HCG>5 mIU/l на 14 ден след ЕТ), отрицателен тест (HCG<5 mIU/l на 14 ден след ЕТ), биохимична бременност, missed аборт и клинична бременност (над 20 г.с). Установените положителни тестове на 14 ден след ЕТ са 242 , т.е. PR е 48.6%. (% бременност или PR% - pregnancy rate). При разделянето на пациентите на две групи, спрямо cut-off за DFI от 27%, в групата с DFI<27% попаднаха 261 мъже (89%), а 31 мъже са с DFI >27% (11%). В първата група са регистрирани 129 положителни теста и 132 отрицателни теста. В групата с DFI >27% PR е 41.9% (13 положителни и 18 отрицателни теста). Данните показаха статистически значима разлика по отношение

постигането на бременност между групите ($p < 0.05$, 95CI%). Резултатите са представени в табл. 8

Таблица 8. Характеристики на група 4 пациенти по отношение изхода на АРТ в зависимост от DFI cut off 27%

Характеристики на 292 двойки, извършили ICSI	DFI<27%	DFI>27%
Включени двойки n (%)	261 (89%)	31 (11%)
положителни тестове (n)	129	13
отрицателни тестове (n)	132	18
Бременност %	51.3%	41.9%

Таблица 9. Характеристики на двойките от група 4 с положителен тест за бременност след ICSI, в зависимост от DFI cut off 27%.

Характеристики на 142 двойки, с положителен тест за бременност след ICSI	DFI<27%		DFI>27%	
Включени двойки (n)	N=129		N=13	
Клинична бременност (n) (>20 w.g)	98	76%	7	53.9%
Биохимична бременност (n)	10	3.4%	2	15.3%
Спонтанен аборт	21	17.6%	4	30.8%
Загуби на плода %	24%		46.1%	

По отношение загубите на плода след ICSI процедура, е проследено развитието на бременността при 142 пациентки до 20 г.с. Установи се статистически значима разлика по отношение загубите на плода между двете подгрупи (OR=3.4, $p < 0.05$, 95CI), с по-висока честота в подгрупата с DFI>27%. Резултатите са представени в табл. 9

IV.5. Резултати от проучване влиянието на патогенетични фактори върху ДНК-фрагментацията на сперматозоидите.

IV.5. 1. Резултати от проучване зависимостта между ранна апоптоза (с маркер Annexin V binding) и ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоиди.

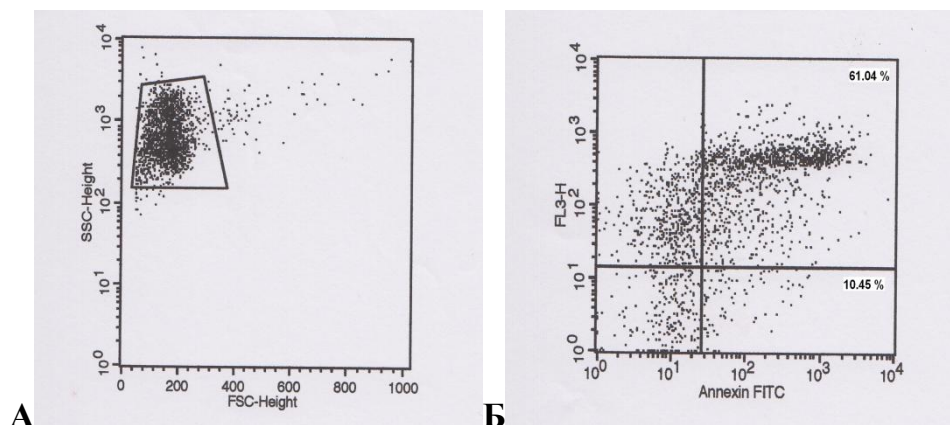
За целта на това проучване са изследвани пациенти от група 5 (49 мъже със стерилитет, провеждали непротектирани полови контакти повече от 12 месеца, без регистрирана бременност в двойката). Семенната проба е отдадена чрез еякулация, след 3 до 5 дни полово въздържание, в стерилни, апиrogenни, цитонетоксични контейнери. Пробите са поставени в термостат, на 37°C, веднага след отдаването, с цел втечняване до 30-60 минути. Извършен е семенен анализ, съгласно стандартите на СЗО, 10-та редакция (2010 год.). след което пробите са замразени и е извършен флоуцитометричен тест за свързване на сперматозоидите към Annexin V, като маркер за ранна апоптоза. Резултатите, от изследване на стандартните спермални параметри в групата са представени в табл. 10.

Табл. 10 Резултати от спермални параметри при група 5 пациенти

Parameter	No.	Mean \pm SD	Range
Age (y)	49	35.30 \pm 6.41	20.00 - 52.00
Motility (%)	49	40.63 \pm 12.68	9.00 - 65.80
Sperm concentration ($\times 10^6$ /mL)	49	39.19 \pm 3.13 $\times 10^6$ /ml	2.21 - 150.62 $\times 10^6$ /ml
Morphology %	49	3.12 \pm 2.06	0 - 9.00
DFI %	49	17.96 \pm 8.10	5.09 - 48.40

Съгласно показателите от стандартния семенен анализ, пробите бяха разделени на две подгрупи – с нормална спермална морфология ($\geq 4\%$) и група с тератозооспермия (сперматозоиди с морфология $\leq 4\%$). От друга страна, пробите бяха разделени съобразно подвижността на сперматозоидите на проби с нормална прогресивна подвижност ($a+b \geq 32\%$) и проби с астенозооспермия ($a+b \leq 32\%$). По отношение на ДНК-фрагментационния индекс е използвана cut-off стойност от 25% за проучването на тази група пациенти

Цитограми от теста за свързване с Annexin V са представени на фиг. 5.



Фиг. 5. Флоуцитометрично изследване на свързването с Annexin V/FITC от сперматозоиди (A) scatter/side scatter dot plot; (Б) Annexin V/FITC и propidium iodide (PI) експресия.

Резултатите от детекция на апоптоза чрез Annexin V/FITC тест показва средна стойност за Annexin V+/PI- клетки 9.41% (SD±6.35), за Annexin V+/PI+ клетки средна стойност 37.87% (SD±16.3). Същата група проби, анализирани за ДНК фрагментация, показаха средна стойност за DFI 17.96% (SD±8.1%). Установи се статистически значима корелация между средната стойност на Annexin V+/PI- и групата с тератозооспермия ($t=1.91$, $p=0.03$). Средната стойност на Annexin V+/PI- клетките положително и значимо корелира с групата с астенозооспермия ($t=1.99$, $p=0.02$) и групата с висока ДНК фрагментация (DFI>25%) – $p=0.03$.

IV.5.2 Резултати от проучване влиянието на оксидативния стрес върху ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоиди.

За изследване на показатели, касаещи оксидативен стрес, е избрано изследване на тотален антиоксидантен капацитет (ТАС) на сперматозоиди чрез луцинометрия. Изследвана е група 6 пациенти - мъже с първичен стерилитет и здрави контроли. Проучването включва общо 100 мъже, разделени в две подгрупи: група 6А - доказано фертилни, здрави контроли, $n=50$ и група 6Б - пациенти с първичен стерилитет, $n=50$. Изследвани са семенни плазми за нивото на тотален антиоксидантен капацитет (ТАС) чрез луцинометрия; спермални параметри (морфология, подвижност и концентрация) и ДНК фрагментационен тест на сперматозоиди. Получените данни са от еднократен анализ на семенна проба от един пациент, използвана за трите анализа. В табл. 11 и табл. 12 са представени характеристиките и резултатите на двете подгрупи мъже

Табл. 11. Характеристики на група 6А пациенти - фертилни, здрави контроли.

Показатели фертилни пациенти N = 50	Mean ± SD	Range
Години	36.81 ± 4.59	30.00 - 46.00
Концентрация сперматозоиди (x 10⁶/ml)	62.10 ⁶ ± 3.52	6.20 - 120.00
Подвижност (a+b) %	39.9 ± 5.35	32.00 - 54.00
Морфология %	4.8 ± 2.0	2.00 - 8.00
DFI %	10.38 ± 5.17	4.00 - 19.30
ТАС (μ/m)	1201.1 ± 548	471.00 - 1196.00

Средната стойност за спермална морфология във фертилната подгрупа е 4.8% (SD±2.0), докато при пациентите със стерилитет морфологията е 2.8% (SD±1.68). Разликата е статистически значима (p=0.001). Същите проби, анализирани за ДНК-фрагментация на сперматозоиди, показаха средна стойност за DFI 10.38% (SD±5.17%) за фертилната подгрупа, и съответно DFI 17.22% (SD±7.22%) за инфертилната подгрупа. При сравняване на данните, се установи статистически значима разлика по отношение DFI между двете групи (p=0.009). Нивата на ТАС за фертилната подгрупа е 1201.1 μM (SD±548), а при групата със стерилитет установеното ниво е 831μM (SD±343). При статистическия анализ на данните се установи статистически значима разлика между стойностите на ТАС между двете групи (p=0.004).

Табл. 12. Характеристики на група 6Б пациенти – инфертилни пациенти.

Показатели инфертилни пациенти, n=50	mean ± SD	Range
Години	35.90 ± 5,75	26.00 - 45.00
Концентрация сперматозоиди (x 10 ⁶ /ml)	50.60 ± 4.50	6.90 - 120.00
Подвижност (a+b) %	35.00 ± 12.20	01.00 - 53.00
Морфология %	2.8 ± 1.60	1.00 - 6.00
DFI %	17.22 ± 7.20	5.00 - 28.00
ТАС (μ/m)	831 ± 343	250.00 - 1136.00

IV.5.3 Резултати от проучване влиянието на оксидативен стрес, причинен от урогенитална инфекция върху ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоидите.

С оглед на противоречивите данни бе изследвана сравнително голяма група пациенти, описана по-горе като група 7. Средната възраст на пациентите, включени в проучването е 37 години, с вариации от 18 до 60 години. За периода 01.01.2014 до 31.12.2014 год. бяха изследвани 449 мъже за наличие на инфекция с урогенитални микоплазми в семенна течност и уретрален секрет по два метода – културелен и PCR. На същите пациенти бе извършен и ДНК-фрагментационен анализ на сперматозоиди, както и стандартен семенен анализ. Сравнени са две подгрупи – с наличие и без данни за инфекция с урогенитални микоплазми.

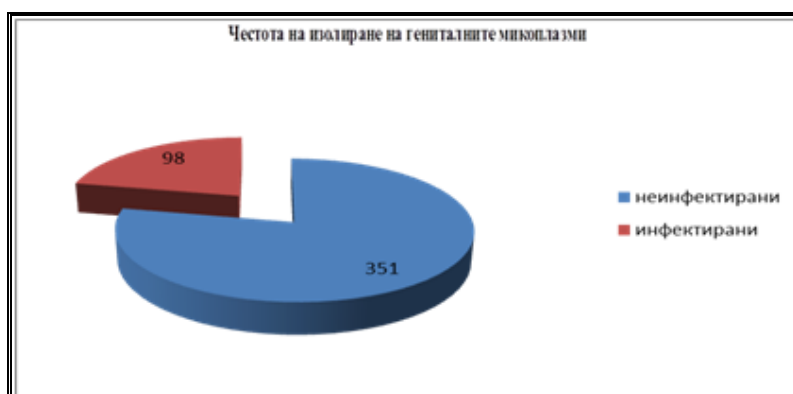
Чрез културелен метод са изследвани 327 пациенти от група 7, като е установена инфекция с *U. urealyticum* при 17.7%, *M. genitalium* - 0%, *M. Hominis* - 0%. *Ureaplasma* и *Mycoplasma* – 0.31%. Чрез полимеразно-верижна реакция (PCR) са изследвани 131 пациенти от група 7, като е установена инфекция с *U. urealyticum* при 30.5%, *M. genitalium* – 1.5%, *M. Hominis* – 0.8% *Ureaplasma* и *Mycoplasma* – 1.5%. Данните са преставени в табл. 13

Табл. 13. Инфектираност на пациентите от група 7 с урогенитални микоплазми

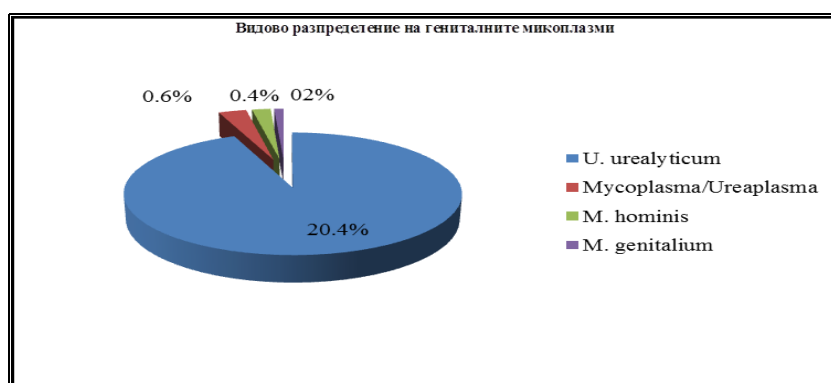
Метод	Културелен		PCR	
	N	%	N	%
Общ брой	327		131	
<i>U. urealyticum</i>	58	17.7%	40	30.5%
<i>M. genitalium</i>			2	1.5%
<i>M. hominis</i>			1	0.8%
<i>Ureaplasma Mycoplasma</i>	1	0.31%	2	1.5%

По отношение стандартните параметри от семенния анализ, се установиха следните резултати за подвижност група а+б: средна стойност за прогресивна подвижност за група (а+б) 41.42% (SD±11) за неинфектираната група; средна стойност за прогресивна подвижност за група (а+б) 35.6% (SD±12.62) за инфектираната група. При анализ на спермалните параметри, статистически значима разлика се установи само по отношение подвижността между двете групи (p<0.001).

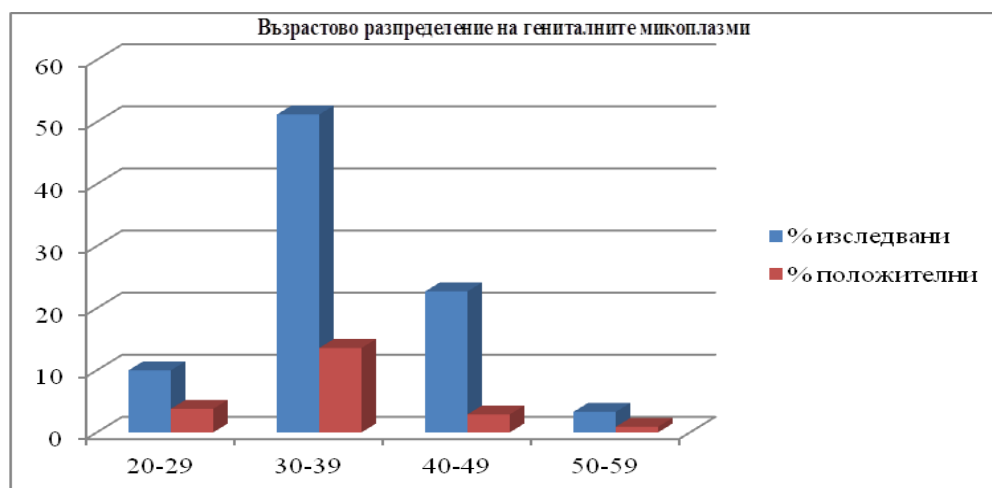
По отношение ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоиди се установиха следните резултати, изразени като средна стойност за DFI: в групата на инфектираните пациенти DFI% е 17.04 (SD±10.49%), а в групата на неинфектираните - DFI е 16.67% (SD±10.49). При анализ на данните, не се установи статистически значима разлика между двете групи



Фиг. 6. Честота на изолиране на генитални микоплазми в група 7 пациенти.



Фиг. 7. Честота на изолиране на генитални микоплазми в група 7 пациенти по причинители.



Фиг. 8. Възрастовото разпределение на инфекцията с генитални микоплазми в група 7.

По отношение разпределението по възраст на инфекцията, се получиха следните данни: 20-28 г. - инфектирани 3.8%; 30-39 г. – инфектирани 13.6%; 40-49 г. – инфектирани 2.9%; 50-59 г. – инфектирани 0.9%. Данните са представени на фиг. 8.

По отношение честотата на разпределение на инфекциите, сумарно за двата метода, при група 7 пациенти, се получи следните данни, изразени графично на фиг. 6 и фиг. 7. Общ брой неинфектирани – 351, инфектирани 98, от които: *U. urealyticum* - 20.4%, *Ureaplasma* + *Mycoplasma* - 0.6%, *M. hominis* – 0.4%, *M. genitalium* - 0.2%.

IV.5.4. Резултати от определяне влиянието на замразяването на сперматозоиди (криоконсервация) върху спермалните параметри и ДНК-фрагментационния индекс

IV.5.4.1. Резултати от определяне влиянието на замразяването на сперматозоиди (криоконсервация) върху спермалните параметри

Изследвани са проби от 30 пациента със стерилитет, провеждали регулярни опити за постигане на бременност, при непротектирани полови контакти повече от година. От пациентите 24 са с нормозооспермия (концентрация/ ml $>15 \cdot 10^6$) и 6 са с олигозооспермия (лека степен, 10-15 000 000/ml). В зависимост от подвижността на сперматозоидите, 22 пациенти са с нормална подвижност (за група a+b $>32\%$) и 8 са с астенозооспермия (a+b $< 32\%$). Стандартните спермални параметри и DFI на пробите са изследвани преди обработване, след обработване преди замразяването, след размразяването и 1 час престой след размразяване. Резултатите са представени в табл. 14.

Табл. 14. Средни стойности на получените резултати за изследваните спермални параметри и DFI в едни и същи спермални проби, преди и след замразяване.

Параметри	Необработена проба	Обработена проба, преди замразяване	Обработена проба, след размразяване	Обработена проба, 1 ч престой след размразяване
Пациенти (n)	30	30	30	*
сперматозоиди / ml	54 046 666	26 826 667	26 826 667	*
Подвижност по групи: a+b%	39.04	71.3	50.25	*
c%	26.11	17.35	21.29	*
d%	34.99	11.61	28.59	*
DFI %	18.43	*	14.91	19.94

*Не е провеждано изследване

От получените резултати е видно, че прогресивната подвижност, отразена чрез сбора на групите a+b% е значително по-висока при пробите, преминали през двоен плътностен градиент в сравнение с необработените, свежи проби. Преминаването през плътностния гел премахва незрелите, непрогресивно подвижни сперматозоиди, както и мъртвите, и други видове клетки, намиращи се в еякулата, като по този начин, се отделят зрелите клетки, които са с ключово значение за успеваемостта на процедурите в репродуктивните клиники (IUI, IVF). Резултатите потвърждават хипотезата, че обработването на сперматозоидите по метода двоен плътностен градиент води до селекция на прогресивно подвижните сперматозоиди от семенната течност.

Делът на прогресивно подвижните клетки при обработена, размразена семенна проба е по-малък, в сравнение от този на обработената свежа и по-голям, в сравнение с необработената проба. Дори при отпадането на част от прогресивно подвижните сперматозоиди след размразяване, общият брой a+b остава по-голям, когато пробата е обработена чрез двоен плътностен градиент в сравнение със свежите, необработени проби. Тези данни подкрепят хипотезата, че в следствие на предварителната обработка, се постига селекция на зрели, качествени сперматозоиди с висока подвижност, което повишава способността им да проникнат и оплодят яйцеклетката.

След размразяване на пробата, бе определена както подвижността на сперматозоидите, така и т.н. фактор на преживяемост на сперматозоидите (Crypto survival Factor – CSF):

$$\text{CSF} = \frac{\% \text{ Подвижни сперматозоиди след размразяване}}{\% \text{ Подвижни сперматозоиди преди замразяване}} \times 100$$

% Подвижни сперматозоиди преди замразяване

Стандартният процент на преживяемост след размразяване трябва да е над 50%. При нашето проучване, полученият CSF е следният:

$$\text{CSF} = \frac{\% 1507,5}{2139} \times 100 = 70.5 \%$$

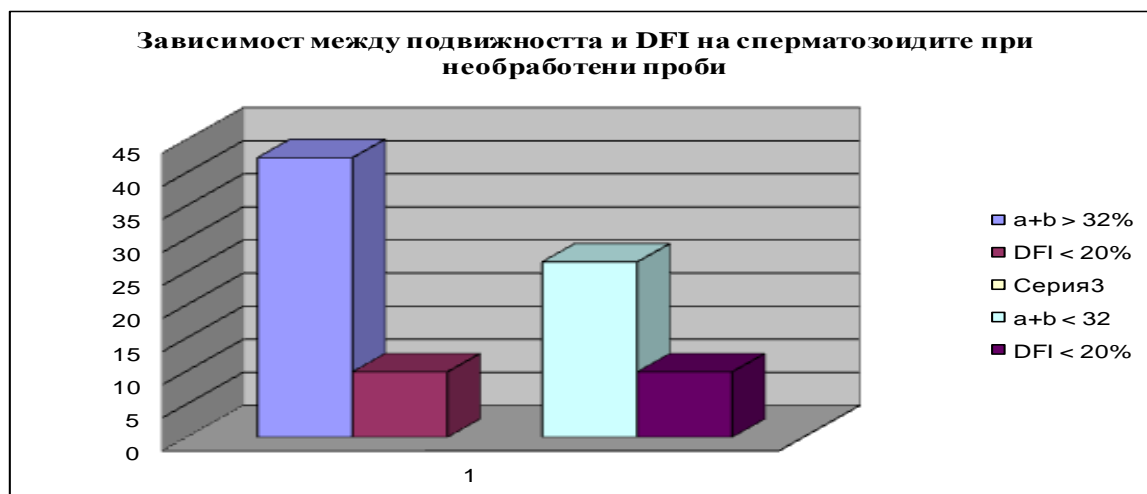
Тези данни показват, че използваният метод на обработка, преди замразяване и използваният метод на криоконсервация постигат висок процент преживяемост на сперматозоиди след размразяване.

IV.5.4.2. Резултати от определяне влиянието на замразяването на сперматозоиди (криоконсервация) върху ДНК-фрагментационния индекс

Изчислените средни стойности от резултатите, получени за DFI (табл. 20) показват, че при размразени, необработени проби сперматозоиди, измерената ДНК фрагментация е по-висока в сравнение с тази на обработени, размразени проби. Данните доказват, че проби, приготвени с двойноплътностен градиент, са по-устойчиви при замразяване, от необработените.

Резултатите за DFI % при обработени проби, инкубирани при 37°C за 1 ч. след размразяването им, показва покачване, в сравнение с обработени проби, изследвани веднага след размразяване. Данните показват, че използваният метод, има положителен ефект върху качеството на спермалната ДНК, ако веднага след размразяване, бъде измерен DFI% чрез флоуцитометрия. Ако обработената проба бъде инкубирана след размразяване, това резултира във влошаване качеството на спермалната ДНК, изразено чрез увеличаване на ДНК фрагментационния индекс, като наблюдаваните стойности са по-високи и от необработени размразени проби.

Пациентите, участвали в проучването, бяха разделени на 2 групи: с нормален процент прогресивна подвижност ($a+b > 32\%$) и такива с астенозооспермия ($a+b < 32\%$) за необработените проби (групите бяха класифицирани според 5-та редакция на “*WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*”) и бе установена статистически значима зависимост между групата с нормална подвижност и тази с $DFI < 20\%$ при необработени проби ($p < 0.05$) (Фиг. 9). Пробите с нормозооспермия и с процент прогресивна подвижност, по-висок от 32%, за групата $a+b$, необработени, показват $DFI < 20\%$ след размразяване.



Фиг. 9. Зависимост между средните стойности на прогресивна подвижност $< 32\%$ или $> 32\%$ и $DFI < 20\%$ при необработени проби.

Това дава основание да се изкаже хипотезата, че сперматозоидите с висок процент прогресивна подвижност, използвани в процедури по АРТ, са с ниски нива на ДНК фрагментация, което от своя страна ще допринесе за по-голяма успеваемост на оплодителния процес и ембрионалното развитие. Не се установи зависимост

между групите с непрогресивна подвижност (група "с") и повишаване на ДНК фрагментационния индекс, както и между концентрацията на сперматозоидите и ДНК фрагментационния индекс.

IV.6. Резултати от проучване предсказваща стойност на ДНК-фрагментационния индекс по отношение изхода на бременността след АРТ процедури

IV.6.1. Резултати от проучване предсказващата стойност на ДНК-фрагментационния индекс по отношение изхода на бременността след ICSI процедури

IV.6.1.1. Резултати от проучване предсказваща стойност на ДНК-фрагментационния индекс по отношение изхода на бременността след автоложна ICSI процедура

Проучването беше направено при група 8 пациенти (416 двойки, извършили автоложна ICSI процедура в клиниката). По отношение характеристиките на групата, бяха получени следните данни:

1/ Средната възраст на мъжете в групата е 35.16 години (SD±5.7), а на жените е 34.42 години (SD±4,24);

2/ В групата се регистрирани 189 положителни кръвни теста за бременност и 227 отрицателни теста на 14^{-я} ден след ЕТ, като успеваемостта на процедурите в цялата група съответно е 45.4%.

3/ Разпределението по възраст на жените е както следва: до 29 год. - 61 пациентки (14.70%), от които бременност е регистрирана при 52.46%; 30-35 год. - 179 жени, успеваемост на процедурата - 48%; 35-40 год. – 122 жени, с регистрирана бременност при 46.7%; последната група включва 53 жени над 40 години, с 13% успеваемост на ICSI процедурата. Резултатите са представени в табл. 15.

Табл. 15. Успеваемост на автоложни ICSI процедури, разпределена в зависимост от възрастта на пациентките

ICSI процедури Жени (n=416)	Бременност	Отрицателен тест
До 29 години	52.46%	47.54%
30-35 години	48.04%	51.96%
36-40 години	46.72%	53.28%
Над 40 години	24.53%	75.47%

По отношение на загубите на плода, след регистрирана бременност на 14^{-я} ден след ЕТ, се получиха следните резултати:

1/ При 122 жени се реализира клинична бременност, завършила с раждане (67.4%).

2/ Загуби на плода се установиха при 59 пациентки, от които 24 биохимични бременности (13.2%) и 35 мисед аборта (19.4%). Резултатите са представени в табл. 16.

Табл. 16. Разпределение в зависимост от възрастта на жените на възможния изход на бременността (клинична бременност, биохимична бременност, спонтанен аборт) след автоложни ICSI процедури

Възраст	Клинична бременност	Биохимична бременност	Спонтанен аборт	Разпределение по възраст
До 29 години	66.67%	16.6%	16.7%	16.57%
30-35 години	71.08%	14.5%	14.6%	45.86%
36-40 години	63.64%	9.0%	27.2%	30.39%
>40 години	61.5%	15.3%	23%	13%
Общо:	67.4%	13.26%	19.34%	100%

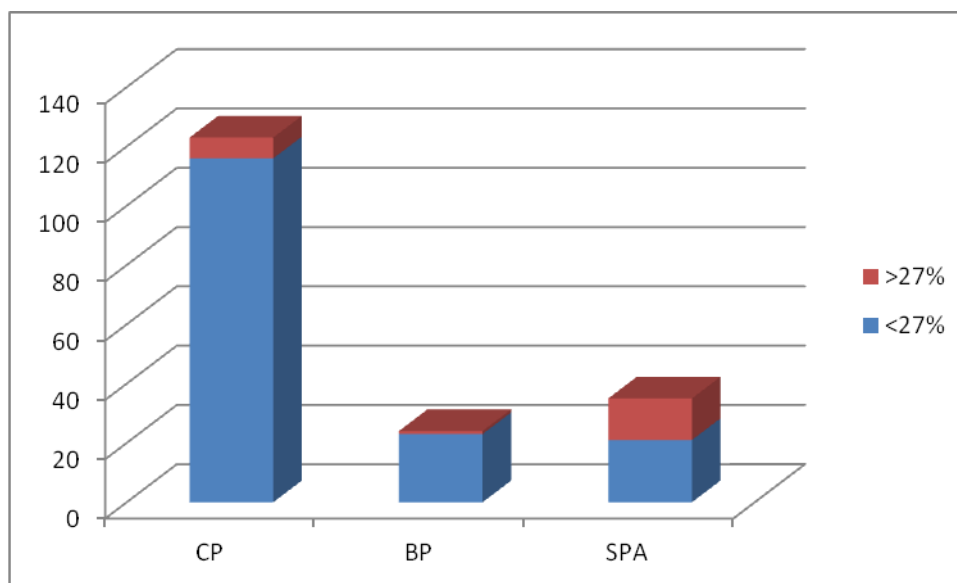
По отношение на DFI, пациентите бяха разделени на две групи, спрямо cut-off стойност 27%. При сравняване на данните не бе установена статистически значима връзка между стойността на DFI и регистрирането на бременност на 14 ден след ЕТ/ ICSI ($\chi^2=0.55$. $p>0.05$).

В групата с DFI под 27% попадат 362 мъже (87.02%), като при 167 от партньорките е регистрирана бременност, а при 195 теста е отрицателен. В групата с DFI>27% са включени 54 мъже (13%), като при партньорките се установява бременност при 22 от тях (OR= 1.25). Резултатите са представени в табл. 17.

Табл. 17. DFI% и изход на ICSI процедура при група 8 пациенти

DFI%	Бременни	Небременни
<27%	40.14%	46.88%
>27%	5.29%	7.69%

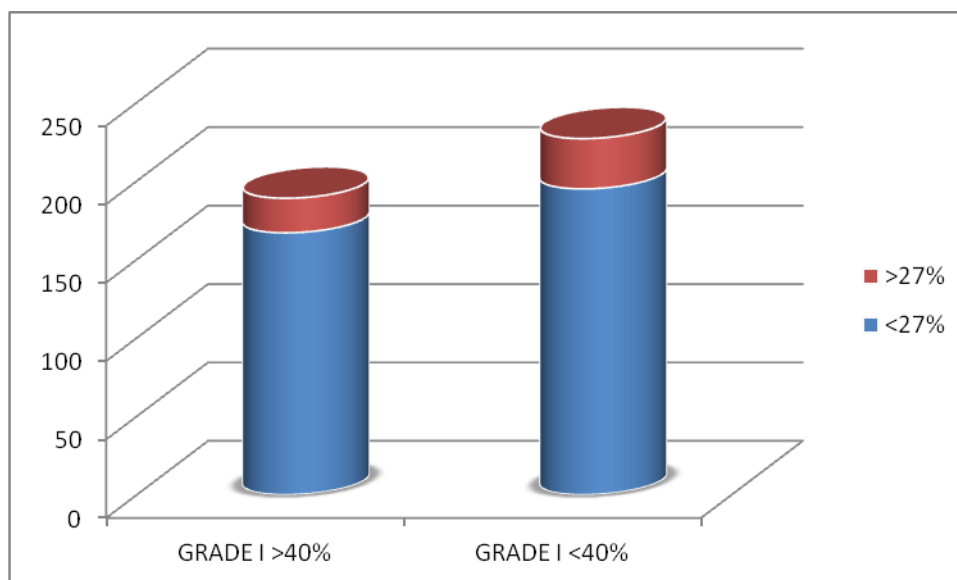
В групата с DFI до 27%, при партньорките са регистрирани 116 бременности, 23 биохимични бременности и 21 мисед аборта. В групата с DFI над 27% има 7 клинични бременности, 1 биохимична и 14 мисед аборта. Групата с DFI над 27% включва 22 бременности при партньорките, от които 7 завършват с раждане, 1 е биохимична и 14 завършват със спонтанен аборт. В тази група се установи статистически значима отрицателна корелация между DFI и развитието на бременността след ICSI ($\chi^2=31.81$, $r=0.39$, $p<0.0001$). Резултатите са представени на фиг. 10.



Фиг.10 DFI% и загуби на плода след ICSI при група 8 пациенти

С увеличаване на DFI нараства и броят на загубите на плода (вкл. биохимични бременности и спонтанни аборти) при $OR=5.65$. В групата с $DFI<27$ се установяват 27% загуби на плода (14% BP 13% SPA), докато в групите с $DFI>27$ се установява 2 пъти по-висока честота (63%).

По отношение взаимовръзките между DFI и качеството на ембрионите след ICSI, за показател беше приет процента на бластоцисти с *grade I* качество при ET, с норма над 40%. По този показател се сформираха 2 групи, съответно над и под тази стойност, и при съотнасяне към DFI на бащините сперматозоиди, не бе установена статистически значима разлика, но показателите показват близко до нормата разпределение. От ембрионите 87.23% са получени след оплождане от сперматозоиди с нормална ДНК-фрагментация, от тях 64.6% са *grade I>40%*, и съответно 35.4% са с ниско качество. Подобно е и разпределението и в групата с $DFI>27\%$ - 54.7% са получените ембриони с добро качество, и 45% са с *grade I<40%* ($OR=1.51$). Резултатите са представени на фиг. 11.



Фиг.11 DFI% и качество на ембриони *grade I* при група 8 пациенти

При разпределение на показателите от ембриоскоринга спрямо възрастта на жената, се получиха следните данни: най-голям процент качествени ембриони се наблюдават във възрастовата група под 29 години (72.13%), между 30-35 години са 65.4%, от 36-40 години са 57.02% и над 40 години са 63.3%. При това разпределение на признаци бе намерена слаба зависимост между възрастта на жената и качеството на ембрионите ($\chi^2=4,64$, $r=0.10$, $p<0.05$). В случая $p=0.03$, което показва, че не възрастта, а причината за стерилитет и проведената стимулация най-вероятно определят качеството на получените след ICSI ембриони. В тази група пациентки, след проведената стимулация по дълъг протокол, са получени средно 13.5 яйцеклетки/жена ($SD\pm 9.8$). Разпределението на броя яйцеклетки по възраст на жените е представено в табл. 18.

Таблица 18: Разпределение по брой яйцеклетки спрямо възрастта на жените в група 8

ICSI Години	Брой яйцеклетки			Общо за групата
	до 10	10 до 15	>15	
До 29 г.	6.28%	1.21%	7.25%	14.73%
30-35г.	18.85	10.63%	13,74%	43.24%
36-40 г.	14.2%	5.50%	9.42%	29.23%
>40 г.	8.94%	1.45%	2.42%	12.80%
Общо за групата	48.31%	18.84%	32.82%	100%

Установи се статистически значима връзка между броя на получените след стимулация яйцеклетки и възрастта на жената ($\chi^2=22.8$, $p<0,001$). При изследване връзката между брой на яйцеклетките/жена спрямо регистрирането на бременност се установи статистически значима корелация ($\chi^2=10.62$, $p<0,05$). Даните са представени в табл. 19.

Таблица 19. Разпределение на броя яйцеклетки спрямо изхода на ICSI процедурата при група 8 пациенти:

ICSI Яйцеклетки/ жена	Положителен тест	Отрицателен тест	Общо за групата
До 10	18.07%	30.12%	48.19%
10-15	9.40%	9.40%	18.80%
>15	18.07%	14.94%	33.01%
Общо	45.54%	54.46%	100%

По отношение спермалните параметри, бяха приети референтните граници на WHO-2010. По отношение спермалната морфология се обособиха 2 групи – от 0 до 3%, и над 4%, а по отношение прогресивната подвижност на сперматозоидите се оформят 2 групи: под и над 32%. TZI е с cut off от 1.60, и по този показател, пациентите се разделят съответно на две подгрупи. При съпоставяне между спермалната морфология и DFI, се установи статистически значима корелация ($\chi^2=12.19$ $p<0.05$). Данните са представени в табл. 19.

Табл. 20. Разпределение на спермалната морфология спрямо DFI% при група 8 пациенти

Морфология DFI%, ICSI	>4%	0-3%	Общо за групата
До 26.9%	41.35%	45.67%	87.02%
>27%	2.88%	10.10%	12.98%
Общо	45.23%	54.77%	100%

Не се установи статистически значима зависимост между спермалната морфология и регистрирането на бременност при ICSI процедура ($\chi^2=0.46$ $p>0,05$), нито със настъпването на спонтанни аборти след АРТ ($\chi^2=2.47$, $p>0.05$).

По отношение спермалната подвижност се установи слаба статистическа зависимост спрямо DFI на сперматозоидите ($\chi^2=2.47$, $p>0,05$). Данните са представени в табл. 21.

Таблица 21. Зависимост между прогресивна подвижност на сперматозоиди и DFI% при група 8 пациенти

Подвижност <i>a+v</i> DFI%, ICSI	>32%	<32%	Общо за групата
До 26.9%	72.36%	14.66%	87.02%
>27%	9.38%	3.61%	12.98%
Общо	81.73%	18.27%	100%

По отношение на TZI, пациентите бяха разделени в две подгрупи, спрямо cut-off стойността от 1.6, препоръчана от WHO. При сравняване данните за TZI и успеваемостта на ICSI процедурите, не се установи статистически значима зависимост (OR=0.349) между двете групи.

При сравняване данните на фертилни и инфертилни пациенти спрямо ICSI процедурата, се получиха следните резултати, представени в табл. 22:

Табл. 22. Разпределение на характеристики при фертилни и инфертилни пациенти от група 8

ICSI	Фертилни мъже (n=189)	Инфертилни мъже (n=227)
Мъже	35.3 (SD±5.7)	36.2 (SD±5.82)
Партньорки	33.7 (SD±3.8)	35 (SD±4.48)
Концентрация (10 ⁶ /ml)	55.79 (SD±3.4)	48.25(SD±3.6)
Подвижност (a+v%)	39.9 (SD±9.6)	41.2 (SD±11.6)
Нормални форми %	3.7 (SD±2.0)	3.4 (SD±2.4)
DFI%	14.18 (SD±8.9)	15.85 (SD±10.2)
HDS%	10.7 (SD±6.62)	11.4 (SD±5.08)
Grade I blastocysts%	68 (SD±2.48)	66.4 (SD±27)

При сравняване данните за двете групи мъже, не се установи статистически значима разлика по отношение възрастта на мъжете и техните партньорки в двете групи. Не се установи и статистически значима разлика по отношение стандартните

спермални параметри, освен слаби зависимости при прогресивната подвижност ($p=0.04$) и спермалната морфология ($p=0.03$).

Установи се слаба статистически значима корелация между DFI и регистрирането на бременност след ICSI процедура ($p<0.05$, $p=0.04$). Единствено статистически значима зависимост се установи по отношение качеството на получените бластоцисти (*grade I*), получени при двете групи. ($p<0.01$, $\chi^2=222$, $r=0.03$)

IV.6.1.2. Резултати от проучване предсказваща стойност на ДНК-фрагментационния индекс по отношение изхода на бременността след ICSI процедури с донорски яйцеклетки

Описани са данни от 39 хетероложни ICSI процедури (с донорски яйцеклетки). Средната възраст на реципиентките в групата е 41 години ($SD\pm 5.22$). Успеваемостта на процедурите е 55.2%, след което се регистрират 66.7% клинични бременности и 33.3% спонтанни аборти и биохимични бременности.

По отношение взаимодействието между DFI на сперматозоидите и изхода на хетероложните ICSI процедури, не се установи значима разлика между групите ($\chi^2=1.41$, $p>0.05$). Данните са представени в табл. 23.

Табл. 23. Зависимост между DFI% и изхода на хетероложни ICSI процедури при група 8 пациенти.

ICSI донорски яйцеклетки DFI	Положителен тест	Отрицателен тест	Общо за Групата
До 26.9%	47.3%	42.11%	89.47%
Над 27%	7.89%	2.33%	10.53%
Общо за групата	55.26%	44.74%	100%

По отношение взаимодействието между DFI и развитието на бременността след хетероложна ICSI процедура се установи слаба статистическа зависимост ($\chi^2=3.49$, $p<0.05$, $p=0.03$, $r=0.25$). Данните са представени в табл. 24.

Табл. 24. Зависимост между DFI% и изхода на бременността при хетероложни ICSI процедури при група 8 пациенти.

ICSI донорски яйцеклетки DFI	Клинична бременност	Загуби на плода (BP+SPA)	Общо за Групата
До 26.9%	62.96%	25.93%	88.8%
Над 27%	3.70%	7.41%	11.1%
Общо за групата	66.67%	33.3%	100%

При изследване влиянието на спермалните параметри върху изхода на ICSI процедурите с донорски яйцеклетки не се установи статистически значима зависимост между спермалната морфология и изхода на хетероложните ICSI процедури ($\chi^2=0,50$; $p>0,05$). Данните са представени в табл. 25.

Табл. 25. Зависимост между спермална морфология и изход на хетероложни ICSI процедури при група 8 пациенти.

ICSI донорски яйцеклетки Морфология	(+) тест	(-) тест	Общо за групата
<4%	36.84 %	26.32%	63.16%
> 4%	18.42 %	18.42%	36.84%
Общо за групата	55.26%	44.74%	100%

Не се установи зависимост и между спермалната морфология и загубите на плода след ICSI с донорски яйцеклетки ($\chi^2=0.15$; $p>0.05$). Данните са представени в табл. 26.

Табл. 26. Зависимост между спермална морфология и изхода на бременността след хетероложни ICSI процедури при група 8 пациенти

ICSI донорски яйцеклетки Морфология	Клинична бременност	SPA	Общо за групата
<4 %	40.74 %	18.52%	59.26%
>4 %	25.93 %	14.81%	40.74%
Общо за групата	66.37%	33.33%	100%

При сравняване стойностите между спермалната морфология и DFI не се установи статистическа значима връзка ($\chi^2=2.28$; $p>0.05$).

При изследване качеството на бластоцистите преди ембриотрансфер, оценени като *grade I* по Gardner and Schoolcraft (1999) се установи, че съществува статистически значима зависимост както с DFI ($\chi^2=7.80$, $p<0.05$), така и със спермалната морфология ($\chi^2=6.14$; $p<0.05$). Няма статистически значима разлика между процента качествени бластоцисти *grade I* между автоложните (67.38%SD±26.47) и хетероложните процедури (59.9%SD±26.47) ($p>0.05$).

IV.6.1.3. Резултати от проучване предсказващата стойност на ДНК-фрагментационния индекс по отношение изхода на бременността след IUI

Данните касаят 48 двойки, извършили автоложна IUI и 28 жени, извършили хетероинсеминация (с донорски сперматозоиди), общо данни за 76 процедури.

Установиха се следните характеристики за групата:

1/ Средната възраст на мъжете, участвали в IUI е 31.08 години (SD±7.1), а при жените 32.6 години (SD±5.5), най-възрастната пациентка е на 43 години.

2/ Общо успеваемостта на процедурата е 18.18%, за донорските IUI (n=28) е 17.8%, при средна възраст на пациентките 33.17 години (SD±6.2).

3/ По отношение разпределението на успешните IUI възрастови групи жени, се наблюдаваха следните резултати, представени в табл. 27:

Табл. 27. Разпределение по възраст на жените и изхода на IUI процедури при група 8 пациенти

IUI Възраст	Положителен тест	Отрицателен тест	Общо за групата
До 29 години	6.50 %	23.38%	29.87%
30-35 години	2.60 %	27.27%	29.87%
36-40 години	9.09%	28.57%	37.6%
>40 години	0.0%	2.60%	2.60%
Общо за групата	18.18%	81.72%	100%

По отношение разпределението на спонтанните аборти след IUI процедура, не се установи зависимост от възрастта на пациентката ($\chi^2=1.31$, $p>0.05$). В групата, от общо 14 положителни теста, регистрирани на 14^{-я} ден след процедурата, са

наблюдавани 9 клинични бременности, завършили с раждане (64.29%) и при 5 жени е регистриран спонтанен аборт (35.71%)

При изследване връзката между DFI на сперматозоидите и изхода на IUI (клинична бременност, аборт) се установиха значими корелации и в двете направления. По отношение връзката между DFI и изхода на IUI процедурата, се установи значима връзка ($\chi^2=6,29$, $p<0.05$). Данните са представени в табл. 28.

Табл. 28. Зависимост между DFI и изхода на IUI процедура при група 8 пациенти

IUI DFI	Положителен тест	Отрицателен тест	Общо за групата
До 26.9%	78.57 %	98.83%	93.51%
Над 27%	28.43 %	3.17%	6.49%
Общо за групата	18.18%	81.82%	100%

По отношение връзката между DFI и развитието на бременността след IUI, се установи статистически значима корелация ($\chi^2=6.87$; $p<0.05$). Данните са представени в табл. 29.

Табл. 29. Зависимост между DFI и изхода на бременността след IUI процедура при група 8 пациенти

IUI DFI	Клинична бременност	SPA	Общо за групата
До 26.9%	64.29%	14.29%	78.57%
Над 27%	0.0%	24.43%	21.43%
Общо за групата	64.29%	35.71%	100%

Резултатите за спермални параметри по отношение обработването на пробите по метода двойно-плътностен градиент са представени в табл. 30.

Табл. 30. Резултати за спермални параметри по отношение обработването на пробите за IUI при пациенти група 8

IUI	Преди обработване	След обработване
Години		
Мъже	31.8 (SD±7.1)	-
Партньорки	32.6 (SD±5.5)	-
Концентрация (10 ⁶ /мл)	55.8 (SD±2.8)	48.62 (SD±2.9)
Подвижност (а+в%)	28.10 (SD±1.2)	31.32 (SD±1.5)
DFI%	10.23 (SD±7.4)	-
HDS%	3.15 (SD±3.6)	-

При разделяне на пациентите по отношение изхода на процедурата (фертилни/инфертилни спрямо IUI) се получиха следните данни, представени в табл. 31:

Табл. 31. Характеристики на групите фертилни/инфертилни пациенти по отношение изхода на IUI процедура при група 8 пациенти

IUI	Фертилни	Инфертилни
Години		
Мъже	31.5 (SD±7.3)	31.07 (SD±7.2)
Партньорки	31.67 (SD±7.3)	33.01 (SD±7.2)
Концентрация (10 ⁶ /ml)	62.85 (SD±24.4)	27.17 (SD±1.59)
Подвижност (а+в%)	55.79 (SD±18.7)	52.33 (SD±2.0)
DFI%	8.86 (SD±7.14)	15.09 (SD±9.04)
HDS%	5.85 (SD±3.01)	9.65 (SD±9.04)

Установи се статистически значима разлика между двете групи по отношение на концентрацията на сперматозоиди/мл ($p < 0.01$, K-test=2.07). DFI в групата на фертилните мъже е значимо по-нисък от този при инфертилните мъже ($p < 0.05$, w-test=153) HDS в групата на фертилните мъже също е значимо по-нисък спрямо инфертилните ($p < 0.05$, r=0.5, k test=1.51). При сравняване на DFI между групата на двойките с клинична бременност и тези със спонтанни аборти се установи статистически значима разлика ($p < 0.05$, w=46, k test=1.58).

VI. Изводи

На основата на нашето проучване върху прогнозната стойност на ДНК-фрагментационния тест при АРТ, бихме могли да направим следните изводи:

1. DFI е идентифициран като фактор, предсказващ изхода на АРТ. DFI може да се използва като самостоятелен предиктор за бременност и раждане при двойки, извършващи IUI.
2. ICSI процедурата е в състояние да заобиколи увреждането на спермалния хроматин. Високият DFI не изключва успешно лечение на стерилитета чрез ICSI, но биохимичните бременности и спонтанните аборти ще са с два пъти по-висока честота при ICSI процедури, ако $DFI > 27\%$.
3. За трите категории АРТ - IUI, автоложни и хетероложни ICSI процедури, проучването ни показва, че спермални проби с $DFI > 27\%$ се свързват с по-малък процент бластоцисти с grade I качество и повишен риск от ранна загуба на бременността.
4. Доказана бе отрицателна корелация между нивото на DFI и нивото на TAC в семенната плазма.
5. По отношение на спермалните параметри, не бе намерена зависимост между морфологията, концентрацията, подвижността и изхода на ICSI процедурата, но спермалната морфология и прогресивната подвижност корелират с DFI. Това дава основание да се твърди, че изборът на морфологично нормален и функционално качествен сперматозоид повишава шанса за успешна бременност.
6. Единствено изборът на сперматозоиди с ниска ДНК фрагментация осигурява висок процент качествени бластоцисти и успешно протичане на бременността, що се касае до фактори, зависими от бащиния геном.

В заключение, потвърждаваме предиктивната стойност на DFI като самостоятелен и независим фактор за успеха на IUI, даващ възможност и за приложение на антиоксидантната терапия при лечението на мъжкия стерилитет. Нашите данни обаче, дават повод за безпокойство по отношение на ICSI. Процедурата е в състояние да „заобиколи“ увреждането на спермалния хроматин и да се реализира бременност, т.е. бариерите на естествения подбор се преодоляват. Този *bypass* обаче увеличава риска от ранна загуба на плода, а по литературни данни, сперматозоиди с увредена ДНК могат да бъдат отговорни за фетална патология, като стерилитет при *de novo* възникнала микроделеция на У-хромозомата, онкологични заболявания и отпечатване на заболявания, които не могат да се проявят, докато детето не достигне пубертет или зряла възраст. Най-новите епидемиологични проучвания съобщават за 2-кратно по-висок риск за малформации при кърмачета и появата на синдроми, свързани с грешки в отпечатването след ICSI.

Считаме, че подобни проучвания, както и рутинното въвеждане на DFI тестовете в клиниките по репродуктивна медицина, са изключително важни за успеха на АРТ процедурите и реализираните от тях бременности, както и за здравето на деца, родени след АРТ.

VII. Приноси на дисертационния труд

1. За първи път са изработени референтни стойности за стандартните спермални показатели за българската популация мъже спрямо WHO 2010 год.
2. За първи път са изработени референтни стойности на DFI за здрави български мъже и постигане на бременност по естествен път.
3. За първи път е установено, че ДНК фрагментацията на сперматозоидите е асоциирана с маркер за ранна апоптоза и ТАС, което идентифицира групите пациенти, подходящи за терапия с антиоксиданти.
4. Потвърдена е предиктивната стойност на DFI като самостоятелен показател за бременност и раждане при двойки, планиращи IUI и бременност по естествен път.
5. Потвърдена е критичната роля на DFI по отношение развитието на бременността след ICSI, поради доказаната възможност увредата на спермалния хроматин да бъде заобиколена чрез този АРТ метод.
6. Чрез проучването на DFI при АРТ е потвърдена ролята на бащиния геном за качеството на ембрионите и успеха на бременността, независимо от начина, по който е реализирана.
7. Проучването затвърждава ролята на DFI като задължителен и надежден фактор, в диагностичния и терапевтичен алгоритъм на АРТ, с цел повишаване на успеваемостта на процедурите.
8. Повишаване успеваемостта на АРТ процедурите в клиника по асистирана репродукция, чрез рутинното прилагане на ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоиди като диагностичен критерий при селекция на пациентите.

Научни публикации и съобщения, свързани с дисертационния труд:

1. Публикации в България

1. Rilcheva V, Ayvazova N, Ilieva L, Lukanov Tz, Konova E. Assessment of frozen-thawed human sperm using an annexin V binding and DNA integrity test by flow cytometry. Proceedings of the Fourth Workshop "Experimental Models and Methods in Biomedical Research" Sofia, Bulgaria. Eds: D. Kadyisky and R. Alexandrova. 27-29 Май 2013 (ISSN 1314-9091)

2. Rilcheva V, Ayvazova N, Ilieva L, Pachkova S, Konova E. Sperm DNA Integrity test and ART outcome. Journal of Biomedical Clinical Research, vol.8. 2015. Приета за печат.

2. Публикации в чужбина

1. Rilcheva V, Ayvazova N., Martinov D., Ivanov P., Konova E. Assessment of the impact of oxidative stress on frozen seminal plasma in fertile and infertile men by examining the total antioxidant capacity. Human Reproduction, vol. 30, supp 1, 2015.

2. Roussev R, Ayvazova N, Rilcheva V, Konova E. Bloking factors in serum from recurrent pregnancy loss patient and from imminent abortes were detected by modified complement – dependent cytotoxicity test. Journal of Reproductive Immunology (2012) 5-130

3. Roussev R, Ayvazova N, Rilcheva V, Konova E. Soluble HLA-G as predictive marker for human embryo implantation potential -. Journal of Reproductive Immunology (94, 2012) 5-130, Tissue Antigens, vol. 80, number 1, July 2012

4. Rilcheva V; Ayvazova N; Georgieva M; Konova E; Christova I. Reference values of semen parameters and DNA-fragmentation test in healthy male patients of MC CIRM "St. Elisaveta" Pleven. American Journal of Reproductive Immunology, Special Issue, May 2012, Vol. 67, issue supplement s1

5. Ayvazova N; Georgieva M; Rilcheva V, Roussev R; Konova E. Positive values of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies (IgG and IgA) and the possible effect on the embryo quality and assisted reproduction outcome. American Journal of Reproductive Immunology, Special Issue, May 2012, Vol. 67, issue supplement s1

6. Rilcheva V, Pachkova S, Konova E. Does a genital mycoplasmas infection increase sperm DNA fragmentation in infertile men? American Journal of Reproductive Immunology 73, supp.1(2015) 23-49

3. Участие в научни проекти:

Финансирани от МУ-Плевен

№29/2012 - Разработване на нов метод за подбор на човешки сперматозоиди, свързващи Annexin V чрез флоуцитометрично изследване

№ 23/2012 - Проследяване на носителството на вродени тромбофилични фактори при жени без репродуктивни неудачи и съдови заболявания

№ 17/2013 - Проучване влиянието на имунологични и генетични фактори върху имплантацията на ембриони след асистирана репродукция

№ 3/2013 - Проучване на влиянието на оксидантният стрес върху свежа и размразена проба еякулат при фертилни и инфертилни мъже чрез изследване на общ антиоксидантен капацитет.

№ 20/2014 - Влияние на хормонални фактори върху активността на НК клетките при жени с репродуктивни процеси

Научни съобщения:

В чужбина:

1. Rilcheva V, Ayvazova N, Martinov D, Ivanov C, Konova E. Assessment of the impact of oxidative stress on frozen seminal plasma in fertile and infertile men by examining the total antioxidant capacity - 31 annual meeting of ESHRE, Lisbon, Portugal, 14-17.06. 2015

1. Rilcheva V; Ayvazova N; Georgieva M ; Konova E. Sperm DNA fragmentation test and ICSI outcome - X anniversary medical scientific conference for students and young doctors, Pleven 17-20 October 2012

2. Рилчева В, Айвазова Н, Георгиева М, Конова Е. Референтни стойности на спермалните показатели и ДНК – фрагментационен тест при мъже, пациенти на МЦ КИРМ „Св. Елисавета” Плевен. Пета национална конференция на акушер-гинеколозите от доболничната помощ 24-26.02.2012

3. Стефанов С, Конова Е, Айвазова Н, Рилчева В, Мартинова Ж, Христова П, Христова И. Лапароскопска овариална електрофенестрация – влияние върху изхода на АРТ Плевенски дни на репродуктивната медицина. 27.04 – 29.04. 2012

4. Рилчева В, Айвазова Н, Мартинов Д, Илиева Л, Конова Е. Предсказваща стойност на изследването структурата на спермалният хроматин чрез ДНК-фрагментационният тест на сперматозоидите по отношение изхода на ICSI процедурите. Десета Национална конференция по медицинска биология, МУ-Плевен, 25-27.10.2013, Плевен

5. Илиева Л, Айвазова Н, В. Рилчева, Д. Мартинов, Е. Конова Проучване влиянието на криоконсервацията по отношение подвижността и ДНК фрагментационния индекс на сперматозоиди при свежа и необработена семенна

проба. IV Работна среща "Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания", 27-29 май 2013 г. ИЕМПАМ – БАН

6. Rilcheva V, Ayvazova N, Martinov D, Konova E. Oral therapy with Lycopene can prevent human sperm DNA damage. IV национален конгрес по фармакология, 17-19.10.2014, постер
7. Рилчева В, Айвазова Н, Мартинов Д, Иванов Ц, Конова Е. Проучване влиянието на оксидативния стрес при замразени семинални плазми на фертилни и инфертилни мъже чрез изследване на общ антиоксидантен капацитет. Четвърти национален конгрес по Имунология, 2 – 5. 10.2014, Златни пясъци
8. Пачкова С, Рилчева В, Конова Е. Влияние на гениталните микоплазми върху спермалните показатели и ДНК-фрагментационния индекс на сперматозоидите. 13 национален конгрес по клинична микробиология и инфекции, НДК, София, 16-18.04.2015г., постер

3. Научни форуми в България с международно участие:

1. Ayvazova N; Georgieva M; Rilcheva V; Roussev R, Konova E. Positive values of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies (IgG and IgA) and the possible effect on the embryo quality and assisted reproduction outcome. 13 international symposium for immunology of reproduction Varna, 22-24.06.2012
2. Rilcheva V; Ayvazova N; Georgieva M; Konova E; Christova P. Reference values of semen parameters and DNA - fragmentation test in healthy male patients of MC CIRM "St. Elisaveta" Pleven. 13 international symposium for immunology of reproduction Varna, 22-24.06.2012
3. Rilcheva V; Ayvazova N; Georgieva M; Konova E. Sperm DNA fragmentation test and ICSI outcome. X anniversary medical scientific conference for students and young doctors, Pleven 17-20 October 2012
4. Ayvazova N; Georgieva M; Rilcheva V; Roussev R; Konova E. Positive values of anti-*Chlamydia trachomatis* antibodies (IgG and IgA) and the possible effect on the embryo quality and assisted reproduction outcome. 13 international symposium for immunology of reproduction Varna, 22-24.06.2012
5. Rilcheva V, Ayvazova N; Georgieva M; Konova E, Christova P. Reference values of semen parameters and DNA - fragmentation test in healthy male patients of MC CIRM "St. Elisaveta" Pleven. 13 international symposium for immunology of reproduction Varna, 22-24.06.2012
6. Rilcheva V, Ayvazova N; Georgieva M; Konova E. Sperm DNA fragmentation test and ICSI outcome. X anniversary medical scientific conference for students and young doctors Pleven 17-20 October 2012
7. Rilcheva V; Ayvazova N; Georgieva M; Konova E; Christova P. Reference value of semen parameters and DNA fragmentation test in healthy male patients of MC CIRM

Pleven. Юбилейна научна конференция „30 години висше медицинско образование в Стара Загора”21-23 май 2012

8. Ayvazova N, Ivanov Ts, Rilcheva V, Konova E, Rashev P: Difference in MMP-2 but not in MMP-9 activity in seminal plasma of normozoospermic and teratozoospermic semen samples. Second scientific students conference Trakia University, St. Zagora 19-21.10.2012
9. Rilcheva V, Ayvazova N, Ilieva L, Lukanov Tz, Konova E. Assessment of frozen-thawed human sperm using an Annexin V binding and DNA integrity test by flow cytometry and teratozoospermia test. XI medical scientific conference for students and young doctors, Plevan 16-19 October 2013, Plevan

Приложение 1. Резултати от определяне референтните стойности за спермална концентрация, подвижност, морфология, тератозооспермален индекс и ДНК-фрагментационен индекс за група 1 пациенти.

ГРАНИЦИ НА НОРМАЛНИ И. ГРУПИ	% на случаите в нормалната група	БР.СПЕРМ/мл N= 71(64); X=49176400; SD=28641300	a + b% N= 68;X=44,055 SD=13,25	DFI% N= 47;X=0,098 4; SD=0,0453	Морфология N= 61;X=0,045; SD=0,022	TZI N= 51;X=1,33; SD=0,13
СИЛНО ПОД НОРМА						
ПОД X-2SD ПОД P5	2,3 3	Под 8106200 Под 6000000	Под 17,555 Под 21,6	Под 0,0078 Под 0,0385	Под 0,001 Под 0,01	Под 1,07 Под 1,1
СРЕДНО ПОД НОРМА						
X-SD ÷ X- 2SD P5÷P10	13,6 7	8106200 ÷ 20535100 6000000 ÷ 15500000	17,555 ÷ 30,805 21,6 ÷ 30,9	0,0078 ÷ 0,0531 0,0385 ÷ 0,0 465	0,001 ÷ 0,023 0,01 ÷ 0,02	1,07 ÷ 1,2 1,1 ÷ 1,16
СЛАБО ПОД НОРМА						
X-0,5SD ÷ X- SD P10÷P25	15 15	20535100 ÷ 34855750 15500000 ÷ 26500000	30,805 ÷ 37,43 30,9 ÷ 36,35	0,0531 ÷ 0,0758 0,0465 ÷ 0,0 63	0,023 ÷ 0,034 0,02 ÷ 0,03	1,2 ÷ 1,265 1,16 ÷ 1,22
НОРМА						
X- 0,5SD ÷ X+0,5 SD P25÷P75	38,2 50	34855750 ÷ 63497050 26500000 ÷ 70500000	37,43 ÷ 50,68 36,35 ÷ 52,55	0,058 ÷ 0,121 0,063 ÷ 0,132	0,034 ÷ 0,056 0,03 ÷ 0,06	1,265 ÷ 1,395 1,22 ÷ 1,44
СЛАБО НАД НОРМА						
X+0,5SD ÷ X+SD P75÷P90	15 15	63497050 ÷ 77817700 70500000 ÷ 865 00000	50,68 ÷ 57,305 52,55 ÷ 58,6	0,121 ÷ 0,144 0,132 ÷ 0,173	0,056 ÷ 0,067 0,06 ÷ 0,08	1,395 ÷ 1,46 1,44 ÷ 1,5
СРЕДНО НАД НОРМА						
			57,305 ÷ 70,555 58,6 ÷ 61,1	0,144 ÷ 0,189 0,173 ÷ 0,185	0,067 ÷ 0,089 0,08 ÷ 0,09	1,46 ÷ 1,59 1,5 ÷ 1,55
X+SD ÷ X+2SD P90÷P95	13,6 7					
СИЛНО НАД НОРМА						
НАД X+2SD НАД P95	2,3 2	Над 106459000 Над 95500000	Над 70,555 Над 61,1	Над 0,189 Над 0,185	Над 0,089 Над 0,09	Над 1,59 Над 1,55