МОРФОЛОГИЧНИ ОСОБЕНОСТИ НА ЯЙЦЕКЛЕТКИТЕ ПРИ ПАЦИЕНТКИ С НАМАЛЕН ОВАРИАЛЕН РЕЗЕРВ: ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ 72 ЦИКЪЛА НА ЛЕЧЕНИЕ ЧРЕЗ IVF/ICSI

Гергана Ингилизова^{1,4}, Добри Иванов², Емил Ковачев³, Иван Костов^{1,3},
Стефан Иванов³

¹Първа специализирана акушеро-гинекологична болница за активно лечение
„Св. София” - София

²Катедра „Биология”, Медицински университет - Варна

³Катедра „Акушерство и гинекология”, Медицински университет – Варна

⁴Многопрофилна болница за активно лечение „Вита” - София

MORPHOLOGICAL FEATURES OF OOCYTES IN PATIENTS WITH LOW OVARIAN RESERVE: STUDY OF 72 IVF/ ICSI TREATMENT CYCLES

Gergana Ingilizova^{1,4}, Dobri Ivanov², Emil Kovachev³, Ivan Kostov^{1,3}, Stephan Ivanov³

¹First Specialized Obstetrics and Gynecology Hospital for Active Treatment St. Sofia - Sofia

²Department of Biology, Medical University of Varna

³Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Varna

⁴Vita Multiprofile Hospital for Active Treatment - Sofia

РЕЗЮМЕ

Настоящото проучване представя резултатите от ретроспективно и проспективно проследяване на морфологичните особености на яйцеклетките в зависимост от възрастта и хормоналния статус при пациентки с намален яйчников резерв.

Материали и методи: Изследването включва 3038 яйцеклетки, произхождащи от 419 пациентки, участвали в програма за лечение на безплодието чрез оплождане *in vitro* от м. февруари 2011 г. до м. февруари 2014 г., 72 от които с намален овариален резерв и 347 – с нормален.

Резултати: Пациентките с намален и нормален овариален резерв показаха статистически значима разлика по отношение на морфологията на яйцеклетките. При пациентките с незадоволителен овариален отговор се наблюдава умерена статистически значима отрицателна линейна зависимост между възрастта и морфологията на яйцеклетките. Резултатите ни показват тенденция към намаляване на процента яйцеклетки с нормална морфология и увеличаване на процентите яйцеклетки с дефекти с понижаване на стойностите на антимюлеровия

ABSTRACT

The current study presents the results of a retrospective and prospective observation of the morphological features of the oocytes according to the age and the hormonal status in patients with low ovarian reserve.

Materials and methods: The study includes 3038 oocytes, derived from 419 patients involved in an infertility treatment program through *in vitro* fertilization from February 2011 to February 2014, 72 of them with low ovarian reserve and 347 – with normal.

Results: The patients with low and normal ovarian reserve showed statistically significant difference regarding oocytes morphology. In low responders a moderate statistically significant negative linear dependence between age and oocytes morphology is observed. Our results show a tendency to decrease the percentage of oocytes with normal morphology and increase the percentages of oocytes with abnormalities with decreasing of the anti mullerian hormone (AMH) values and increasing of the basal follicle stimulating hormone (FSH) values.

Conclusion: The morphological features of oocytes in patients with low ovarian reserve get worse

хормон (АМН) и повишаване на базалните стойности на фоликулостимулиращия хормон (FSH).

Заключение: Морфологичните характеристики на яйцеклетките при пациентките с намален яйчников резерв се влошават видимо при възраст над 35 години и стойности на АМН $\leq 0,2$ ng/ml и FSH > 15 mIU/ml.

Ключови думи: намален яйчников резерв, яйцеклетки, качество, морфология, ин витро оплождане, възраст, АМН, FSH

ВЪВЕДЕНИЕ

Намаленият овариален резерв е състояние на понижена фертилност, характеризиращо се с нисък брой на оставащите в яйчниците овоцити и намалена овогенеза в резултат на възрастови, конгенитални, ятрогенни или идиопатични фактори. При пациентките с редуциран яйчников резерв асистираните репродуктивни технологии (АРТ) често се оказват единственият метод за постигане на бременност. Резултатите от процедурите на лечение чрез ин витро оплождане при тези пациентки обаче се свързват с малък брой фоликули след проведена КОХ, малък брой аспирирани овоцити с по-лоши морфологични белези, по-нисък процент на оплождане, по-малко получени ембриони с по-лошо качество и съответно по-нисък процент постигнати клинични бременности.

Известно е, че резултатът от проведено лечение чрез ин витро процедура силно се влияе както от броя, така и от качеството на получените яйцеклетки. Маркери на овариалния резерв като базални стойности на серумните нива на FSH, АМН и брой на базалните антрални фоликули са показатели с добра прогностична стойност по отношение на броя яйцеклетки, които биха могли да бъдат получени при КОХ с гонадотропинови препарати (2), но до момента липсва задълбочено проучване по отношение на влиянието им върху морфологията на аспирираните яйцеклетки. Данните в литературата сочат, че по-висока прогностична стойност по отношение на качеството на овоцитите има възрастта на жената. Счита се, че понижаването на процента постигнати бременности с напредването на възрастта е резултат от намаляване на овариалния резерв и влошаване на морфологичните характеристики на яйцеклетките (5). Именно поради тази причина при млади жени с намален яйчников резерв би могъл да се постигне задоволителен процент

obviously after age 35 and values of AMH $\leq 0,2$ ng/ml and FSH > 15 mIU/ml.

Ключови думи: low ovarian reserve, oocytes, quality, morphology, in vitro fertilization, age, AMH, FSH

бременности в резултат на АРТ въпреки ограничения брой аспирирани овоцити (6).

Според морфологичните критерии човешките овоцити се класифицират като: 1) нормални; 2) овоцити с екстрацитоплазмени аномалии; 3) овоцити с интрацитоплазмени аномалии; 4) овоцити с аномалии на размера и формата; и 5) овоцити с множество аномалии (3). Редица проучвания разкриват, че ембриони, получени от нормални овоцити, имат най-добър потенциал за имплантация в матката (1,4).

Проучването ни изследва морфологията на яйцеклетките при пациентки с незадоволителен яйчников отговор и влиянието, което оказват върху нея факторите възраст и хормонален статус – в частност базални стойности на АМН и FSH.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Настоящото проучване представя резултатите от проведен ретроспективен и проспективен анализ върху 3038 яйцеклетки, произхождащи от общо 419 пациентки, участвали в програма за лечение на безплодието чрез оплождане ин витро от м. февруари 2011 г. до м. февруари 2014 г. във „Вита ин витро център“, МБАЛ „Вита“ ЕООД – гр. София, Сектор по асистирана репродукция, ПСАГБАЛ „Св. София“ ЕАД – гр. София, и Медицински център по асистирана репродукция „Варна“ ООД, СБАГАЛ-Варна-ЕООД – гр. Варна. От тях 184 яйцеклетки са получени в резултат на 72 цикъла на лечение чрез IVF/ICSI при пациентки с намален яйчников резерв. Към тази група са причислени пациентките, отговарящи на минимум два от следните критерии: нива на FSH на трети ден от МЦ > 10 mIU/ml, нива на АМН $< 1,2$ ng/ml, брой на антралните фоликули ≤ 7 , възраст ≥ 40 г., предишен незадоволителен отговор на КОХ. Като контролна група за сравнение на качеството са анализирани 2854 яйцеклетки, произхождащи от 347 пациентки с нормален отго-

вор на КОХ. Всички яйцеклетки са подложени на микроскопски анализ за определяне на зрелостта и оценка на качеството според морфологичните им характеристики.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В зависимост от зрелостта 147 яйцеклетки или 79,89% от тези на пациентките с незадоволителен яйчников отговор бяха класифицирани като МП, което е статистически значимо по-нисък процент ($p < 0,05$) от този при пациентките с нормален яйчников отговор – 87% (2483 овоцита). Статистически значима разлика ($p < 0,05$) между двете групи пациентки беше установена и по отношение на процентите на дегенеративните яйцеклетки – 13,04% и 7,64% за изследваната и контролната група съответно. Т.е. изследването ни показва, че с изчерпване на овариалния резерв намалява процентът на аспирираните зрели яйцеклетки за сметка на дегенеративните.

Табл. 1 представя статистическите данни за яйцеклетките в двете групи пациентки в зависимост от техните морфологични особености. За сравнение на данните е използван тестът на Ман-Уитни. Вижда се, че двете групи се различават статистически значимо освен по отношение на процентите яйцеклетки с нормална морфология (40,14% за изследваната и 75,8% за контролната група), също и по отношение на процентите яйцеклетки с дефекти на ZP и PVS, с наличие на грануляция и вакуоли в цитоплазмата, с аномалии на размера и с множество аномалии.

В зависимост от възрастта на пациентките сформирахме пет възрастови групи: 1 – възраст на пациентките < 30 години; 2 – от 31 до 35 години; 3 – от 36 до 40 години; 4 – от 41 до 45 години и

5 – над 45 години. Всички пациентки с нормален яйчников отговор попадат в първите три възрастови групи, поради спецификата на изследваната патология и приетите от нас критерии за групов принадлежност. Така при сравнение на процентите на нормалните яйцеклетки по възрастови групи, където е приложимо, статистически значима разлика се установи само във втората ($p < 0,05$) и третата ($p < 0,0001$) възрастова група с по-високи проценти на нормалните яйцеклетки при пациентките от контролната група (Табл. 2). При сравнение на честотата на проява на дефектите по възрастови групи най-много статистически значими различия ($p < 0,05$) бяха установени в третата възрастова група – по отношение на ZP, PVS, грануляция, вакуоли, размер и множество дефекти, с преобладаване на дефектите за всички морфологични характеристики при пациентките с намален яйчников резерв. Единствената наблюдавана статистически значима разлика във втората възрастова група е по отношение на процентите на вакуолизация на яйцеклетките с по-висок процент отново в изследваната група. При пациентките на възраст под 30 години не се установиха статистически значими разлики както по отношение на процентите яйцеклетки с нормална морфология, така и по отношение на честотата на проява на аномалии в морфологията, което означава, че качеството на яйцеклетките при млади жени не се влияе от състоянието на овариалния резерв. Получените от нас резултати показват, че различията между двете групи се увеличават все по-осезаемо с напредването на възрастта на пациентките.

При пациентките с незадоволителен яйчников отговор се наблюдава тенденция към нама-

Таблица 1. Морфологични особености на яйцеклетките при пациентките с намален и нормален яйчников резерв (*n = брой яйцеклетки на стадий МП)

Група		Яйцеклетки с									
		нормална морфология	екстрацитоплазмени аномалии			интрацитоплазмени аномалии			аномалии на формата	аномалии на размера	множество дефекти
			ZP	PBI	PVS	Грануляция	Вакуоли	Рефрактилни телца			
low responders n* = 147	n	59	37	22	38	45	10	11	5	2	50
	%	40,14	25,17	14,97	25,85	30,61	6,8	7,48	3,4	1,36	34,01
normal responders n* = 2483	n	1882	127	297	266	340	42	120	60	4	311
	%	75,8	5,11	11,96	10,71	13,69	1,69	4,83	2,42	0,16	12,53
p-стойност		0,000	0,000	0,278	0,000	0,015	0,000	0,151	0,455	0,003	0,000

Таблица 2. Процентни дялове на яйцеклетките с нормална морфология по възрастови групи

	1 < 30		p-value	2 31 - 35		p-value	3 36 - 40		p-value	4 41 - 45	5 > 45
	група	група		група	група		група	група		група	група
% яйцеклетки с нормална морфология	normal responders n=87	low responders n=3		normal responders n=200	low responders n=16		normal responders n=60	low responders n=31		low responders n=19	low responders n=3
	80.2	85.7	0.72	75.5	57.8	0.007	69.6	32.8	0.000	22.6	0.0

ляване на процентите яйцеклетки с нормална морфология с възрастта – от 85,71% при пациентките под 30-годишна възраст до 0% при тези на възраст над 45 години. Корелационният анализ и непараметричният коефициент на корелация на Спирман ($r=-0,471$) установиха наличие на умерена отрицателна линейна зависимост. Коефициентът е статистически значим ($p<0,001$), което ни дава право да твърдим, че с увеличаване на възрастта, процентът на яйцеклетките с нормална морфология при пациентките с намален овариален резерв намалява. В зависимост от честотата на проява на морфологичните аномалии в отделните възрастови групи при тези пациентки установихме, че най-силно влияещи се от възрастта морфологични характеристики и дефекти са тези, касаещи ZP и PVS, гранулацията на цитоплазмата, формата на яйцеклетките, както и проявата на множество различни дефекти в една яйцеклетка. Анализирайки получените статистически резултати бихме могли да отбележим, че при пациентките с незадоволителен овариален отговор морфологията на овоцитите се влошава чувствително след 35-годишна възраст.

По отношение на серумните нива на АМН резултатите ни показват тенденция към намаляване на процента яйцеклетки с нормална морфология (27,78% при стойности на АМН $\leq 0,2$ ng/ml и 60% при стойности от 0,9 до 1,0 ng/ml, $p<0,05$) и повишаване на процентите на яйцеклетките с дефекти на ZP, с гранулирана цитоплазма и на тези с множество дефекти с понижаване на стойностите на хормона, което говори за влошаване на качеството на яйцеклетките успоредно с изчерпване на яйчниковия резерв и по-конкретно при стойности $\leq 0,2$ ng/ml.

При анализа на влиянието на базалните стойности на FSH върху морфологичните особености на яйцеклетките тестът на Колмогоров-Смирнов установи статистически значима разлика ($p<0,05$) в процентите яйцеклетки с нормална морфология между подгрупата пациентки със стойности на FSH от 10,1 до 12,5 mIU/ml – 54,84%, и тази със стойности над 15 mIU/ml – 29,27%. По отношение на честотата на проява на аномалии в морфологията на яйцеклетките при пациентките с намален яйчников резерв всички установени статистически значими различия (по отношение на дефектите на ZP, вакуолизацията на цитоплазмата, както и комплексната проява на множество дефекти) също бяха при сравнение с подгрупата пациентки със стойности на FSH > 15 mIU/ml, което показва, че с покачването на стойностите на FSH над тази критична стойност качеството

и морфологията на яйцеклетките чувствително се влошават.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведеното от нас проучване върху 72 цикъла на лечение чрез ин витро оплождане при пациентки с намален яйчников резерв установи статистически значима ($p < 0,05$) отрицателна линейна зависимост между фактора възраст и процента яйцеклетки с нормална морфология, като чувствително влошаване на качеството на яйцеклетките се наблюдава след 35-годишна възраст. Резултатите ни потвърждават литературните данни, според които качеството на яйцеклетките при млади жени не се влияе от състоянието на овариалния резерв. По отношение на влиянието на хормоналния статус, в частност серумните нива на АМН и FSH, върху морфологията на яйцеклетките при тези пациентки не беше установена статистически значима зависимост, но установихме критичните стойности, при преминаването на които осезаемо се влошават морфологичните характеристики на яйцеклетките, а именно – ниво на АМН $< 0,2 \text{ ng/ml}$ и на FSH $> 15 \text{ mIU/ml}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod Biomed Online. 2006; 12:608–15.
2. Bancsi, LFJMM., FJM. Broekmans, MJC. Eijkemans, FH. Jong, JDF. Habbema, ER. Velde. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. Fertil Steril, 77, 2002, No 2, 328–336.
3. Lasienė K, Vitkus A, Valančiūtė A, Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality. Medicina (Kaunas) 2009; 45(7) - <http://medicina.kmu.lt>.
4. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997;12:1267–70.
5. Thum, MY., HI. Abdalla, D. Taylor. Relationship between women's age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment. Fertil Steril, 90, 2008, No 2, 315–321.

6. Toner JP. Ovarian reserve, female age and the chance for successful pregnancy. Minerva Ginecol, 2003, No 55, 399–406.

Адрес за кореспонденция:

Гергана Ингилизова
ПСАГБАЛ „Св. София“
ул. „Михалаки Ташев“ № 2
гр. София 1330
тел.: 0887204480
e-mail: ingilizova@mail.bg