

АВТОРСКА СПРАВКА ЗА ПРИНОСНИЯ ХАРАКТЕР НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ

Таня Владимирова Милачич

На вниманието на членовете на научното жури са представени общо 22 научни труда, публикувани в периода 2010 – 2020г. Те включват 18 научни публикации в пълен текст в специализирани научни списания (6 от тях са в чуждестранни списания с импакт фактор; 1 - в българско научно списание с импакт фактор или общо 7 публикации с импакт фактор; 2 – в чуждестранни списания без импакт фактор; 9 – в български списания без импакт фактор); 2 научни публикации като глави от книги на чуждестранни издателства; 1 научна публикация като глава от книга в българско издателство и един монографичен труд; 52 научни доклада и постери от участия в научни форуми. Общият импакт фактор на публикациите е 16.644. Общият брой на регистрираните цитирания в база данни Scopus, без явни и скрити автоцитирания, е 138; h-index = 6.

В представените по конкурса научни трудове се очертават следните тематични направления:

- *Генетични аспекти на женския и мъжкия инфертилитет*
- *Инвазивни и неинвазивни методи при предимплантационна генетична диагностика (ПГД), предимплантационен и прекоңцепционен генетичен скрининг (ПГС)*
- *Подходи и методи при подбора и селекцията на човешки гамети с максимални характеристики*
- *Повишаване на ефективността на използваните в асистиранията репродукция техники*

1. Генетични аспекти на женския и мъжкия инфертилитет

Повечето заболявания, свързани с инфертилитет при човека имат неизяснена етиология. Доказана е генетична компонента само при малка част (под 10%) от случаите на стерилитет. Тази област не е дълбоко проучена и все още липсва панел от специфични диагностични генетични тестове, които да могат да се прилагат рутинно при дадена двойка.

Направен е изводът, че прилагането на нови технологии като сравнителна геномна хибридизация (aCGH), цялостно екзомно и геномно секвениране (WES, WGS) биха позволили идентификацията на допълнителни гени, които имат значителна роля при неуспеха в репродукцията; [3, 5]

В рутинната практиката е въведено изследването на кариотипа при мъже с азооспермия, при тежки отклонения в морфологията или тежък мъжки фактор (под 10 млн/мл обща концентрация или под 10-15млн/мл тотален брой прогресивно подвижни сперматозоиди) поради по-висока честота на отклонения (транслокации) и други аберации в кариотипа; [3, 5, 14]

Приложено е рутинно тестването за AZF1 микроделеции (при обща концентрация под 5 млн/мл), т.к. се оказва че този ген има най-висока прогностична стойност за шансът да бъдат открити сперматозоиди, ако има делеция в AZF1a и AZF1b този шанс е по-висок и много нисък, ако делецията се намира AZF1c региона; [14]

Мутации в андрогенния рецептор (AR) са открити в много малък процент (под 1%) от пациентите с тежко увреждане на сперматогенезата; [3, 5]

Направена е връзка между тежкия мъжки фактор и аномалиите в получените ембриони; [1, 12]

Доказана е фамилна обремененост, идваща от кариотипа на мъжа от двойката, като се откриват комплексни хромозомни реаранжирания при хромозоми 1, 8 и 11 и са описани репродуктивните последствия от този проблем, водещи до последващ хромотрипсис на по-голяма част от ембрионите след прилагане на редица опити на асистирана репродуктивна технология; [8]

Изследваните от нас спонтанни аборти (с неизяснена етиология) след асистирана репродукция показват, в 70% от случаите се откриват геномни аномалии - като бройни аберации са открити в 90%, а в останалите – структурни аномалии в хромозомите; [9]

Резултати от анализ на абортивен материал показват, че след прилагането на асистирана репродукция, последната не дава отражение върху увеличаване на хромозомните аномалии във фетусите в сравнение с бременности, които са настъпили по естествен път. [1]

Достигна се до извода, че липсата на повишен процент хромозомните аномалии във фетусите след асистирана репродукция се дължи на самоелиминиране, липса на имплантация на анеуплоидните ембриони или много ранен спонтанен аборт; [1, 9]

2. Инвазивни и неинвазивни методи при предимплантационна генетична диагностика (ПГД), предимплантационен и преконцепционен генетичен скрининг (ПГС)

Предимплантационната генетична диагностика (ПГД) е диагностичен тест за установяване на ембриони, които са носители на конкретно заболяване и с висок риск от предаването на специфична аномалия в потомството. Ембрионите, които не са носители на заболяването могат да бъдат трансферирани в матката. Методът е допълнение към ин витро процедурата и се използва при различни показания (напр. при напреднала майчина възраст, повтаряеми имплантационни неуспехи, спонтанни аборти), като се прилага както при двойки с нормален кариотип, така и при такива с диагностицирани отклонения в хромозомния набор. Приложението на ПГС нараства през последното десетилетие, но все още липсват рандомизирани контролирани проучвания, които да докажат ефективността на метода.

Вид нова неагресивна алтернатива на класическите ПГС и ПГД е неинвазивния хромозомен скрининг (NICS). Неговото предимство е в липсата на биопсия на ембрионите и секвениране на свободната ДНК, отделяна по време на развитието от предимплантационните ембриони в културалната среда или в бластоцела; [1, 4, 12]

За целите на ПГД и ПГС е оптимизирана и въведена рутинно биопсията на предимплантационни ембриони в различни етапи от развитието им; [1, 2, 12]

Осъществен е критичен анализ и съпоставка на данните от приложението на новите неинвазивни методи и техники в областта на предимплантационната диагностика (в т.ч. протеомиката, ембрионална time-lapse микроскопия и микрофлуидната технология) с резултатите от инвазивните предимплантационни генетични анализи; [1, 4, 12]

Установено е, че най-подходящият стадий за извършване на биопсия е ден пети от развитието на ембриона (бластоцистен стадий), тъй като осигурява най-висока степен на достоверност и надеждност на анализа в съчетание с максимална преживяемост на ембрионите; [1, 2, 10]

За първи път в България, е въведен нов метод за неинвазивен скрининг чрез изследването на свободна фетална ДНК от венозна майчината кръв в периода от 9 до 14

г.с. като се извършва селективен хромозомен скрининг по хромозоми 13, 18, 21, X и Y; [6]

Въведен е неинвазивен метод, заместващ биопсията (бластоцентеза) посредством лазерен колапс и микроманипулационна техника – като предшественик на предимплантационния генетичен скрининг на човешките ембриони; [1, 4]

За първи път в нашата страна бе проведена успешно трофктодермална биопсия и последваща предимплантационна диагностика за болестта бета-таласемия в комбинация с HLA-типизиране, в следствие на което се роди здрав доносен плод. [2]

3. Подходи и методи при подбора и селекцията на човешки гамети с максимални характеристики

– *IMSI и качество на човешките предимплантационни ембриони*

Анализът на органелната морфология на подвижни сперматозоиди (MSOME) дава допълнителни възможности при селекцията на сперматозоиди с цел приложението им при IMSI. Чрез него могат точно и прецизно да се анализират най-добрите по структура сперматозоиди в реално време в зависимост от тяхната подвижност, морфологични и органелни характеристики.

Проведено е проучване, целящо да оцени ефективността на IMSI метода в сравнение с класическата ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) техника. Установено е, че приложението на MSOME/IMSI води до повишаване качеството на получените най-добри ембриони (top quality embryos) на ден трети, както и процента на постигнатите клинични бременности, независимо от деня на ембриотрансфер; [4, 14, 16]

– *Влияние на пентоксифилин върху сперматозоидите при тежка хипо- или а-кинеза*

Пентоксифилинът (ПФ) се използва предимно за увеличаване на крайния брой на подвижните сперматозоиди за целите на АРТ, но в някои случаи се прилага успешно и при обработката на сперматозоиди, получени след аспириране от епидидимиса (PESA) или биопсия на тестиса (TESE), които са малко на брой, с намалена или липсваща подвижност.

Наши изследвания установиха повишен процент на постигнатите бременности в случаите, в които се използва пентоксифилин, като може да се заключи, че обработката с ПФ е подходяща при пациенти с вероятна некрозооспермия, криптозооспермия, тежка олиго-астено-зооспермия, много тежка или тотална липса на подвижност; [14, 22]

4. Повишаване на ефективността на използваните в асистираната репродукция техники

– *Прилагане на асистирана овоцитна активация при пациенти с фертилизационни неуспехи*

Изследван е ефектът на асистираната овоцитна активация с Calcium ionophore като един от възможните механизми за постигане на по-добри резултати в случаите с история на нисък процент или липсващо оплождане. Отчетени са сходни проценти на оплождане и качество на ембрионите с и без прилагане на калциев йонофор. Въпреки това, използването на калциева активация води до съществено редуциране броя на отменените ембриотрансфери, както и до значително повишаване на процента клинични бременности; [13, 21]

– ***Прилагане на асистиран хетчинг (АХ) с лазер при ембриотрансфер на размразени ембриони и изкуствен колапс (ИК) при витрификация***

Асистираният хетчинг (АХ) е процедура, при която изкуствено се изтънява или пробива втвърдената след криоконсервация *zona pellucida* на ембриона. Изкуственият колапс представлява премахване на течността от кухината на бластоциста, което може да се осъществи чрез два алтернативни подхода – с помощта на инжекционна пипета или с използване на лазерна система.

Проучванията ни върху практическото приложение на АХ потвърждават неговата ефективност, изразяваща се в увеличаване процента на клиничните бременности след трансфер на размразени ембриони на ден пети. Прилагането на изкуствен колапс (ИК) преди витрификация на ден 5 води до значително по-висок процент преживяемост на бластоцистите без значение от използвания подход (механичен или с лазер). На база на тези резултати ИК и АХ са утвърдени като рутинни и задължителни процедури от процеса на ембрионална криоконсервация. [10, 18]

– ***Връзка на соматометричните показатели с подвижността и скоростните параметри на движение на сперматозоидите***

Към известните причини за мъжкия инфертилитет могат да се причислят наднорменото тегло и затлъстяването поради епидемичното им разпространение и свързаните с тях заболявания с негативно отражение върху сперматогенезата. Проведено е проучване върху въздействието на прекомерното натрупване на мастна тъкан при мъжете върху прогресивната подвижност и скоростите на движение на мъжките гамети. Установи се, че процентът нормокинетични сперматозоиди и кинетичните параметри на движение на мъжките гамети са статистически сравними при хора със завишен и нормален индекс на телесната маса (ИТМ). Прогресивната подвижност на мъжките гамети обаче е сигнификантно по-висока при мъже с нормална талия, в сравнение с тези с наднормено тегло. Количеството на мастната тъкан около талията, независимо дали е в норма, или надвишава препоръчаната здравна норма, също не може да служи като самостоятелен индикатор за скоростните параметри на мъжките гамети. Може да се заключи, че соматометричните показатели не трябва да се коментират като единствена причина за нарушения в кинетиката на сперматозоидите; [14, 17]

– ***Избор на подходящ ден за ембриотрансфер***

Особена значимост за изхода от АРТ има селекцията на ембрионите и изборът на ден за ембриотрансфер. Установена е европейска и световна тенденция, това да става предимно на ден трети (осем-клетъчен стадий) или на ден пети (бластоцистен стадий). Въпреки че ембрионалната селекция на ден първи, втори, четвърти или шести все още не е рутинно навлязла в практиката, наши проучвания показват, че би могла да бъде опция, ако не е възможна друга алтернатива. Постигнати са средни нива на бременности от ЕТ на ден трети, по-високи на ден четвърти (стадий компактна морула), като най-висок процент е отчетен при ембриотрансфер на ден пети. Като основен недостатък за избора на ден четвърти за ембриотрансфер е отчетеният по-висок процент на многоплодните бременности; [1, 15]

– ***Подходи в случаи на неселктивен ембриотрансфер***

В част от IVF/ICSI циклите ембриоселекция е невъзможно да се осъществи поради получен малък брой ембриони (един или два). При тези случаи обикновено се трансферират разполагаемите ембриони без оглед на предполагаемото им качество и имплантационен потенциал. Липсата на един от основните похвати за постигане на по-високи нива на имплантация и бременност в един АРТ цикъл, а именно възможността за

ембриоселекция, поставя въпросът за оптимизиране на условията, които могат да доведат до повишаване на занижените прогностични перспективи за изхода от лечението. Проучванията ни в тази насока показват наличието на по-висок процент на имплантация и на постигнати клинични бременности при неселективен ембриотрансфер (ЕТ) на малък брой ембриони (до 2) на ден втори в сравнение с ден трети и ден пети. Изборът на ден втори за ЕТ се оказва най-перспективен и подходящ за пациенти с малък брой получени ембриони, тъй като отчетените резултати сочат по-добър изход от АРТ в тези случаи; [20]

– ***Оценка на ембрионите на ден втори при избора на деня за трансфер***

Ембриотрансферът на ден пети се счита за най-добрата опция при селекция на ембрионите, достигнали до стадий бластоцист, въпреки реалната възможност за спиране на ембрионалното развитие на по-ранен етап. Все още остават неясни причините за спирането или забавянето в развитието на ембрионите в ин-витро условия. В тази връзка е важен въпросът доколко качествените характеристики на ембрионите на ден втори могат да са определящ фактор при избора на деня за ЕТ.

Според данни от наше проучване, ако поне половината от получените ембриони на ден втори са с добро качество, възможността за постигане на клинична бременност е еднаква при жени до 34г. и при такива в по-напреднала репродуктивна възраст (35 – 40 г.) без значение от деня за ЕТ; [19]

– ***Оптимален брой на човешките яйцеклетки***

Извършено е проучване, целящо да установи оптималния изходен брой качествени яйцеклетки, осигуряващ максимална вероятност за постигане на бременност в рамките на един АРТ цикъл. Установено е, че при добиване на 15 овоцита, годни за оплождане, шансът за бременност надхвърля средното ниво и достига 37%, докато рискът от развитие на овариален хиперстимулационен синдром остава приемлив. Резултатите от изследването позволиха определянето и на средния оптимален брой витрифицирани автоложни (12.2) и донорски яйцеклетки (12.1), при който се отчитат най-висок процент клинична бременност и раждане; [7, 11]