



**Медицински университет - Варна
„Проф. Д-р Параскев Стоянов”**

**Факултет „Медицина”
Катедра „Медицинска генетика“**

Дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор” на тема:

**Цитогенетични находки при пациенти с
репродуктивна недостатъчност**

Мария Кирякова Цветкова
Биолог

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма „Генетика”

Научен ръководител:

Проф. д-р Людмила Ангелова, дм

Варна
2021

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	6
I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	8
I.1. Терминология и честота на Репродуктивни нарушения (РН)	8
I.1.1. Терминология	8
I.1.2. Честота	10
I.2. Репродуктивни нарушения – етиология	13
I.3. Конвенционални цитогенетични изследвания при пациенти с РН	16
I.3.1. Основни видове	16
I.3.2. Показания за насочване	19
I.3.3. Методи за конвенционален цитогенетичен анализ	20
I.3.4. Значение на конвенционалния цитогенетичен анализ при семейства с РН	21
I.3.4.1. При семейства с инфертилитет	21
I.3.4.2. При семейства с повтарящи се аборти	23
I.3.4.3. Комбинирани проучвания при семейства с инфертилитет и повтарящи се аборти	24
I.4. Хромозомен полиморфизъм при пациенти с РН	26
I.4.1. Терминология	26
I.4.2. Роля и клинично значение на хромозомните полиморфизми	27
I.4.2.1. Хромозомен полиморфизъм по хромозома 9	27
I.4.2.2. Хромозомен полиморфизъм по Y хромозома	30
I.4.2.4. Хромозомен полиморфизъм по хромозома 1 и хромозома 16	33
I.4.3. Обобщение на значението на хромозомните полиморфизми върху РН	33
I.5. Субтеломерни (субмикроскопски) хромозомни преустройства при семейства с РН	35
I.5.1. Основни понятия	35
I.5.2. Методи за откриване на субтеломерни преустройства	37
I.5.3. Значение на субтеломерните хромозомни преустройства при пациенти с РН	38
I.6. Обобщение на литературните данни	39
II. РАБОТНА ХИПОТЕЗА	41
II.1. Цел	42
II.2. Задачи	42
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	43
III.1. Материал	43

III.2. Методи	46
III.2.1. Документален метод - анализ на медицински досиета на пациентите	46
III.2.2. Лабораторни методи	47
III.2.2.1. Конвенционален цитогенетичен метод	47
III.2.2.2. Молекулярно-цитогенетичен метод - флуорисцентна ин ситу хибридизация за субтеломерни участъци	55
III.2.3. Статистически методи	57
III.2.4. Софтуерни програми	58
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	59
IV.1. Обща характеристика на пациентите - брой, възраст, пол, вид на репродуктивните неудачи и диагностичен метод	59
IV.2. Конвенционални цитогенетични изследвания	66
IV.2.1. Обща характеристика	66
IV.2.2. Хромозомни аномалии по вид и група репродуктивно нарушение	68
IV.2.2.1. Бройни хромозомни нарушения	69
IV.2.2.2. Структурни хромозомни нарушения	75
IV.2.2.3. Комбинирани хромозомни нарушения	84
IV.2.3. Разпределение на <i>структурните</i> хромозомни аномалии според вида на репродуктивното нарушение (група)	85
IV.2.4. Разпределение на всички хромозомни нарушения (бройни, структурни, комбинирани) по вид репродуктивно нарушение (група)	88
IV.2.5. Хромозомен полиморфизъм	92
V.3. Молекулярно-цитогенетични изследвания за субтеломерни хромозомни преустройства	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ИЗВОДИ	118
ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	120
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	121
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	122
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА	126
БИБЛИОГРАФИЯ	127

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АРТ	- асистираната репродуктивна технология
АФС	- антифосфолипидни антитела
АЦ	- акроцентрици
ВА	- вродени аномалии
г.с.	- гестационна седмица
ДНТ	- дефект на неврална тръба
ИУР	- изоставане в умственото развитие
КРИ	- комбинирана репродуктивна история
МВА	- множество вродени аномалии
МГК	- медико-генетична консултация
МФ	- мозаична форма
НАХР	- неалелна хомоложна рекомбинация
НПР	- невро-психическо развитие
ПМ	- полиморфизъм
ПФ	- пълна форма
РН	- репродуктивните нарушения (неудачи,неблагополучия)
СД	- сегментни дупликации
СПА	- спонтанни аборти
УМИ	- умствено изоставане
ФХА	- фитохемаглутинин
ХА	- хромозомни аберации
ХБ	- хромозомна болест
ХП	- хромозомен полиморфизъм
array-CGH	- array-comparative genome hybridization
AgNOR	- Ag Nucleolar Organizer Region
APC	-adenomatous polyposis coli
AZF	- Azoospermia factor
BAC	- bacterial artificial chromosome
CBG	- C- differential banding techniques
CGH	- comparative genome hybridization
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenylindole
DA-DAPI	- distamycin A – DAPI
der	- derivative
Fdur	- 5-Fluoro-2'-deoxyuridine
FISH	- fluorescent in situ hybridization
GTG	- G - differential banding techniques
ICSI	- Intracytoplasmic sperm injection
ISCN	- International System for Human Cytogenomic Nomenclature
IVF	- in vitro fertilisation
qh	- heterochromatin in long arm
LCR(s)	- low copy repeat(s)
mat	- maternal
mFISH	- multicolour fluorescent in situ hybridization
MLPA	- multiplex ligation-dependent probe amplification
mos	- mosaicism
NOR	- nucleolar organizer region
PAC	- P1 derived artificial chromosome

pat - paternal
PBS - phosphate buffered saline
PCOS - Polycystic Ovary Syndrome
ps - satellite in short arm
pstk - stalk in short arm
q - long arm
QFQ - Q - differential banding techniques
real-time PCR - polymerase chain reaction in real time
rob - Robertsonian translocation
SKY - spectral karyotyping
SSC - saline sodium citrate

ВЪВЕДЕНИЕ

Възпроизводството на човека и динамиката на демографските процеси са един изключително сложен комплекс от икономически, социални, медицински, биологични, психологически, географски, религиозни и морално-етични компоненти, които дават много сериозно отражение върху цялостното развитие на една страна. Физико-социалното и медицинското значение на репродуктивните нарушения все още не са добре оценени и разбрани.

Между медико-биологичните фактори, които влияят върху възпроизводството на населението, особено място заемат репродуктивните проблеми в семейството.

Репродуктивните нарушения (РН) включват разнообразни, широко разпространени проблеми като: инфертилитет (липса на бременост – стерилитет), повтарящи се спонтанни аборти, мъртвораждане, раждане на деца с множествени вродени аномалии (МВА) с/ без умствено изоставане (УМИ).

В световен мащаб милиони двойки са неволево инфертилни, толкова бременности завършват неуспешно още през първия триместър от бременността, а повече от 10% от новородените са с ниско тегло и/или аномалии, засягащи здравето и жизнеността им.

На базата на различни проучвания се установява, че инфертилитета засяга между 8-18% от двойките в репродуктивна възраст, като участието на двамата партньора показва относително равен дял: приблизително около 35-40 % изхождат от жената, други 35-40% включват мъжки фактор, а в около 20% участие имат и двата пола (50,51,69,86,122,127).

Клинични данни за двойки с регистрирани спонтанно прекъснати бременности показват, че загубата на бременност (аборт) е доста често срещано явление. Около 15-20% от разпознатите бременности завършват с неуспех (21, 54, 59, 81, 112, 122, 133, 146, 165, 172). Повечето от тях се случват спонтанно в ранна гестационна седмица (55-70%), въпреки че загубите във втори и трети триместър не са редки (172). Приблизително 50% от разпознатите ранни аборти се асоциират с цитогенетични промени, като вероятността за цитогенетичните промени варира с гестационната възраст и морфология на абортите (172). При абортите в по-ранна гестационна възраст има по-голяма вероятност за откриване на абнормни кариотипи: такива се откриват при 2/3 от абортите преди 8 г.с. (70-80%) и близо 1/4 при тези между 8-12 г.с. При аборти от втори триместър

хромозомни нарушения се срещат в 30%, и едва 5% при тези в трети триместър и в живо родени деца (81,146).

Рутинното високорезолютивно цитогенетично изследване дава възможност за намиране на балансирани хромозомни преустройства в приблизително 5,5% от двойките с ранно прекъснали се бременности. Процентът на хромозомни аберации в общата популация е по-малък от 1% (около 0,55%) (178), докато при пациенти с комбинирана репродуктивна история той нараства. Установяването на родителските кариотипи е част от оценката, която се прави в случаи на репродуктивни проблеми. От около 2% до 8% от двойките с два и повече повтарящи се аборта са носители на балансирани хромозомни преустройства, което показва че, това е една от причините за намалената фертилност при семейства в репродуктивна възраст (30,34,54,165). Тези промени се свързват също и с феталните малформации, както и с умственото изоставяне при някои родени деца. Раждането на здраво дете преди или след СПА от друга страна, не изключва възможността за наличие на балансирано родителско хромозомно преустройство.

Високорезолютивният GTG - цитогенетичен анализ, обаче ограничава откриването на аберации до размер над 5 – 10 Mb. При голяма част от лицата с РН се установява структурно и бройно нормален кариотип и при липса на клинични и лабораторни данни за друга причина, диагнозата остава неясна. С навлизането на молекулярно - цитогенетичните методи с по-висока резолюция (откриваемост на малки, под 5 Mb) и насочени към конкретни хромозомни региони се открива, че в около 3% от случаите на идиопатично/етиологично неизяснени РН са налични различни пренареждания в областта на субтеломерните хромозомни региони (194). Светлото оцветяване на субтеломерните региони при рутинното G-лентово оцветяване затруднява детекцията на пренареждания в тях. От друга страна, субтеломерните хромозомни региони са богати на активни гени и високата степен на сходство между тях ги прави податливи на рекомбинационни процеси.

РН могат да бъдат резултат от генетични и физиологични причини, налични при партньорите. Всяка форма на РН е резултат от различни молекулни и клетъчни механизми, което предполага различни пътища за изследване, диагноза и лечение. Установяването на причината за проблема в репродукцията не е лесна задача, затова в много случаи (30-40%) се квалифицира като такъв с „неизяснен произход” (идиопатичен).

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

I.1. Терминология и честота на Репродуктивни нарушения (РН)

I.1.1. Терминология

В клиничната практика за всички пациенти с липса на живо и здраво потомство се използва термина **репродуктивни нарушения (РН)**. В тази група влизат двойки с инфертилитет (липса на бременност), спонтанни аборти, мъртвораждания, както и двойки с родени деца с вродени аномалии (ВА) и/или умствено изоставане (УМИ).

Инфертилитет е неспособност в една двойка за реализиране на бременност по естествен път, след 12 месеца опити без предпазване (Световната Здравна Организация (СЗО)). При определена медицинска история, физически находки и при жени над 35 години, този срок може да бъде съкратен на 6 месеца, с цел по-ранна оценка на състоянието и прилагане на евентуално лечение (118).

Съгласно друга дефиниция, инфертилитетът се дели на първичен и вторичен. Инфертилитетът е първичен, тогава когато при дадена двойка не се наблюдава никаква бременност в продължение на една и/или повече години при редовен полов живот без използване на контрацептиви. Вторичният инфертитет се отнася за двойки, при които има предишно забременяване, но не се осъществя следващо такова при период от една година и повече (97).

Невъзможността за износване на бременност до термин се означава като **спонтанен аборт или мъртвораждане (149)**.

Абортът се дефинира като прекъсване на бременността, преди достигане на жизнеспособно състояние на плода, преди 20 гестационна седмица и телесна маса под 500 грама (в България е преди 26 гестационна седмица или под 800 гр на плода) (156). По видове абортите се класифицират на *спонтанен аборт* (ранен до 12 г.с. и късен – след 12 г.с.) и *изкуствен аборт* (в т.ч. аборт по медицински показания).

Повтарящи аборти е термин, исторически дефиниран от СЗО като *три и повече* спонтанни и последователни загуби на бременност преди **20 гестационна седмица** (197). Европейската Асоциация за Човешка Репродукция и Ембриология (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE) и Кралският колеж по Акушерство и Гинекология, препотвърждават тази дефиниция с уточнение не непременно вътрематочни гестационни загуби (91, 203).

Тази концепция еволюира през годините. Американската Асоциация по Репродуктивна Медицина, дефинира термина „повтарящи аборти“ като *два и повече* спонтанни аборта на доказани бременности (ултрасонографски или чрез хистопатологично изследване), независимо дали са последователни или не (20).

През 2017 г., с цел стандартизиране на понятията, Международният Комитет за Мониторинг на Асистираната Репродуктивна Технология (АРТ) и СЗО, преработват Речника на терминологията на АРТ и предлагат термина „повтарящи аборти“ да се използва при наличие на два и/или повече спонтанни аборта преди 20-та седмица на клиничната бременност, без да е необходимо те да са последователни (204). Същата година тази дефиниция се приема и от ESHRE (156).

Мъртвородено съгласно СЗО е всеки плод роден без признаци на живот след 28 гестационна седмица или 1000 g (182). Според други източници срокът може да е по-ранен - след 20, 22, или 24 гестационна седмица или когато плодът е 400 g, 500 g, 600 g тегло при неговото раждане и не дава признаци на живот (138). У нас за граница аборт-раждане се приема 26+ г.с. или 800 g на плода и при липса на признаци на кръвна циркулация, според последният стандарт по Акушерство и гинекология (2).

Вродена аномалия представлява различен по вид дефект, който се наблюдава у ембриона, плода или новороденото. Под родени деца с "вродени аномалии" се разбират всички аномалии в развитието на индивида (морфологични, функционални, молекулярни), които са налични при раждането (независимо от времето на изява), външни или вътрешни, фамилни или спорадични, наследствени или ненаследствени, единични или множествени (190). Често пъти включват и изоставане в умственото развитие (УмИ) - значително ограничение в интелектуалното функциониране и адаптивното поведение, водещо до ограничени адаптивни способности на индивида (111).

Вродените аномалии са съществена част от генетичните болести, но понятието не дава информация за подлежащата етиология и патогенетични механизми на нарушението. За постигане на това е необходимо достигане до конкретна диагноза, която да даде възможност за адекватно поведение по отношение на засегнатия индивид и предоставяне на генетично консултиране на семейството (11).

Обект на настоящия дисертационен труд са пациенти с липса на зачатия (неволеви първичен или вторичен инфертилитет); *два и повече* спонтанни аборти *преди 20-та седмица* на бременността, без значение на последователността; както и такива с

комбинирана репродуктивна история (СПА/ прекъсната бременност по медицински показания в комбинация с мъртво раждане/ родено дете с аномалии със или без УМИ).

I.1.2. Честота

Към 2010г. броят на двойките, които са с РН, особено инфертилни, се изчислява на 48,5 милиона (114). През второто десетилетие на новото хилядолетие безплодието остава силно разпространено глобално състояние. Към 2016 г. броя на засегнатите двойки по света нараства на 60-80 млн. (127), а в развиващите се страни достига до 186 милиона души (86). През последните години се набелязва тенденция към непрекъснато увеличаване на двойките с репродуктивни нарушения и в България. В нашата страна към 2017 г., засегнатите двойки са 145 000 (6), а към 2018 г. са вече 300-400 хил. (7).

В световен мащаб инфертилността се среща при около 8-12% до 15-18% от двойките в репродуктивна възраст (51, 69, 86, 122). В някои региони на света честотата е много по-висока, като достига приблизително 30% в някои популации. Това е особено характерно за редица региони с високо разпространение на безплодие, като Южна Азия, Субсахарска Африка, Близкия Изток и Северна Африка, Централна и Източна Европа и Централна Азия (52,86). В САЩ инфертилността се среща при 10-15% от двойки между 15 и 44 г. (23,76). В Европа този проблем засяга 15.8% от тях (23). Към 2010г. от жените в репродуктивна възраст (20-44 г.), с първичен инфертилитет са 1,9%, а в 10,5% не се наблюдава повторно забременяване (вторичен инфертилитет) (114). Вариациите в честотата на двойките с РН, най-вероятно се дължи на различно използваните дефиниции, методите за установяване и междупопулационните различия (26).

Съгласно съвременните проучвания при инфертилни двойки, като причина за РН мъжете и жените показват почти еднакво участие (по 30-40% за всеки един от двата пола), а в останалите 20% могат да бъдат засегнати едновременно и двамата партньори (50,122). В световен мащаб се наблюдава значителен спад в мъжката репродукция и увеличаване броя на субфертилните мъже (50). Изчислено е, че 7% от всички мъже имат проблеми с фертилността си (17,103). Един от 13 мъже в репродуктивна възраст се насочва към медицински услуги с цел репродукция (17). Според редица автори, мъжкия фактор е частично или напълно отговорен за приблизително 30-55% от случаите на инфертилитет в дадена двойка (23,28,80,90). Азооспермията, пълното отсъствие на сперматозоиди в еякулата, представлява 10-15% от случаите на инфертилитет при мъжете и като цяло засяга 1% от мъжката популация (76,89,90). Олигозооспермия II и III степен (относителна стерилност на мъжа, концентрация на сперматозоидите $< 15.0 \times 10^6$

сперматозоиди/ml, съгласно най-новите критерии на СЗО) обхваща 37-40% от инфертилните мъже (76). В спектъра на причините за мъжкия инфертилитет, генетичните фактори обясняват 21-29% от причините за азооспермията (106). От тях, хромозомните аберации са най-често срещаните и се откриват 10 пъти повече в инфертилни мъже (4-16%) в сравнение с общата популация (0,4%) (103,104). При пациенти с намалено количество сперматозоиди (под 15×10^6 сперматозоида/ml), хромозомни аберации се намират в около 5-7%, като този процент нараства до 10-15% при пациенти с азооспермия (50,89,154). От тях, 5% са бройни или структурни хромозомни аберации, 80-85% са заради полово хромозомни нарушения и около 2% са поради мозаицизъм с автозомни нарушения (50). Делецията/микроделецията на еухроматиновия регион в дълго рамо на Y-хромозомата (Yq11), съдържащ фактора за азооспермия (AZF), е другата най-честа причина за мъжкия инфертилитет -10-20% от мъжете с азооспермия или тежка олигозооспермия (89). В 30-40% от инфертилните мъже обаче, причините остават неизвестни (идиопатични), като най-вероятно са свързани с неясна генетична етиология (генетични или геномни нарушения) (29,79,103,112,127).

Анализът на натрупаните клинични данни за двойки, при които са регистрирани спонтанно прекъснати бременности, дава представа за честотата на спонтанните аборти. Съгласно тези данни, 15-20% от всички клинично разпознати бременности завършват с аборт. От спонтанните аборти, 55-70% настъпват през първия триместър на бременността, като приблизително 25% от имплантираните ембриони се резорбират още между 7-14 ден. Статистически данни показват, че 4-6% от жените във фертилна възраст, опитващи се да забременеят, претърпяват поне два аборта, а около 1-2% от тях имат три и повече загуби на бременност (59,85,119,146). Биохимични и клинични аборти се наблюдават и в 30-40% от жените заченали чрез ин-витро процедури (119).

Клиничните изследвания показват, че величината на риска за повторение след настъпил ранен спонтанен аборт зависи от конкретната медицинска анамнеза на пациентките. При жени с последно живородено дете и без по-ранни загуби на бременност, рискът за СПА при всяка следваща бременност е по-малък от 5%. Рискът нараства на 24% при жени с едно живородено дете и с поне един спонтанен аборт, а при тези с едно живородено дете и съответно с два и три спонтанни аборта изчисленият риск е съответно 26% и 32% за всяка следваща бременност. При жени без анамнеза за живородено дете рискът е 30% при вече две предишни загуби на бременност, и около 35-50% при тези с три СПА за всяка следваща бременност (146). Успешно завършване

на една бременност след три спонтанни аборта се очаква да е в границите 55-60%. При спонтанни аборти и живо родено дете, процентът може да достигне 70% (146).

Половината от спорадичните ранни СПА и една-трета от тези във втори триместър са резултат от хромозомни нарушения на плода. Най-висок е процентът на бройните нарушения (анеуплоидиите - 86%), структурните аберации се срещат в 6%, други хромозомни нарушения (мозаицизъм, двойни или тройни тризомии) в 8% (192). При повтарящи се СПА, процентното съотношение е съответно 90% за анеуплоидии, 3% структурни хромозомни нарушения и 13% други хромозомни аберации. От анеуплоидиите, тризомиите са представени в най-висок процент, следвани от монозомии и полиплоидии. Рискът от тризомии на плода нараства с възрастта на майката (192).

Хромозомните аберации, основно балансираните преустройства, са сравнително чести в двойки с РН. Вероятността единият родител да е носител на балансирано хромозомно преустройство нараства от около 0,7% за общата популация до 2,2% след един аборт, 4,8% след два аборта и 5,2% след три аборта (146). Още по-висок е рискът, когато в репродуктивната история на дадена двойка има родено дете с малформации и/или УМИ (54,146). В 2-8% от двойките с репродуктивни проблеми, поне единият от партньорите е носител на балансирано хромозомно преустройство. В около 3,4% от фетусите на такива двойки се установява небалансиран кариотип (33,54).

По-обобщена статистика, на базата на проведен обширен литературен преглед, показва че, честотата на хромозомните аберации (балансирано хромозомно преустройство, полово хромозомно мозаицизъм, хромозомни полиморфизми) сред двойките с повтарящи се спонтанни аборти варира в различни проучвания от 1,3 до 15,0% (12,25,43,54,68,69). В отделно проучване се съобщава и честота до 21,4% (98). Вариациите в честотите могат да са дължат на различния размер на представените извадки, както и на използването на различни критерии за провеждане на изследването.

Различни проучвания в последните години показват, че една част от абортите, може да се дължат и на субмикроскопски хромозомни нарушения. С помощта на високорезолютивни молекулярно-цитогенетичните методи са отчетени допълнително 3,8 до 13% субмикроскопски хромозомни промени в абортивния материал, диагностицирани като нормални при проведената преди това конвенционална цитгенетика (192).

В световен мащаб през 2015 г. е имало около 2,6 милиона мъртвородени, чиято смърт е настъпила в/след 28-та гестационна седмица от бременността (около 1 на всеки

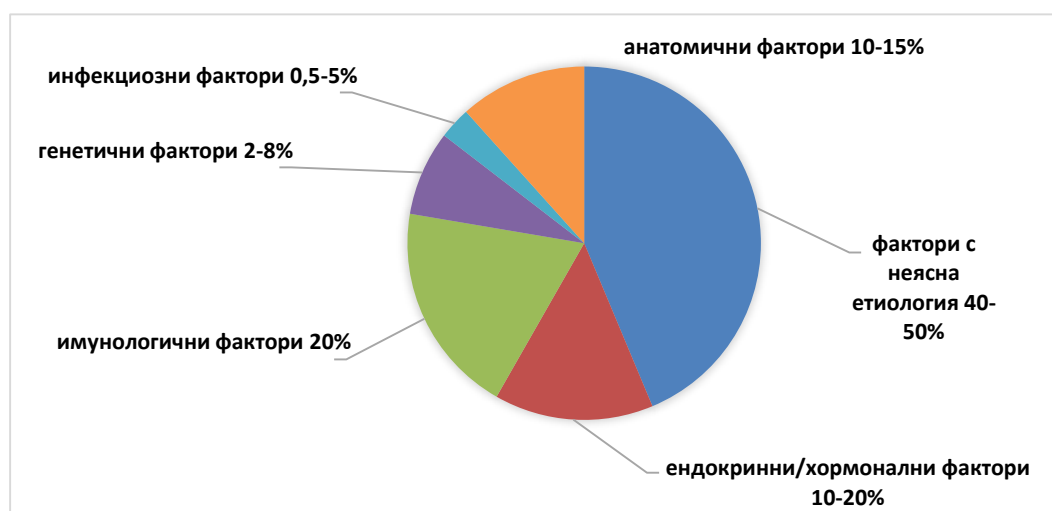
45 раждания). Те се срещат най-често в Южна Азия и Африка на юг от Сахара. В САЩ за всеки 167 раждания има едно мъртвородено (47).

Вродени аномалии, дължащи се на нарушения в морфогенезата, се срещат при 2 – 3% от всички новородени (94). У 80-85% от ембрионите, произхождащи от прекъснати спонтанно до 12 г.с. бременности, се откриват груби структурни дефекти, вариращи от единичен дефект до пълна липса на ембрион (191). За българската популация, съгласно редица регионални и национални проучвания, честотата на ВА е между 1,9% и 4% (около 3700 деца) (1,3,4,168). Този процент определя и средно-статистическият риск при всяка бременност да се роди дете с вродена аномалия. Честотата на родените деца с УМИ в световен мащаб се описва най-често в границите на 2–3% (41,49,159).

I.2. Репродуктивни нарушения – етиология

РН (липса на бременност, спонтанни аборти, мъртво-раждания, раждания на деца с аномалии и/или УМИ) е социално значим проблем в съвременната медицина.

Достигане до етиологична диагноза е основна цел на цялостния диагностичен процес при оценката на двойки с РН. Откриването на причината за РН е важен момент за пациентите и техните семейства. Дава се отговор и на въпроси относно механизма на възникване, риска за повторение при следваща бременност, прогнозата и стратегиите за поведение, евентуални съпътстващи нарушения или усложнения, назначаване на определени изследвания, получава се информация за репродуктивните възможности и рисковете за поколението (26). Основните факторите, отговорни за РН са: анатомични; ендокринни; имунологични; генетични; инфекциозни (фиг.1). За РН, значение имат още психологичните, факторите на околната среда и др.



Фигура 1. Съотношение между факторите, отговорни за РН (59)

Анатомичните фактори са отговорни за 10-15% от случаите на повтарящи се СПА (59). Основните от тях са: вродени аномалии на матката, вътрематочна адхезия, ендометриални полипи и фиброми и дефект на Мюлеровия канал. Вродените аномалии на матката се асоциират основно с аборти във втори триместър на бременността, но се срещат и при част от жените с ранни СПА. Маточната преграда е водеща вродена аномалия, свързана с повтарящи се аборти, със 76% риск от спонтанна загуба на бременността при засегнатите жени. Останалите варианти и другите анатомични фактори са свързани с по-малък риск от аборт (59,119).

Ендокринните/хормонални фактори засягат 10-20% от пациентите с репродуктивни проблеми. Хормоналните нарушения могат да бъдат резултат от проблеми с ендокринните жлези, като хипофиза, щитовидна, надбъбречни или яйчникови жлези. Синдромът на яйчниковата поликистоза (PCOS) и Диабет тип I също могат да бъдат свързани с повтарящите се СПА (59,119).

Имунологичните фактори, свързани с неуспешната репродукция се делят на автоимунни и алоимунни. Автоимунните фактори включват синтеза на автоантитела, като анти-фосфолипидни антитела, анти-нуклеарни антитела и анти tiroидни антитела. Антифосфолипидният синдром (АФС) е автоимунно заболяване, характеризиращо се с повишени нива на антифосфолипидни антитела и е клинично свързано с повтарящи се СПА, фетална смърт и тромбози (198). Алоимунните фактори, т.е имунологичните различия между индивидите, се предполага, че могат да бъдат отговорни за неуспешна репродукция (повтарящи се загуби на бременност) в около 20% от двойките с репродуктивни проблеми (59,119).

Инфекциозните фактори са свързани с пряка инфекция на матката, плода или плацентата; плацентарна недостатъчност; хроничен ендометрит или ендоцервицит; амнионит; инфектирани вътрематочни тръби (59). Делът на тези фактори при *повтарящи се СПА* е около 0,5% до 5%, като отговорни инфекции са бруцелоза, микоплазма, уреоплазма, хламидия (119). Инфекции като листериоза, токсоплазмоза, херпес симплекс вирус, цитомегаловирус, водят до *спорадични* загуби на бременност и нямат доказан ефект при повтарящи се СПА.

Относителният дял на *генетичните фактори*, като причина за РН е сравнително малък. Генетичните фактори могат да доведат до нарушение в репродукцията на дадена двойката, причиняващи ранна загуба на плод, генетично заболяване или дори смърт на новородено. Тяхното търсене и идентифициране има голямо значение, тъй като установяването на генетична причина за това дава шанс на двойката за рационално

семеино планиране, извежда показание за асистирана репродукция, необходимост от дородова диагностика и профилактика на настъпила бременност.

Цитогенетични фактори, единични генни мутации, полигенни са основните, които се свързват с ранните СПА.

От цитогенетичните фактори като причина за РН, най-голямо значение имат балансираните **хромозомни преустройства**, като най-чести от тях са балансираните реципрочни или Робертсонови транслокации. Други структурни аберации асоциирани със СПА са инверсии, инсерции и мозаицизми по половите хромозоми (59). Повечето от хромозомните аберации, водещи до загуба на бременност, възникват в резултат на грешки при формирането на половите клетки през гаметогенезата (по време на мейозата) или в постзиготичния етап (след образуване на яйцеклетката) като грешка в митотичното клетъчно делене (146). Наличието на такива преустройства може да доведе до неправилно разделяне на хромозомите по време на мейозата, а в резултат на нарушената сегрегация се повишава риска от възникване на частични тризомии или частични монозомии за хромозомните региони включени в съответната транслокация (54,146).

Хромозомните преустройства в края на хромозомите (субтеломерни хромозомни преустройства) се оказват съществен генетичен етиологичен фактор в човешката патология. Семействата, които показват „нормален“ кариотип при стандартната цитогенетика, могат да са носители на „скрити“ субтеломерни хромозомни преустройства, водещи до малсегрегация или рекомбинация в гаметогенезата и образуването на небалансирани гамети, в резултат на което настъпва СПА, мъртвораждане или раждане на дете с множество вродени аномалии (МВА) (75). Субтеломерни хромозомни преустройства се откриват средно в 3,5% от двойките с РН (27,35,44,56,75,88,93,125,150,194,200). Те са отговорни за повече от 7% от случаите с тежка и за 0,5% от тези с лека степен на умствено изоставане (УМИ), за раждането на деца с МВА, както и за ранни СПА, като в половината от тези случаи причината е хромозомна небалансираност заради малсегрегация на фамилна субтеломерна транслокация (88). Пренарежданията с големина над 5 – 10 Мб могат да се открият при рутинно цитогенетично изследване, а молекулярно-цитогенетичните техники детектират по-малките от 5 Мб аберации, разположени в субтеломерните хромозомни региони.

В последните години се отчита и дела на *хромозомните полиморфизми (ХП)* в двойките с РН. По принцип те се считат като вариант на норма. Според много от последните проучвания обаче, хромозомния полиморфизъм вероятно има своето

отношение към инфертилитета и спонтанни аборти. За това дава основание намереният статистически значим по-висок процент на хромозомни полиморфизми при пациенти с репродуктивни проблеми, което изисква да се отчита и тяхната роля в репродуктивната недостатъчност. Анализът на единични нуклеотидни полиморфизми в гените кодиращи ензимите с регулаторна роля в основните метаболитни пътища, факторите на кръвосъсирване (фактор V на Лайден и протромбина), и хормоните и хормонните рецептори (прогестеронов рецептор), обясняват само част от причините за спонтанната загуба на бременност (119).

От *факторите на околната среда* отговорни за репродукцията, тютюнопушенето, алкохола и кофеина заслужават най-голямо внимание, в предвид тяхното широко използване и променяща се природа. *Психологическия фактор* при двойки с повтарящи се аборти също не е за пренебрегване. Редица проучвания показват, че често след спонтанна загуба на бременност, пациентите съобщават за продължителен стрес и депресия. В този случай е наложително психологична консултация, което в един голям брой от случаите резултира в следваща успешна бременност (119).

Независимо от диагностичния прогрес в областта на РН, през последните години, остава сравнително висок процента на случаите (40-50%) с неясна етиология.

I.3. Конвенционални цитогенетични изследвания при пациенти с РН

I.3.1. Основни видове

Въпреки, че клетъчното делене в соматичните и герминативни клетки е един изключително прецизен процес, той е предразположен и към грешки. Тези грешки могат да доведат до хромозомни нарушения, които са основната причина за засегнатостта и смъртността на ембрионите.

Основните хромозомни нарушения при пациенти с РН се делят на структурни хромозомни аберации, бройни хромозомни аберации, както и различни хромозомни полиморфизми (варианти) (10).

Бройните хромозомни аберации включват най-често наличие на допълнителна половина хромозома или отсъствие на такава, често представени в мозаичен вариант: 45,X/46,XX; 45,X/46,XY; 46,XX/47,XXX; 46,XY/47,XYY и др.

Структурните хромозомни аберации се различават от бройните по това, че при тях се наблюдават промяна в структурата на една или повече хромозоми. Когато в кариотипа е налице хромозомно преустройство, сдвояването по време на мейозата и

правилното разделяне на хромозомите е затруднено. Това води до образуване на гамети с небалансиран хромозомен набор. Този дисбаланс обикновено е летален за развиващия се ембрион или фетус и води до спонтанен аборт. В други случаи бременността продължава до термин и се ражда дете със значителни вродени аномалии и/или умствено изоставяне (140).

От структурните хромозомните аберации отговорни за РН, основни са балансираните хромозомни преустройства. Това са транслокации - реципрочни балансирани транслокации, еднопосочни транслокации (инсерции) и Робертсонови транслокации; и инверсии (парацентрични и перичентрични). Условно е прието да се смята, че тези преустройства протичат без излишък или загуба на наследствен материал и нямат фенотипен ефект (185).

Хромозомните аберации, особено транслокациите, предполагат различни форми на РН - от дефектна гаметогенеза до повтарящи се спонтанни аборти (37,45). Хромозомните транслокации участват в трансфера на генетичен материал от една хромозома на друга и могат да бъдат: реципрочни, включващи счупвания в 2 нехомоложни хромозоми с размяна на сегменти; нерципрочни, еднопосочно пренасяне на фрагмент от една хромозома на друга нехомоложна хромозома (инсерция); Робертсонови, включващи точки на счупвания близо до центромерите на две акроцентрични хромозоми. Важността на транслокациите се свързва с модела на сегрегация по време на мейоза и възможността за формиране на небалансиран кариотип. Моделите на унаследяване зависят от включените хромозомни участъци и размера на преустройствата (19,117,164).

В общата популация, честотата на балансираните преустройства варира от 0,08% до 0,3%, като реципрочните транслокации се срещат средно в 1:500 души (19), а Робертсоновите- 1:1000 (42,66). При двойки с РН се наблюдава удвоена честота: 0,6% при инфертилни двойки и 9,2% при тези с повтарящи се СПА в сравнение с общата популация (127). Откриване на балансирано хромозомно преустройство при един от партньорите в двойка с 2 или повече спонтанни аборта е около 5-7%.

Балансираните реципрочни транслокации представляват 4,8 - 5,5% в изследваните двойки с повтарящи се СПА. От Робертсоновите транслокации най-честа е транслокацията между хромозоми 13 и 14 – около 75% от всички варианти. Вероятността за СПА в двойки с балансирана реципрочна транслокация е приблизително 25% -50%, а с Робертсонова транслокация – около 25% (54). По-ниският риск при носителите на

Робертсонови транслокации се дължи на съвместимост на тези преустройства с женската фертилност и асоцииране основно с мъжката инфертилност (139).

Съществуват емпирични и/или хипотетични данни за предварително определяне на шанса за неблагоприятен изход на бременността при наличие на различни преустройства, чиито клинични последици са стерилитет, повтарящи се аборти, както и раждане на деца с малформации (30,40).

Когато единият родител е носител на балансирано хромозомно преустройство, вероятността да се роди живо дете с небалансиран хромозомен набор е от 1% до 15% (57). Точната величина на риска зависи от специфичните хромозомни включвания, размера на сегмента, участващ в преустройството, гените съдържащи се в сегмента, пола на родителя носещ преустройството, фамилната анамнеза и метода на установяване на хромозомното преустройство. Изчислено е, че средният риск е около 12% ако жената е носител на балансирана транслокация и 5% ако тя е налична при мъжа. По-ниският риск при мъже - носители се дължи на малката потенциална възможност за развитие на жизнеспособен плод. Жените, дори и с множество транслокации могат да имат деца, както с нормален, така и с абнормен хромозомен набор. Следователно, рискът да се роди дете с хромозомна болест е по-висок, ако жената е носител на транслокация в сравнение с мъжа (10). При мъжете транслокациите могат да доведат до увреждане в сперматогенезата и поради това да се стигне до стерилитет (140).

Други хромозомни аберации асоциирани с РН са инверсиите (завъртане на участък от хромозомата на 180°). Инверсиите са два вида: парацентрични, при която не е засегнат центромерния регион и перичентрични- с участие на центромерния регион.

Перичентричната инверсия е най-честото хромозомно преустройство в хората, с честота 1,0-3,0% в нормалната популация (152). Балансираните инверсии нямат фенотипна изява в повечето случаи, но могат да доведат до формиране на гамети с небалансиран вид (с дупликации или делеции на хромозомни сегменти) и до небалансирано потомство и/или СПА. Генетичният риск за аборт при носителите на инверсии зависи от размера на инвертирания сегмент, като само тези с големина повече от 100 Мbp биха били сигнификантни за фертилността (146). В семейства с РН, около 8% от балансираните преустройства са перичентрични инверсии (60).

Парацентричната инверсия е по-рядка, с честота 0,1-0,5% в общата популация. В абортивен материал се открива в 11,4%. Парацентричните инверсии могат да засегнат всяка хромозома, като най-често докладвани са тези по хромозоми 1,3,5,6,7,11, и 14. По-

рядко се засягат хромозоми 4,16,17,18,19,20,21,22 и Y хромозомата. Около 90% от тях се унаследяват (10,3%), и едва 10% възникват de novo (107).

Носителите на балансирани преустройства обикновено са нормални, без фенотипна изява. При тях е засегната основно фертилността и репродуктивността. В 3-11% от двойки с повтарящи се СПА, поне един от двамата партньори е носител на балансирано хромозомно преустройство (42).

I.3.2. Показания за насочване

Показание за провеждане на конвенционален цитогенетичен анализ и търсене на условно балансирани хромозомни преустройства са: двойки с инфертилитет, двойки с наличие на два и/или повече СПА, двойки с мъртвородено и/или родено дете с аномалии и/или с УМИ, самостоятелно или в съчетание с аборт.

Когато една двойка има РН е необходимо да се проведе хромозомен анализ и на двамата партньори. Провеждането на хромозомен анализ на двамата партньори дава възможност да се установи наличие на системно хромозомно нарушение при някой от тях, което позволява изготвяне на навременна стратегия за поведение и проследяване на евентуални бъдещи бременности. Установяването на наличие на такова преустройство в единия родител е полезно, защото осигурява:

- 1) обяснение за абортите – етиология;
- 2) информация, относно риска за раждане на живо дете с потенциална възможност за сериозни аномалии, както и за риска за аборт;
- 3) възможността за пренатална диагноза при бъдеща бременност;
- 4) информация за членовете на фамилията, за които съществува риск и които могат да пожелаят хромозомен анализ.

Препоръчително е и изследването на абортивния материал (ако има такъв), което допринася за изясняване на конкретната причина за аборта.

Раждането на живо и здраво родено дете преди или между спонтанните аборти не е причина за отказ от изследване. *Coulam CB, et al.* и *Gadow EC, et al.*, намират по-висок процент на хромозомни преустройства в двойки с повтарящи се СПА и с живородени деца, в сравнение с двойки, при които има само повтарящи се СПА (46,64). През 2006 г. *Portnoi, et al.*, също съобщават един по-висок процент на хромозомни преустройства в такива двойки, поради което заключават, че ако в една двойка има родено дете с малформации и/или УМИ в допълнение към неудачните бременности, изследването на кариотипа е от още по-голямо значение (10).

I.3.3. Методи за конвенционален цитогенетичен анализ

Основният цитогенетичен метод е конвенционален хромозомен анализ за бройни и структурни нарушения **чрез GTG - бендинг** на резолюция от 550 бенда на хаплоид. Този метод се е запазил в годините като класически цитогенетичен анализ при двойки с репродуктивни неудачи и е рутинна процедура във всички цитогенетични лаборатории. Той е необходима част от цялостния панел за етиологично изследване и един от основните методи за уточняване на причината както при липса на бременности така и при повтарящи се аборти .

За първи път лентово оцветяване се прилага от *Caspersson, et al.*, през 1968 г., които при използване на флуорохром и флуоресцентен микроскоп наблюдават ярко и слабо флуоресциращи ленти (38). В по-късно осъвършенстваната *Q лентова техника (QFQ)* се използват специфични флуорохроми (квинакрин мустард или квинакрин дихидрохлорид) свързващи се с богати на А-Т секвенции. След приложение на *G бендинг* през 1970 г. (173) става възможно идентифицирането на отделните хромозоми и разкриването на структурни аберации като транслокации, инверсии, делеции и дупликации, макар и на силно кондензирани хромозоми. Това налага естествена необходимост от унифицирана номенклатура приета на Парижката конференция по Стандартизация в Човешката Цитогенетика от 1971г. (87,108), периодично актуализирана и издавана като Препоръки на Международен Комитет по Човешка Цитогенетична Номенклатура (ISCN).

Основна оцветителна техника, която се използва и днес в цитогенетичните проучвания на пациенти с РН е *GTG бендинг* техниката за оцветяване. При този метод, препаратите се обработват дозирано с трипсинов разтвор за денатуриране на хромозомните протеини като образа за всяка хромозома е специфичен. При последващото оцветяване с Gimsa, хромозомите се оцветяват в редуващи се напречни хиперхромни (G+), съответни на силно флуорисцентни бендове при QFQ и хипохромни или ахроматични (G-) ленти, съответни на слабофлуорисцентни бендове. Тъмните бендове корелират с пахитенните хромомери и съдържат по-компактно разположени ДНК хроматидни бримки поради по-гъстото разположение на залавните им места към хромозомния матрикс. Те в известна степен са по-богати на А-Т бази в сравнение с относително по-бедните С-Г съдържащи, светли ленти. Обикновено репликацията на тяхната ДНК е късно в S-фазата. В тези зони се съдържат няколко относително активни гени и много други, различаващи се от тези в светлите бендове по белтъчната си

композиция. Приложени върху метафазни хромозоми, дават общо около 400-550 бенда на хаплоиден набор. Изключение правят центромерните райони на хромозоми 1, 9, 16 и акроцентричните сателитни региони. Висока резолюция се постига чрез GTG бендинг оцветяване, върху по-слабо спирализирани, прометафазни хромозоми. За целта по време на култивирането се добавят реагенти за синхронизиране на клетъчното делене и потискане на ДНК синтезата като според степента на спирализация се отдиференцират **суб-суб** бендове – 850 и повече бенда на хаплоид. Високорезолютивен анализ може да се прилага за диагностика на скрити (криптични) транслокации и микроделеционни /микродупликационни синдроми.

Допълнително оцветителни техники за уточняване на полиморфизми, произход и значение на отделни райони от хромозомните находки са *C-лентовото* оцветяване (СВГ или оцветяване на конститутивния хетерохроматин). Това е техника, при която препаратите предварително се третират с разтвор на бариев дихлорид за специфично денаториране на протеините. При последващото оцветяване с Gimsa се постига тъмно оцветяване на хетерохроматиновите райони в центромерите, както и на хетерохроматиновите блокове в хромозоми 1, 9, 16 и Y. При *DA-DAPI* (*дистамицин А - DAPI*) се използват специфични флуорохроми, за да се получи интензивно флуоресциране на късите рамена на хромозома 15, както и на центромерните райони на хромозоми 1, 9, 16 и Y. Това се постига с оцветяване на хромозомите с флуоресцентен DAPI и последващо контраоцветяване с нефлуоресцентен антибиотик DA. За анализ на късите рамена на акроцентричните хромозоми се прилага *AgNOR оцветяване* (*Nucleolar Organizer Region оцветяване*), чрез маркиране със сребърен нитрат на ядърцевия организатор в сателитите на акроцентриците.

I.3.4. Значение на конвенционалния цитогенитичен анализ при семейства с РН

През годините са проведени много цитогенетични изследвания на двойки с нарушена репродукция – инфертилитет, спонтанни аборти, мъртви раждания, раждане на деца с аномалии и/или УМИ.

I.3.4.1. При семейства с инфертилитет

Относно връзката на хромозомните аберации с *инфертилитета*, има няколко големи проучвания, които обобщавайки своите резултати, съобщават повишена честота на хромозомни нарушения при двойки със инфертилитет и неуспешни ин-витро процедури (*Gekas J, et al. (68); Hocquet D, et al. (80); Mau A, et al. (115); Meschede D, et al. (120); Peschka B, et al. (145); Scholtes M, et al. (160); Schreurs A, et al. (161)*). Обработените

данни се отнасят за изследвани 7895 мъже и 4662 жени. При жените процента на хромозомни нарушения (5,88%) е малко по-висок в сравнение с този при мъжете (4,29%), което е резултат от по-високата честота на бройните аберации по половите хромозоми, обикновено представени под формата на ниско степенен мозаицизъм (4.44% в жените спрямо 1.82% в мъжете). Хромозомните нарушения, включват транслокации (реципрочни и Робертсонови), инверсии (перицентрични и парацентрични) и бройни аберации по половите хромозоми. По-висок процент на хромозомни нарушения при инфертилни жени (13%) спрямо инфертилни мъже (2,7%) докладват и *Morel F, et al.* (128) в своето проучване, като тази разлика се дължи отново на намерения голям брой варианти на полово хромозомен мозаицизъм при тях (91,7% от всички аберации).

В случаите на мъжки инфертилитет хромозомни нарушения се наблюдават в около 2-3%, като при мъжете с азооспермия има по-голяма вероятност от хромозомни нарушения на половите хромозоми, както за бройни така и за структурни, в сравнение с тези с олигозооспермия. От друга страна, мъжете с олигозооспермия имат по-често автозомни преустройства (транслокации, инверсии, допълнителни маркери) от тези с азооспермия (68,80,115,120,145,160,161). *Punam N, et al.* (132), докладват хромозомни нарушения при 14.3% от мъжете с азооспермия и 6.5% при тези с олигозооспермия, като тези проценти са близки до докладваните в литературата, съответно 10-15% и 5-7%.

За българската популация от инфертилни мъже *Kovacheva K, et al.* (103), докладват честота по-висока от тази съобщавана в литературата. Те намират 20,7% хромозомни аберации в мъжете с азооспермия, и 13,9% от тези с олигозооспермия. На базата на техните резултати подобно на литературните данни, авторите посочват, че хромозомните аберации, заедно с Y хромозомните микроделеции са най-честата генетична причина за мъжкия инфертилитет. Честотата им варира от 2-28%, при популационна честота 0,7-1% (103). Тези вариации са резултат главно от дизайна на проучването, подбора на пациенти, етническият произход, както и от други фактори (103,131,177,179).

Мъжкия фактор е частично или напълно отговорен за приблизително половината от случаите на инфертилитет в дадена двойка (23,28,76,79,89,106). Хромозомните аберации са най-чести и се срещат в около 5-7% от пациентите с олигозооспермия и 10-15% в тези с азооспермия (50,89,154). Абераиите по половите хромозоми са най-честата причина за мъжкия инфертилитет, а гонозомния мозаицизъм най-вероятно е отговорен за неуспешната асистирана репродукция (132,186).

Хромозомните аберации имат отношение и към неуспешните АРТ процедури. Поради възможността от образуване на гамети с небалансиран вид, може да се развие ембрион с абнормен кариотип, който при трансфера си да резултира в неуспешно АРТ (129,176). В този случай на преден план излиза необходимостта от предимплантационна диагноза (153,157).

I.3.4.2. При семейства с повтарящи се аборти

Schmidt, 1962г. е първият, който докладва резултати от цитогенетичен анализ в двойки с повтарящи се СПА. Следва серия от цитогенетични изследвания в двойки с два и повече СПА, в които честотата на хромозомни аберации варира от 1,3% до 15,0%, дори 21.4% (98). Възможно е голямата разлика да е свързана с различия в отделните популации, но се смята, че повече допринасят вариациите в обема на пробите, в критериите използвани за установяване на причините, както и в техниките за цитогенетичен анализ (183). В някои от най-големите проучвания от миналия век- *Braekeleer, et al. (34), Campana M, et al. (37), Fryns JP, et al. (62), Tharapel, et al. (183)*, са намерени съответно 4.7%, 5%, 5,34%, 5.8%.

В други по-малки по обем проучвания, за същия период, проведени върху пациенти с повтарящи се СПА, честотата на цитогенетичните аберации варира между 1% и 4.8%, като техният процент нараства с по-високия брой ранни спонтанни аборта (повече от три) и/или в двойки с по-късна загуба на плода, поради множествени вродени малформации (31,84, 109, 142, 158,169,184,187,196).

Това се потвърждава и в две от големите проучвания на *Yu MY, et al.*, и *Sugiura-Ogasawara M, et al.*, върху двойки с повтарящи се СПА. Намереният от тях процент е 2,72% и 4,5%, като при двойките с три и повече СПА, процентът на хромозомни нарушения е значимо по-висок (4.9%, $p < 0,01$) (180,201). *Sider D, et al., Gaboon NEA, et al., Ghazaey S, et al.*, разпределят пациентите на четири групи според броя на СПА, съответно с два, три, четири и пет и повече. Данните които съобщават за първата група са съответно 6%, 4,4%, 11%; за втората са 10,2%, 6%,15%; за третата – 7,4%, 8,3%, 15%; за четвъртата – 11,1%, 13%, 21,2% (167,63,70). На базата на своите проучвания, тези автори достигат до извода, че при двойки със спонтанни аборти, процента на намерените хромозомни аберации нараства с броя на абортите, а балансираните реципрочни транслокации представени с най-висок процент (81%), са основна причина за тях (63,70,167,180,201). *Pokale YS, et al.*, намират също по-висок процент хромозомни

аберации при двойки с четири и повече СПА (9,1%) в сравнение с тези с три СПА (4,7%) (147).

Близки до средните проценти съобщавани в литературата, са данните от проучванията на *Azim M, et al.* (5.3%), *AL-Hassanee AJ, et al.* (6%), *Al Hussain M, et al.*, (7,7%), *Gonçalves RO, et al.*, (7,3%) (22,14,13,72). Значително по-висок процент намират *Jiang J, et al.* (11.5%) и *Tsui KM, et al.* (9,92%) (92,188). Причината за този по-висок процент, вероятно е резултат от популационните различия и критериите за подбор на тези пациенти (92,188). Повечето от гореизброените автори отново намират статистически значима връзка между броя на предишните аборти и наличието на хромозомни преустройства ($p = 0,005$) (13).

В едно от големите проучвания проведено у нас на базата на 20 годишен опит върху 5088 пациента с необясними повтарящи се СПА, *R. Emilova, et al.*, съобщават честота от **2,22%** за българската популация, като с най-голям процент (58,4%) отново са транслокациите, 88% от които са балансирани реципрочни хромозомни преустройства и 12% са Робертсонови транслокации. Тази честота е сходна с тази съобщавана в по-голяма част от проучванията проведени през последните 20 години по света (от 1,28% до 4,5%) (151).

Масшабно ретроспективно проучване върху двойки с комбинирана репродуктивна история се публикува от *Fryns JP, et al.* (62). Той анализира цитогенетични данни при двойки с повтарящи се ранни СПА или спонтанен аборт в първи триместър в комбинация от смърт на плода във втори или трети триместър. В група от 1555 двойки за периода от 1970-1985г. са намерени хромозомни нарушения в 6,36%, а в група от 1743 двойки за периода от 1986–1995г. хромозомни нарушения са били разкрити в 5,34% (62).

Честотата на хромозомните нарушения нараства с броя СПА (13,14,22,63,70,72,167).

I.3.4.3. Комбинирани проучвания при семейства с инфертилитет и повтарящи се аборти

При сравнителен анализ на честотата на хромозомните аберации, намерени при двойки с повтарящи се СПА и тези с инфертилитет и повтарящи се неуспешни ин витро процедури, *Stern C, et al.* (176) и *Mozdarani H, et al.* (129) докладват по-висок процент хромозомни нарушения при двойки с повтарящи се аборти (4,7% и 13,9%), в сравнение с двойки с инфертилитет и неуспешни АРТ (2,5% и 7,04%). Според авторите на двете проучвания, когато единият от двойката е носител на балансирано преустройство, има

вероятност от образуване на гамети с небалансиран вид, което да доведе до неуспешно развитие на ембриона още в преимплантационната фаза, и да се стигне до повтарящи се ин витро неуспехи (129,176).

Обратно, *F. Düzcan, et al. (55)* докладват по-висок процент (4,8%), в групата с инфертилитет в сравнение с групата на пациентите с повтарящи се спонтанни аборти (3,1%) (55).

От хромозомните нарушения с най-голямо значение са **транслокациите**. Носителите на балансирани реципрочни транслокации, макар и без видима фенотипна изява, имат много често проблеми в репродукцията: по-висок риск от повтарящи се СПА, инфертилитет и раждането на деца с малформации.

Причината за това, че носителите на такива преустройства имат повишен риск от хромозомен дисбаланс по време на гаметогенезата, в резултат на неправилна мейотична сегрегация на балансирания транслокация (39,62,143). Относителният дял на балансирани транслокации при такива двойки е по-висок при жените отколкото при мъжете. Преобладаването на хромозомни нарушения при жените се обяснява с факта, че тези аберации са съвместими с фертилността при тях, докато при мъжете, те могат да бъдат асоциирани с тяхната инфертилност, т.к. могат да доведат до увреждане в сперматогенезата (34,40). Намирането им и установяването на генетична причина, дава шанс на двойката за рационално семейно планиране, извежда показание за асистирана репродукция, необходимост от дородова диагностика и профилактика на настъпила бременност.

Другите хромозомни преустройства свързани с репродуктивните неудачи, основно при двойки с повтарящи се аборти, като инверсии, инсерции, се откриват в по-нисък процент.

Бройните хромозомни аберации, намерени при такива двойки, включват основно половите хромозоми и са представени най-често под формата на мозаицизъм. Значително високият процент мозаицизъм по половите хромозоми, предполага неговото значение при репродукцията (особено за *неуспешната асистирана репродукция*), въпреки, че наличието му в различните тъкани и последиците от него все още не са установени и напълно проучени (128,132,186).

Въз основа на направения литературен обзор отчита ме, че хромозомните аберации играят една много важна роля при двойки с репродуктивни проблеми. Аберациите варират от 3% до 11%, като средния процент не се отличава съществено в различните описани проучвания.

I.4. Хромозомен полиморфизъм при пациенти с РН

I.4.1. Терминология

Хромозомните промени включват и т.н. **хромозомни полиморфни варианти**. Като синоними се използват още термините хетероморфизми, полиморфизми или нормални варианти. Термина “вариант” е предложен от Парижката конференция за Стандартизация в Човешката цитогенетика, 1971 г., за случаи, в които се наблюдава девиация от нормалната хромозомна морфология, докато в допълнение на същата конференция от 1975г., терминът хетероморфизъм се препоръчва при описание на хромозоми с променливи бендове (87).

Хромозомният полиморфизъм представлява вариант в хромозомен хетерохроматинов регион. За да бъдат класифицирани като такъв е необходимо този регион да бъде поне два пъти по-голям от аналогичния му в хомоложната хромозома. Такива полиморфизми се наблюдават в хетерохроматиновите региони в дългите рамена на парацентричните хромозоми 1,9,16, в късите рамена на акроцентричните хромозоми от D и G групи - 13,14,15,21 и 22, и в крайния хетерохроматинов участък в Y-хромозомата. Увеличаването в големината на хетерохроматиновия участък в парацентричните хромозоми се отбелязва като: 1qh+, 9qh+, 16qh+ и Yqh+. Хетерохроматинът може да бъде и редуциран в тези хромозоми, съответно 1qh-, 9qh-, 16qh-, Yqh-. Разликата в дължината на сателитите в късите рамена на акроцентричните хромозоми се отбелязва като: 13ps+, 14ps+, 15ps+, 21ps+, 22ps+. Понякога освен в сателитите, разлика се наблюдава и в дължината на стълбчетата в късите рамена на тези хромозоми - pstk+ (например 15pstk+) (1,2). За хромозомен полиморфизъм се смята и инверсията на хетерохроматиновия участък в хромозома 9: inv(9)(qh).

Хромозомният хетероморфизъм се обуславя от количествени и качествени (структурни) варианти на хетерохроматина и съдържащите се в него различни повторени секвенции от сателитна ДНК. *Факултативният* хетерохроматин не е богат на сателитна ДНК и не е много полиморфен, докато *конститутивният* е съставен от различни фамилии сателитна ДНК с дължина от 100 kb до няколко Mb, и се характеризира с висока полиморфност и нестабилност (123). Т.к. хетерохроматиновите региони се състоят от повтарящи се секвенции на сателитна ДНК които не кодират протеини, хромозомните полиморфизми се считат за нормални цитогенетични варианти (202). От друга страна, повтарящите се секвенции от не кодираща ДНК, локализирани на няколко мегабази един от друг в някои от хетерохроматиновите региони на хромозомите, се предполага, че

могат да допренесат за неправилната рекомбинация на хомоложните двойки по време на клетъчното делене отговорни за индуцирането на хромозомни аберации като инверсии, делеции или дупликации. За изясняване на това, детайлното изучаване на хетерохроматина и идентифицирането на неговите генетични и/или епигенетични механизми на действие върху редица клинични състояния като стерилитет и повтарящи се спонтанни аборти, са обект на изследване на много съвременни проучвания (121,193).

I.4.2. Роля и клинично значение на хромозомните полиморфизми

Вариациите на хетерохроматиновите региони са относително чести в нормалната популация, поради което дълги години са се приемали за норма. Повечето полиморфни варианти са фамилни и следват Менделовия тип унаследяване от едно поколение в друго с нисък мутационен процент (29). Де novo появилите се полиморфни хромозомни варианти са по-редки и възникват вероятно като резултат от неправилен кросинговър между хетерохроматиновите региони на хомоложните хромозоми по време на мейозата. Това е възможно поради сливане на повтарящите се ДНК сенквенции. Т.к. тези хетерохроматинови варианти са с големи размери се предполага, че те са клинично позначими в сравнение с онези, които са унаследени от предишни поколения (123,146).

В последните години все повече проучвания отчитат повишена честота на хромозомни полиморфизми в двойки с РН и изказват различни теории и хипотези относно участието на тези хетероморфизми в тези нарушения (181).

Повечето от тях потвърждават клиничния ефект на хромозомния хетероморфизъм при двойки с инфертилитет и с повтарящи се СПА, като отчитат 3-5 пъти по-висока честота на полиморфизмите в случаи с РН (10-15%) в сравнение с нормалната популация (2-5%) (15,199).

Относно половото съотношение, мъжете показват по-голямо присъствие на хромозомни полиморфизми, което се дължи на наличието на различни варианти в Y-хромозомата.

I.4.2.1. Хромозомен полиморфизъм по хромозома 9

От парацентричните хромозоми, *хромозома 9* присъства с най-висок процент от морфологични варианти. Варианти, като 9qh+, 9qh- или inv(9)(p11-q13) са чести находки в рутинната цитогенетика, респективно с честота приблизително 8%, < 1% и около 1,5% (175). Наличието на хетерохроматин в късо рамо (9ph+), или едновременно и в дълго и късо рамо (9phqh), както и 9cenh, са още варианти на хромозома 9. Някои проучвания посочват, че голяма част от унаследените варианти почти винаги се състоят от малък

брой повтарящи се или сегментни дупликации и, че хромозома 9 е високо полиморфна в структурно отношение с висок процент на интра- и интерхромозомни дупликации. Сегментни дупликации, намиращи се близо до центромера и до хетерохроматиновия блок съставляват около 7% от хромозома 9 и се счита, че те предразполагат и опосредстват структурни преустройства в региона около центромера. Общата честота на полиморфизмите в хромозома 9 е около 1,5% в общата популация (102).

В някои проучвания, откритият 9qh+ вариант се асоциира с повтарящи се СПА и с новородени с малформации. По-високият процент на 9qh+, намерен в деца с *de novo* възникнали хромозомни аберации (8%) в сравнение с нормални новородени (0,04%), предполага неговата значителна роля в хромозомното неразделяне (28). Големият хетерохроматинов блок може да причини хромозомно нарушение и мейотично задържане, което от друга страна да доведе до аборт (146).

Перицентричната инверсията в хромозома 9 е най-често срещания полиморфен вариант на хромозома 9 и най-разпространената балансирана структурна хромозомна аберация в човешката популация. Съгласно различни проучвания тази инверсия се среща в 1-3% от генералната популация, като точното значение на този феномен е все още неясно (129). В хода на оценяването и, е трудно да се прецени дали се касае за хромозомна аберация или за полиморфен вариант. Прегледа на литературата показва, че инверсиите в хромозома 9 с различни точки на счупване могат да причинят различни смущения в нейните носители. Перицентричните инверсии, като $inv(9)(p11;q12)$ и $inv(9)(p11;q13)$, са най-чести и повечето цитогенетици ги считат за вариант на норма. Въпреки, че били категоризирани като малки хромозомни преустройства които нямат фенотипна изява, много доклади в последните години отчитат връзката на тези инверсии със субфертилитета, повтарящите се аборти, както и с редица други клинични състояния (миотонична дистрофия, биполярно разстройство и шизофрения, остра миелоцитна и лимфобластна левкемия и др.) (53,129).

Напоследък перицентричната инверсия в хромозома 9, особено варианта $inv(9)(p11;q13)$, се съобщават основно във връзка с РН. Доказателство за това е, че все повече изследователи посочват нарастване случаите на „субфертилитет“ в носители на тази инверсия. Все повече доклади съобщават по-голяма честота на перицентричната инверсия при инфертилни двойки и такива с повтарящи се СПА. Високата стойност при двойки с повтарящи се аборти индикира по-лесното предаване на родителска инверсия в техните потомства, което се асоциира с по-голям брой аборти (53). Тази малка инверсия може да доведе до рекомбинации с летални делеции или допълнителни големи

фрагменти, а наличието на генетично небалансирани гамети в процеса на фертилизация са една добре позната причина за спонтанни аборти. Това дава основание да се предположи нейната роля при ранните СПА (53).

В последните години се предоставят и редица доказателства за връзката на перичентрината инверсия в хромозома 9 с мъжкия инфертилитет. Този феномен може да бъде по-ефективен в мъжките партньори, поради тяхната по-висока степен на мейотично делене (129). Много проучвания посочват значително повишаване на хромозомните анеуплоидии в сперматозоидите и ембрионите на мъже носители на такава инверсия (102,126). Перичентричната инверсия в хромозома 9 се счита, че играе значителна роля в хромозомното неразделяне и има променлив ефект върху сперматогенезата, от азооспермия и тежки промени в морфологията на сперматозоидите, до промени в мотилитета и мейотичната сегрегация. В хромозомите с инверсия, една бримка ще бъде формирана през мейоза I, което може да доведе до производството на абнормни и небалансирани гамети. Във връзка с това, носителите на такава инверсия ще имат значително по-висок риск от потомство с небалансиран кариотип (110,146). При някои от тях, повишеният риск от небалансирано потомство варира в границите от 1-10% (53).

От казаното дотук следва, че носителите на перичентрични инверсии в хромозома 9 имат значително по-висок риск от повтарящи се СПА, мъртвородени, пренатални загуби, неонатална смърт, малформативни фетуси и потомство с УМИ, в сравнение с нормалната популация. Ако перичентричната инверсия е намерена в жената, риска от плод с малформации е 9%, а риска от СПА за тази жена е 25%. Ако перичентричната инверсия се носи от мъжа, рисковете са съответно 5% за малформативен фетус и 15% от спонтанни аборти. Общо риска в това семейство е 30-50% (53).

Въпреки, че хромозомните полиморфизми са приети за вариант на норма, още през 80-те и 90-те години на миналия век се изказва предположение, че някои от хромозомни варианти, основно инверсията на хетерохроматиновия регион в хромозома 9, имат отношение към репродукцията и потомството. По него време перичентричната инверсия била често срещана в семейства с родени деца със синдром на Даун, поради което редица автори съобщават за относително повишен риск от потомство с тризомия 21 при носители на такава инверсия (137,162,163,195). По-късно през годините перичентричната инверсия е намерена с повишена честота и при други семейства с абнормно поколение (53). Това потвърждава връзката на носителите на такава инверсия със значително по-високия риск от създаване на потомство с небалансиран кариотип (110,146). Този повишен риск варира в границите от 1-10% (53).

Инверсията на хетерохроматиновия блок в хромозома 9 и нейната роля в репродукцията е обект на засилен интерес и в последните години, поради факта, че тя е най-често срещания тип хромозомен полиморфизъм в двойки с РН (121). В общата популация честотата и варира в границите 1-3%. Повечето автори в своите проучвания върху двойки с РН, съобщават честоти на перичентричната инверсия в хромозома 9 близки до тази в нормалната популация, съответно 2,5% (130); 3,7% (121); 2,27% (122); 1,2% (15); 2,05% (82); 3,9% (55). Най-висок процент (6,7%) намират *Demirhan O, et al.* (53), а *Sheth FJ, et al* (165) - най-нисък (0,5%). Спрямо другите полиморфни варианти обаче, перичентричната инверсия показва значителен превес в тази група пациенти. Нейната честота се среща в границите от 15,4% (15); 32% (165); 33,3% (82); 33,6% (122) до 36,3% (121). Въпреки, че не се отчита значителна разлика в честотата и в сравнение с тази в нормалната популация, факта, че това е най-често срещаният хромозомен полиморфизъм в двойки с РН, предполага нейната съществена роля при инфертилитета и ранните СПА.

От останалите полиморфни варианти в хромозома 9, 9qh+ е най-често срещаният: 3,67% (72); 2,53% (32); 1,11% (121); 5,5%, 5%, 0,9% (123).

I.4.2.2. Хромозомен полиморфизъм по Y хромозома

Y хромозомата показва широки граници на вариации не само между отделни индивиди, но и между различни популационни групи. Именно полиморфните варианти в Y хромозомата са причина за по-високата честота на полиморфизъм при инфертилните мъже в сравнение с тези при инфертилните жени. Данните за клиничната значимост на полиморфизмите в Y хромозомата относно фертилността са все още противоречиви. Предполага се, че те могат да имат вредни ефекти и, че играят важна роля за мъжкото безплодие, чрез въздействието им върху разнообразни физиологични процеси, включително сперматогенезата и качеството на спермата (199).

Инверсията в Y хромозомата е най-честия вариант съобщаван в различни проучвания (165,166). Относително високото му разпространение предполага, че инверсията е най-честата хромозомна промяна, свързана с многократна загуба на бременност (113,165). *García-Peiró A, et al.*, в своето проучване установяват, че има значително високи мейотични изменения и анеуплоидия, високо фрагментиране на дезоксирибонуклеинова киселина на сперматозоидите и променени параметри на спермограмата сред мъжете с инверсия в Y хромозомата (65). От анализа на литературни

данни може да се предположи, че инверсията в Y хромозомата най-вероятно е свързана с по-високата честота и поява на повтарящи се загуби на бременност (165).

Варианта Yqh⁺ също е докладван във връзка с РН (146). Неговата честота е статистически значително по-висока при мъже с мъжки фактор (азооспермия, олигоастенозооспермия и др.), както и при такива с комбинирана репродуктивна история в семейството. По-големият размер на хетерохроматновият блок в Y хромозомата, би могъл да се асоциират с инхибирането на генната транскрипция, поради “silencing” ефекта на гените/генните промотори разположени в близост, особено на тези отговорни за сперматогенезата и фертилитета/инфертилитета (123).

След създаването на генетични карти на Y хромозомата и картографиране на различни кандидати фертилни гени в дългото рамо на Y хромозомата става ясно, че специфичният за мъжа регион се състои от редуващи се хетерохроматинови и еухроматинови секвенции. Това е още една причина да се мисли, че хетерохроматиновите варианти на Y хромозома могат да се асоциират с инфертилитета, посредством индуцирането на епигенетични промени (134).

За влиянието на Y хромозомните полиморфизми върху мъжкия инфертилитет има редица проучвания. Докладвани са честоти от 27,4% (199); 29,2% (123); 30,7% (132); 65,1% (73) от общия брой изследвани мъже, като по-висока е честота на полиморфизми при мъже с тежка олигозооспермия - 21,5%, 37,12% (132,73), в сравнение с тези с азооспермия - 15,9%, 27,27% (132,73). От тях, вариации в дължината на хетерохроматиновия регион на Y хромозомата е най-често срещаната форма на полиморфизъм, като в повечето доклади е намерен по-висок процент на Yqh⁺ варианта: 91,9% (123); 86% (73); 90% (199).

Изключение правят *Nagvenkar P, et al. (132)*, които съобщават по-висок процент на Yqh⁻ варианта (88,9%) и едва 11,1% за Yqh⁺ варианта. Много нисък процент на Y хромозомен полиморфизъм (10,7% от ХП при мъже), докладат *Turan GA, et al. (190)*.

Повишено присъствие на Y хромозомен полиморфизъм се докладва и в двойки с повтарящи се СПА. *An C, et al.* намират 7,74% полиморфизъм, от които 60,7% се дължат на варианти в Y хромозомата. От тях, вариациите в дължината на Y хромозомата заемат 93,8% (15).

Според други проучвания, от полиморфните варианти на Y хромозомата, invY е с най-голямо значение за повтарящите се загуби на бременност. Честотата на намерената invY в мъже в двойки с повтарящи се СПА варира от 2,22% до 30,5% (166). *Sheth FJ, et al., (165)* в свое проучване върху двойки с повтарящи се СПА, отчитат 2,4%

полиморфизми в мъжките партньори, измежду които инверсията в Y хромозомата била най-често срещаният вариант (76,2%). Съгласно авторите от тези проучвания, както Yqh⁺ варианта така и invY могат да се асоциира с повишен риск от аборт, като се има в предвид ролята на хетерохроматина в мейозата (132,144,165).

I.4.2.3. Хромозомен полиморфизъм по акроцентрични хромозоми

Полиморфизмът в *acrocentricните хромозоми* (сателитен полиморфизъм), се изразява във вариации в късите им рамена и свързаните с тях сателити. Те се дължат на различия в количеството на повторените ДНК секвенции, както и вероятно на разлики в броя на рибозомалните гени в тези райони. Късите рамена на акроцентричните хромозоми са съставени от три бенда - p11, p12 и p13, като p11 и p13 съдържат няколко типа тандемно повторени ДНК-и (проксимални сателити и дистален бета-сателит за p11 и проксимално бета-сателитна ДНК и терминално теломерни секвенции за p13), а p12 бенда включва ядренеобразуващи райони (NOR) състоящи се от множество копия рибозомална РНК (рРНК) (124). Т.к тези повтори не кодират протеини, хромозомните полиморфизми се считат за нормални цитогнетични варианти.

Повишена честота на сателитни варианти обаче, била наблюдавана при деца с психиатрични проблеми и пациенти с РН в сравнение с общата популация (28). **Hassold TJ and Jacob PA, (78)**, докладват, че акроцентричните хромозоми са въввлечени в една трета от тризомиите наблюдавани в спонтанни аборти и живо родени. Предполага се, че наличието на NOR във всичките пет акроцентрични хромозоми ги предразполага към асоциация. Именно по-високата тенденция за сателитна асоциация на акроцентричните хромозоми може да повиши риска от тяхното неразделяне и формирането на анеуплоидии при тези пациенти (178). Освен склонността към асоциация, големите сателити в късите рамена на акроцентричните хромозоми (поради големия размер на този допълнителен материал), също могат да доведат до неправилна хромозомна сегрегация по време на мейозата и от там до загуба на плод, макар че както е очевидно, те се срещат и в нормалната популация. В този смисъл хромозомния хетероморфизъм има по-голямо значение при изследване на двойки с повтарящи се СПА (77).

От акроцентричните хромозоми на група D, хромозома 15 показва по-висок полиморфизъм в сравнение с хромозоми 13 и 14 и се асоциира по-често с повтарящи се загуби на бременност. Счита се, че при двойки с РН има превес на мъже носители на 15ps⁺ вариант, въпреки че според последните данни се наблюдава равно участие на този полиморфизъм при двата пола (77).

Честотата на полиморфните варианти на акроцентричните хромозоми варира в различните проучвания от 2,05% (83); 3,2% (55); 3,33% (190); 4,65% (32). Много нисък процент съобщават *Mierla D, et al.* (0,99%) (122) и *Sheth FJ, et al.* (0,12%) (165). Най-често срещаният вариант е този на хромозома 15 - 2,2% (32); 1,7% (190). Значително по-висока честота на полиморфизмите по акроцентричните хромозоми намират *Minocherhomji S, et al.* (123) - 24,52%. Полиморфизмът засягащ стълбчетата на акроцентричните хромозоми е 18,73%, а този по сателитите им е 5,79%. Най-много акроцентрични варианти и при жените и при мъжете, авторите намират в групите с инфертилитет и в тези с комбинирана репродуктивна история, съответно 10,3% и 8,78%. В групата с мъжки фактор процента е 7,1% (123).

I.4.2.4. Хромозомен полиморфизъм по хромозома 1 и хромозома 16

Полиморфните варианти в хромозома 1 и хромозома 16 са представени с различна честота в различните популации и региони. Вариации на хетерохроматиновият блок в хромозома 1 се съобщават от някои автори във връзка с фетална загуба, повтарящи се аборти или малигнени заболявания. Варианта 1qh⁺ се асоциира с вродени аномалии и множество аборти. Среща се с повишена честота при жени с първичен инфертилитет и при мъже с азооспермия (122). Инверсията на хетерохроматиновият блок в хромозома 1, която като цяло се счита, че няма фенотипен изява, се свързва с инфертилитета в такива двойки (28). Полиморфният вариант 16qh⁺ най-често се асоциира с вродени сърдечни заболявания и почти няма ефект върху репродукцията. Хетерохроматиновия сегмент не участва в кросинговъра така че хромозомния вариант 16qh⁺ не оказва влияние в гаметогенезата (171). Нейната честота е почти еднаква в засегнатата и в нормалната популация. В инфертилните мъже тя варира от 0,9 до 1,9% при честота 0-6% в нормалната. Другите два варианта, 16qh⁻ и inv(16)(p11;q11), се срещат в границите съответно от 0,04% - 23,6% и 1,4% в общата популация (146).

Честотата на вариантите по хромозоми 1 и 16 е доста по-ниска. За хромозома 1 тя варира от 0,4% (55), 1,22% (122); 1,25% (190), 1,83% (199). Варианти в хромозома 16 се срещат в 0,4% (55); 0,28% (122); 0,6% (82); 1,04% (190).

I.4.3. Обобщение на значението на хромозомните полиморфизми върху РН

Значението на хромозомните полиморфизми за репродукцията, може да бъде оценено чрез анализ на различни проучвания проведени през годините. Много от тях докладват повишено присъствие на полиморфни варианти при двойки с РН, което е предпоставка за създаване на различни теории относно участието на тези полиморфизми

в репродукцията (181). Честотите на полиморфизмите в проучванията на *Gonçalves RO, et al*, *Düzcan F, et al.* и *Mierla D, et al.* са съответно 5,2%, 5.9% и 6,74%. По-висока честота докладват *Turan GA, et al.* (8,9%), *Boronova I, et al.* (10,02%) и *Xu X, et al.* (11,9%).

По отношение на групите РН, *Düzcan F, et al.* (55), намират по-висок процент полиморфизми при пациенти с **повтарящи се аборти** (7.5%), спрямо тези с инфертилитет (3.1%). Обратно, съгласно данните на *Minocherhomji S, et al.* (123), честотата на намерените варианти е значително по-висока в групата на двойки с първичен инфертилитет (11,7%) в сравнение с тази повтарящи се СПА (2,9%). Значително присъствие на хромозомни полиморфизми авторите отчитат и в групата на двойки с мъртвородени и/или родени деца с малформации (17,7%) (123).

По отношение на **пола**, значително по-високо присъствие на полиморфизми се срещат при мъжете в сравнение с жените. *Turan GA, et al.* (190) намират два пъти повече полиморфизми при мъжете (12%), в сравнение с жените (6%); при *Xu X, et al.* (199), съотношението между двата пола е съответно 77,9% за мъжете и 22,1% за жените. Статистически значително по-висока честота на хромозомни варианти в инфертилни мъже (58,68%) в сравнение с инфертилни жени (28,31%) намират и *Minocherhomji S, et al.* (123).

Понастоящем връзката между хетерохроматиновите варианти и репродуктивните нарушения все още е противоречива. Статистически значимия намерен по-висок процент на хромозомни полиморфизми при пациенти с РН изисква да се отчете тяхната роля при инфертилитета и субфертилитета. Въпреки това, етиологичният механизъм, обясняващ това явление, все още не е описан. Хетерохроматиновите региони съдържат значително количество повтаряща се ДНК, която е хетерогенна, а хромозомните варианти са израз на морфологична променливост, свързана с промени в количеството на хетерохроматина. Смята се, че хетерохроматина при хромозомните полиморфизми може да регулира генната експресия чрез обратима трансформация между хетерохроматина (некодиращи ДНК последователности) и еухроматин (експресирани ДНК последователности) (61,135).

Предполага се, че хромозомните хетероморфизми могат да имат решаваща роля в геномната регулация и модулация по време на репродукцията, тъй като тя е сложен биологичен процес, който изисква геномна регулация и експресия на различни нива. Това би могло, до известна степен, да изясни липсата на клиничен фенотип в носители на хетероморфни варианти извън инфертилитета или повтарящите се СПА (181).

Освен това се счита, че хетерохроматиновия регион около центромерите на акроцентричните хромозоми играе роля в прикрепването им към делителното вретено, сдвояването на хромозомите и клетъчното делене. По този начин прекъсването в тези хетерохроматинови региони всъщност може да има последствия върху генната експресия, засягаща образуването на гамети, оплождането и ембриогенеза (181). Нещо повече, това прекъсване може да доведе до дефект в хромозомата и хроматидната кохезия. Тази дефектната кохезия обикновено индуцира малсегрегация, което увеличава риска от хромозомна анеуплоидия (83).

Допуска се също, че скрити функционални гени са локализирани в хетерохроматиновите региони на дългите рамена (q) на хромозоми 1, 9, 16 и Y. Очаква се, че те регулират клетъчната функция в репродуктивния процес и по този начин хетерохроматиновите варианти на тези региони могат да се асоциират с РН (32).

Въпреки нарастващият брой теории относно корелацията на хетероморфизмите с повтарящите се СПА и инфертилитета, се изискват допълнителни изследователски проучвания, които да уточнят целият механизъм, чрез който тези хетероморфизми проявяват ефекта си върху фертилността. Независимо от това, генетичните консултанти трябва да обърнат внимание на хромозомните полиморфизми, докато точният им механизъм на действие бъде изяснен и верифициран (83).

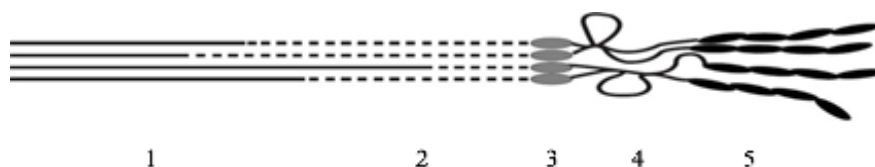
Хромозомните полиморфизми не са единственият определящ фактор за РН. Тяхното по-подробно идентифициране и описание посредством молекулярно-цитогенетични методи обаче, е необходимо, за да се обясни възможната връзка между полиморфизмите и репродуктивните нарушения и се установи етиологичния механизъм отговорен за това.

I.5. Субтеломерни (субмикроскопски) хромозомни преустройства при семейства с РН

I.5.1. Основни понятия

Субтеломерните хромозомни преустройства са структурни пренареждания, които засягат участъци в непосредствена близост до края на хромозомите (*теломерите*) - т. нар. *субтеломерни хромозомни региони*. Теломерите са изключително динамични структури, които служат за „запечатване на края” на хромозомата, а тяхната ДНК се състои от тандемни повтори на прости, богати на TG секвенции (TTAGGG)_n с дължина 2 – 15 kb. Те играят съществена роля за геномната стабилност и успешната хромозомна

репликация, регулация на клетъчния цикъл, стареенето на клетката, придвижването и разположението на хромозомите в ядрото и транскрипционната регулация на субтеломерните гени (45,59). Проксимално от края се намира структурно комплексен регион от субтеломерна ДНК, който заема площ от няколкостотин kb и показва висока степен на полиморфност. Анализ на секвенциите, разположени в близост до теломерите на хромозомните региони 4p, 16p, 22q, показва наличие на интерстициален дегенериран повтор TTAGGG, който подразделя субтеломерния регион на дистална и проксимална част. Секвенциите в дисталната част са къси и сходни за много хромозоми, а в проксималната – дълги и сходни само за няколко хромозоми (фиг.2). Именно, високата степен на сходство в секвенциите води до т.н. ‘cross talk’ между теломерните региони и процес на хромозомни преустройства в тях (99).



Фигура 2. Организация на субтеломерния хромозомен регион: 1: Уникална хромозомна секвенция; 2: Проксимална субтеломерна секвенция; 3: Дегенерирали (TTAGGG)_n; 4: Дистална субтеломерна секвенция; 5: (TTAGGG)_n повтори (99)

Субтеломерните хромозомни региони са богати на сегментни дупликации (СД), които представляват блокове с големина 10 – 400 kb. СД заемат над 5% от човешкия геном и притежават над 97% идентичност помежду си, като по този начин осигуряват субстрат за междухромозомна или вътрехромозомна (междухроматидна) неалелна хомоложна рекомбинация (НАХР) и правят склонен към пренареждания региона, в който се намират. СД могат да съдържат гени, фрагменти от гени, псевдогени, ендогенни ретровирусни секвенции или други паралогови секвенции. По механизма на НАХР и в зависимост от ориентацията на използваните за рекомбинантни субстрати секвенции, могат да се получат делеции или реципрочни дупликации (при директно ориентирани СД) или инверсии (при обърнати СД). За разлика от другите повтори, СД често са разположени в центромерните или теломерните хромозомни области.

Светлото оцветяване на тези региони при цитогенетичен анализ с рутинното GTG-лентово диференциално оцветяване и малките им размери (под 5 Мб) затруднява детекцията на пренареждания в тях чрез конвенционалната (светлинно-микроскопска) диагностика. Тяхното разкриване става възможно след въвеждането на

високорезолютивна молекулярно цитогенетична техника - *субтеломерен Fluorescent in situ hybridization (FISH)*, използваща теломер-специфични сонди за всяка хромозома.

Въвеждането на този метод за анализ на субтеломерните хромозомни региони допринесе за откриването на причините за повтарящи се СПА в още 3,34% от двойките с PH (27,35,44,56,71,75,88,93,125,150,194,200).

I.5.2. Методи за откриване на субтеломерни преустройства

Въвеждането на молекулярно-цитогенетичните методи доведе до рязко подобряване на диагностичните възможности. За откриването на субтеломерни балансиращи хромозомни преустройства се прилага основно FISH техниката.

Субтеломерен Fluorescent in situ hybridization (субтеломерна FISH)

Прилаганата за анализ на субтеломерните хромозомни региони **субтеломерна FISH**, използва специфични за отделните хромозоми теломерни сонди (101). Тяхното разположение трябва да е избрано така, че да бъдат едновременно уникални и максимално теломерно разположени. Такива са т.н. първо поколение уникални теломерни сонди. Те съдържат първоначален набор от 33 уникални теломерни клона, за които се знае, че се намират на 300 kb от хромозомния край и 8 клона, представляващи дистални маркери от участъците, където не може да се установи истински теломер (5).

За да бъдат уникални, сондите би трябвало да са по-близо до центромера, но така по-теломерно разположена аберация е възможно да бъде изпусната. От друга страна при навлизане в по-теломерните участъци, където броят на общите субтеломерни секвенции расте, съществува риск от неспецифична хибридизация и неразпознаване на точния произход на хромозомния материал. Това се преодолява с използване на ново поколение P1, PAC и BAC сонди, представени за всички хромозомни теломери (с изключение на късите рамене на акроцентричните хромозоми), при което сондите са максимално дистално разположени (~500 kb от краищата на хромозомите) (99). Тази технология позволява детекцията на малки делеции, дупликации и транслокации включващи теломерни и субтеломерни региони. Изключение правят късите рамена на акроцентричните региони, съдържащи повтарящи се секвенции и сателитна ДНК, но делециите и дупликациите в тях нямат фенотипна изява (36).

Сондите използвани при FISH техниките съдържат директно белязан набор от второ поколение теломерни PAC/BAC клонове и някои от оригиналните космидни клонове от първо поколение, които хибридизират върху метафазни хромозоми. Делеция се установява, когато липсва сигнал на съответния хромозомен терминален участък, а амплификация – когато броят на сигналите е увеличен. Наличието на метафазни

хромозоми позволява веднага да се определи локализацията на аберацията, а също така да се разграничат и анализират балансиранни или небалансиранни транслокации. Сондите за късото (p) и дългото (q) рамо за съответната хромозома са белязани с различно багрило – p-рамото в зелено, а q-рамото - червено (5).

В последните години са разработени и прилагани и други разновидности на FISH техниката: *multicolor* (многоцветен) *FISH* (*mFISH*), който представлява една от най-мощните техники и позволява визуализацията на сложни хромозомни преустройства и интерстициални транслокации неуловими с други методи; *SKY* – *техниката*, при която уникалната спектрална характеристика на всяка хромозома дава възможност за софтуерно автоматизирано кариотипиране на хромозомия набор.

Различните FISH технологии, прилагани самостоятелно или в комбинация, дават възможност за идентифициране на микроделеционни синдроми, скрити дупликации и транслокации, комплексни преустройства и маркерни хромозоми, които не могат да бъдат диагностицирани при конвенционалната цитогенетична техника (36).

I.5.3. Значение на субтеломерните хромозомни преустройства при пациенти с РН

Идентифицирането на „скрити“ субтеломерни хромозомни преустройства в семейства с РН, основно такива с с ранни СПА, както и с родени деца с УмИ и МВА е обект на активни проучвания в последното десетилетие. Въз основа на тях се отчита важността на търсенето на такива преустройства при двойки с репродуктивни проблеми с неясна етиология.

В по-голяма част от проведените проучвания се потвърждава необходимостта и значимостта от търсенето на субтеломерни преустройства в пациенти с неизяснена етиология на повтарящи се СПА, в комбинация с мъртвородено и/или с дете с МВА и/или УмИ (35,71,75,93,125,150,194,200). Липсата или niskият процент на субтеломерни преустройства открити при други проучвания, кара тези автори да считат, че тези преустройства са редки и без съществен принос при пациенти с множествени спонтанни аборта (27,44,56,88). Повечето от тях обаче, отчитат ролята им в случаите, когато една двойка, освен аборти, има и родени деца с малформации и/или УмИ, репродуктивни проблеми от комбиниран тип (27,44,56,125). Обяснението е свързано с различните типове хромозомна сегрегация в реципрочните транслокации, които могат да доведат до загуба на плод, както и до раждане на дете с аномалии в семейства, носители на такива. Преживяемостта при небалансиранни хромозомни преустройства е била оценена на 5% от хаплоидната автозомна дължина за пълни тризомии и 3% за пълни монозомии,

въпреки, че при комбинирани небалансирани преустройства, стойността не превишава 3.6% за тризомии и 0.6% за монозомии. Следователно, поради малкият размер на хромозомните сегменти, участващи в субтеломерните транслокации, последните са малко вероятно да предизвикат само спонтанни аборти. Смята се, че те могат да бъдат отговорни за РН от комбиниран тип – ранни СПА и деца с МВА/УМИ. На базата на това, авторите стигат до извода, че търсенето на субтеломерни балансирани преустройства чрез FISH в дадена двойка, трябва да се провежда само след зачеването на плод и/или раждането на дете с характеристика на хромозомна болест (194).

Диагностицирането може да разкрие етиологичните причини за РН в дадена двойка, като открива генетичния механизъм отговорен за тях. По този начин ще бъде възможно провеждането на пълноценно генетично консултиране, оценяване на риска за следваща неуспешна бременност, пренатална диагностика и предотвратяване раждането на друго засегнато дете в семейството.

I.6. Обобщение на литературните данни

В резултат на задълбоченото проучване на достъпната литература през годините, може да се обобщи, че относителния дял на двойките с РН в световен мащаб нараства непрекъснато. Въз основа на него се отчита, че хромозомните аберации играят една много важна роля при двойки с РН. Аберациите варират от 3% до 11%, като средния процент не се отличава съществено в различните проучвания.

От структурните хромозомните нарушения с най-голямо значение са **транслокациите**. Носителите на балансирани транслокации, макар и без видима фенотипна изява, имат много често проблеми в репродукцията: по-висок риск от повтарящи се СПА, инфертилитет и раждането на деца с малформации. Относителният дял на балансирани транслокации при такива двойки е по-висок при жените отколкото при мъжете, поради това, че те са съвместими с фертилността при тях, докато при мъжете, те могат да бъдат асоциирани с тяхната инфертилност, т.к. могат да доведат до увреждане в сперматогенезата. Другите хромозомни преустройства като **инверсии**, **инсерции**, свързани основно с повтарящи се аборти, се откриват в по-нисък процент.

От **бройните** хромозомни аберации, намерени при двойки с РН, най-чести са тези по половите хромозоми, представени обикновено под формата на **мозаицизъм**. Намереният значително висок процент мозаицизъм по половите хромозоми, предполага неговото значение при репродукцията, въпреки, че наличието му в различните тъкани и последиците от него все още не са установени и напълно проучени.

Понастоящем връзката между **хетерохроматиновите варианти** и РН все още е противоречива. Статистически значимия намерен по-висок процент на ХП при пациенти с РН изисква да се отчете тяхната роля при инфертилитета и субфертилитета. Въпреки това, етиологичният механизъм, обясняващ това явление, все още не е изяснен. Хетерохроматиновите региони съдържат значително количество повтаряща се ДНК, която е хетерогенна, а хромозомните варианти са израз на морфологична променливост, свързана с промени в количеството на хетерохроматина. Смята се, че хетерохроматина при хромозомните полиморфизми може да регулира генната експресия чрез обратима трансформация между хетерохроматина (некодиращи ДНК последователности) и еухроматин (експресирани ДНК последователности). Предполага се, че хромозомните хетероморфизми могат да имат решаваща роля в геномната регулация и модулация по време на репродукцията, което би могло, до известна степен, да изясни липсата на клиничен фенотип в носители на хетероморфни варианти извън инфертилитета или повтарящите се СПА.

Въпреки нарастващият брой теории относно корелацията на ХП с повтарящите се СПА и инфертилитета, се изискват допълнителни изследователски проучвания, които да уточнят целият механизъм, чрез който тези хетероморфизми проявяват ефекта си върху фертилността. Независимо от това, генетичните консултанти трябва да обърнат внимание на хромозомните полиморфизми, докато точният им механизъм на действие бъде изяснен и верифициран.

Идентифицирането на **субтеломерни хромозомни преустройства** е особено важно и показателно при двойки с неясна етиология на повтарящи се СПА, в комбинация с мъртвородено и/или с дете с МВА и/или УМИ. Обяснението е свързано с различните типове хромозомна сегрегация в реципрочните транслокации, които могат да доведат до неуспешна имплантация, спонтанен аборт, мъртвораждане или раждане на увредено дете в семейства, носители на такива. Малкият размер на хромозомните сегменти, участващи в субтеломерните транслокации, са малко вероятно да предизвикат само спонтанни аборти, но се счита, че те могат да бъдат отговорни за РН от комбиниран тип – ранни СПА и деца с МВА/УМИ.

Правилното диагностициране може да разкрие етиологичните причини за РН в дадена двойка, като открива генетичния механизъм отговорен за тях. По този начин ще бъде възможно провеждането на пълноценно генетично консултиране и възможност за рационално семейно планиране на двойката, оценяване на риска за следваща успешна/неуспешна бременност, извеждане на показание за асистирана репродукция, пренатална диагностика и предотвратяване раждането на друго засегнато дете в семейството, профилактика на настъпила бременност.

II. РАБОТНА ХИПОТЕЗА

Към настоящия момент у нас няма публикувани широко обхватни проучвания за комплексна оценка на хромозомните нарушения и полиморфни варианти чрез конвенционална цитогенетика при пациенти с РН. Рутинното цитогенетично изследване дава възможност за намиране на балансирани хромозомни преустройства средно в 5,5% (2-8%) от двойките с РН. Този метод обаче ограничава откриването на аберации до размер над 5 – 10 Мб и при голяма част от лицата с РН се установява структурно и бройно нормален кариотип, като при липса на клинични и лабораторни данни за друга причина, диагнозата остава неясна. В нашата страна не са докладвани и резултати по приложение при тези пациенти на молекулярно-цитогенетични методи, които са с по-висока резолюция, насочени към конкретни хромозомни региони (т.н. субтеломерна FISH). Очаквано е в около 3% от случаите на идиопатично/етиологично неизяснени РН да са налични различни пренареждания в областта на субтеломерните хромозомни региони.

Комбинираното използване на класическа и молекулярна цитогенетика значително повишава възможността за намиране и уточняване на хромозомните нарушения и хромозомни полиморфизми, участващи в генезата на репродуктивната недостатъчност. Прилагане на тези методи има смисъл както в конкретен план за търсене на причината за РН в засегнатите семейства, така и за извеждане на статистически значими популационни данни в полза изготвяне на стратегия за поведение и проследяване на евентуални бременности в широк обхват. В помощ на най-масовата индикация за генетично консултиране, изясняването на генетичните причини на клетъчно и субклетъчно ниво обогатява познанието за целите на репродуктивната прогноза на семейството, подхода за семейно планиране и пренатално и предимплантационно действие.

Това прави темата все още актуална и ни провокира да разработим настоящия дисертационен труд.

II.1. Цел

Настоящият дисертационен труд има за цел да установи и анализира вида, честотата и клиничното значение на хромозомните (конвенционални и субмикроскопски) нарушения и хромозомните полиморфни варианти при пациенти с репродуктивни нарушения (инфертилитет, спонтанни аборти, мъртви раждания, родени деца с малформации със или без изоставане в НПП).

II.2. Задачи

Отговорът на така поставената цел изисква решаването на следните задачи:

Задача 1. Да се селектира обекта на проучването, групира по вид репродуктивно нарушение и характеризира в динамика на развитие за периода на проучването и бъдеща тенденция.

Задача 2. Да се направи комплексна оценка на клинично значимите хромозомни аберации, разкрити чрез конвенционален цитогенетичен метод и значението им според вида репродуктивното нарушение.

Задача 3. Да се проучи честотата, охарактеризират клинично значимите бройни и структурни хромозомни аберации и анализира значението им според репродуктивната група.

Задача 4. Да се проучи честотата, вида и значението на хромозомния полиморфизъм при пациенти с репродуктивни нарушения.

Задача 5. Да се проведе молекулярно-цитогенетичен анализ за разкриване на субтеломерни хромозомни преустройства при пациенти с нормален кариотип от класическия цитогенетичен анализ и комбинирани репродуктивни нарушения.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

III.1. Материал

Клиничен материал

Проучването беше проведено в Лаборатория по медицинска генетика на УМБАЛ „Св.Марина“ ЕАД - Варна и Катедра по медицинска генетика, МУ-Варна, базирана в университетската болница.

Периодът на проучването бе в рамките на 16 години, 2004-2019 г. Дизайнът включва два типа наблюдение: ретроспективно и проспективно. При реализиране на проучването са участвали медицински специалисти от кабинета за медико-генетична консултация, биолози и лаборант.

В проучването са включени **1733** пациента на възраст 16-60 г. с документирана клинична диагноза Репродуктивни нарушения – инфертилитет, СПА, мъртви раждания, раждания на деца с аномалии и/ или УМИ, самостоятелно или в комбинирана репродуктивна история. Те са насочени от друг специалист (основно акушер-гинеколог) или са получили самостоятелно информация от интернет страницата на лабораторията във Facebook. Лекар-генетик провежда генетична консултация и назначава алгоритъм на изследвания за установяване причините за РН в двойката. Включването на тези пациенти в проучването се осъществява на базата на включващи и изключващи критерии. Изследваните пациенти са от Североизточна България.

Селектираните индивиди са изследвани с два основни вида анализи: конвенционален цитогенетичен анализ и молекулярно-цитогенетичен анализ (субтеломерна FISH), като при част от пациентите са приложени и двата вида анализа.

Субтеломерният анализ беше извършен със съдействието на Център по транслационна медицина и клетъчна терапия към УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД - Варна и Катедрата по анатомия и клетъчна биология към МУ- Варна.

Според основните задачи на проучването, пациентите са разпределени както следва:

- Двойки с инфертилитет (стерилитет) с/ без неуспешни АРТ процедури;
- Двойки с два и повече СПА (Препоръки за диагностично и лечебно поведение при репродуктивни неудачи - Европейска Асоциация по Репродуктивна Медицина, 2018);

- Двойки с комбинирана репродуктивна история (СПА в комбинация с мъртво раждане, прекъсната бременност по медицински показания, родено дете с аномалии и/ или УМИ) и фамилна обремененост.

Преди всяко изследване, пациентите подписват формуляр „Информирано съгласие за цитогенетичен анализ“. На по-късен етап, при необходимост, подписват и формуляр за „Информирано съгласие за молекулярно-цитогенетичен анализ“, разработен специално за целите на настоящото изследване (Приложение 1).

Биологичен материал (проби)

Цитогенетичните и молекулярно-цитогенетичните анализи, обект на настоящото проучване, са осъществени със следния биологичен материал:

- клетъчна суспензия (за цитогенетичен анализ и субтеломерна FISH);
- амниотична течност
- кожни фибробласти;
- абортивен материал.

От всеки пациент, преминал през лабораторията по Медицинска генетика - Варна, при който се провежда цитогенетичен и молекулярно-цитогенетичен анализ, се взема венозна кръв чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност - вакутейнери от 4 ml или от 6 ml, съдържащи натриев цитрат (Becton Dickinson).

Останалото количество биологичен материал, след изработване на пробите, се съхранява при -20°C в лабораторията по Медицинска генетика – Варна за 5 години, съобразно медицинския стандарт.

В случаите на мозаични варианти по половите хромозоми, намерени в някои пациенти в резултат на стандартно проведен цитогенетичен анализ, се препоръчва изследването на кожни фибробласти. Вземането на кожни фибробласти се извършва чрез „Пънч биопсия“ в I-ва клиника по Хирургия в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Пънч биопсията се извършва след поставяне на локална анестезия, най-често от предмишница. С помощта на остър, специално конструиран уред, наречен пънч, се взема малко парченце от кожа с цилиндрична форма с размери 10 на 10 мм. Материалът се поставя в стерилно шишенце с физиологичен разтвор и се транспортира до лабораторията по Медицинска генетика.

При двойки с доказано балансирано преустройство в един от партньорите е необходимо изследване на амниотична течност при евентуална следваща бременност с цел пренатално изследване на плода.

При двойки с аборти е желателно изследването и на фибробласти от абортивния материал. За целта, след извършване на аборта от акушер- гинеколога, част от абортивният материал се поставя в стерилно шишенце с физиологичен материал и се транспортира веднага до лабораторията.

Критерии за подбор на пациенти, участващи в проучването

Участниците в проучването са подбрани според критериите за включване и изключване и след подписване на формуляр за „Информирано съгласие за изследване“, одобрено от Комисия по етика на научните изследвания на МУ-Варна (КЕНИ).

За провеждане на конвенционален цитогенетичен анализ

Критерии за включване:

- Възраст над 16 години;
- Двойки с репродуктивни проблеми – инфертилитет, спонтанни аборти, мъртвородени, родени деца с увреждания и/или умствено изоставане;
- Липса на анатомични, ендокринологични и други състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми;
- Фамилна обремененост (роднини носители на балансирани хромозомни преустройства с данни за мъртви раждания, спонтанни аборти, родени деца с малформации и/ или УМИ);
- Съгласие за участие в изследването.

Критерии за изключване:

- Възраст под 16 години;
- Наличие на анатомични, ендокринологични и други състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми;
- Отказ от изследване.

За провеждане на субтеломерен анализ

Критерии за включване:

- Възраст над 16 години;
- Двойки с репродуктивни проблеми - минимум 2 спонтанни аборти в комбинация с родено дете с увреждания и/ или умствено изоставане с неясна етиология;

- Липса на анатомични, ендокринологични и други състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми;
- Нормален кариотип от конвенционална цитогенетика;
- Съгласие за участие в проучването.

Критерии за изключване:

- Възраст под 16 г.;
- Наличие на анатомични, ендокринологични и други състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми;
- Лица с установено хромозомно преустройство при конвенционална цитогенетика;
- Отказ от изследване.

III.2. Методи

При изпълнението на целите и задачите се следва определена схема от етапи на работа, в която се включват различни методи на изследване с конкретни резултати от тяхното приложение.

III.2.1. Документален метод - анализ на медицински досиета на пациентите

Подборът на пациентите е осъществен на базата на проучване на медицинската документация (клинична диагноза, фамилна анамнеза и генеалогия) на двойките с репродуктивна нарушения преминали Кабинета за генетично консултиране, Лабораторията по Медицинска генетика, Варна. Всички пациенти са насочени към МГК от акушер-гинеколог, андролог, ендокринолог, педиатър или личен лекар, както и по собствено желание.

Етапът на обективизиране на данните и идентификация на причината се фокусира върху РН в семейството, ход на бременността, раждане и неонатален период (където има). Фамилната анамнеза включва родословен анализ на поне две поколения с насочено търсене на репродуктивни неудачи, спонтанни аборти и мъртви раждания, наличие на роднини с вродени малформации и/или изоставане в невро-психичното развитие, както и близкородствени бракове. Анамнезата за инфертилитет, спонтанни аборти, вродени аномалии, умствено изоставане или перинатална смърт в някои случаи определя наличие на фамилно хромозомно преустройство. Изучаването на родословното дърво е необходимо, особено когато се касае за двойка със спонтанни аборти и мъртво раждане. Хромозомният анализ и при двамата партньори се провежда, за да се установи/

изключи наличие на системна балансирана транслокация или други хромозомни аберации, включително и мозаицизъм (наличие на минимум две клетки от една и съща патологична клетъчна линия в съчетание с нормална клетъчна линия).

При РН, свързани с раждане на дете с хромозомна болест се включва търсене и описание на лицеви и телесни дисморфични белези (глава, лице, шия, гръден кош, крайници, външни полови органи, кожа). Обектите на интерес се фотодокументират на отделни снимки. Задължително се заснемат лице (фас и профил), крайници, цялостен хабитус и отделни зони на интерес. В тези случаи се взема под внимание медицинската документация от предишни хоспитализации, лабораторни и образни изследвания. Резултатите са интерпретирани в сътрудничество със съответните специалисти.

III.2.2. Лабораторни методи

Според приложението им в настоящото проучване, лабораторните методи се разделят на два подвида:

Основни: за търсене на микроскопски и субмикроскопски хромозомни аберации:

- конвенционален цитогенетичен анализ (рутинен кариотип), извършен по метода на G-лентово оцветяване (450 – 550 ленти);
- молекулярно-цитогенетичен анализ: субтеломерна FISH.

Верифициращи - прилагат се при пациентите с вече диагностицирано нарушение с цел нейното потвърждаване или отхвърляне, уточняване на родителския статус и определяне кариотипа на плода при следваща бременност:

- цитогенетичен анализ на амниотична течност;
- цитогенетичен анализ на фибробласти от кожа;
- цитогенетичен анализ на фибробласти от абортивен материал.

III.2.2.1. Конвенционален цитогенетичен метод

Основен метод за култивиране и обработка на лимфоцитни култури прилаган в цитогенетичните лаборатории.

Алгоритъм на действие (тъканно култивиране и обработка на периферна кръв):

1. Проверява се за наличие на стерилна посуда и материали за посевка в бокса
2. Темперирание на хранителни среди и реактиви 1 час преди посевка
3. Взетият материал се посевя стерилно в бокса, съгласно методиката
4. Култивиране на посетият материал в термостат за 72 часа
5. Синхронизиране на културите с FudR - 24 часа преди обработка
6. Засичане на културите с колхицин на 69-72-ия час

7. Обработка на културите
8. Изготвяне на препарати
9. Микроскопски контрол (увеличение 40× на обектива) на качеството на изготвяне на препаратите

Необходими реактиви:

1. Материал: плазма, богата на лимфоцити 0,5 ml
2. Хранителна среда - Lymphochrome, RPMI 1640
3. Фетален телешки серум
4. Фитохемаглутинин (Lonza Group, Switzerland) - работен разтвор, крайна концентрация на ФХА – 6 µg/ml. (*количеството на ФХА се определя след предварително тестиране на всяка нова серия (варира от 60 µl - 150 µl, като количеството се увеличава с остаряване на разтвора)*)
5. L-glutamin 200 m/M (29.5 mg/ml), крайна концентрация – 0.01 – 0.02 Mm
6. FudR - работен разтвор с концентрация 0.025 g/ml
7. Колхицин (0.1 µg/ml) или Colcemide (0.03 µg/ml)
8. 0.75 M KCl (хипотоничен разтвор) или разтвор на Охнухи (4,1g KCl в 1000 ml дестилирана вода; 0,9g Na₃C₆H₅O₇×2H₂O в 200ml дестилирана H₂O; 2,33g NaNO₃ в 500 ml дестилирана вода).
9. Прясно приготвен фиксатор от метанол и ледена оцетна киселина в съотношение 3:1.

Протокол за GTG техника:

Един час преди посявката в ламинарния бокс се включва УВ лампа за стерилизиране на работното поле.

Тъканно култивиране:

В специални, предварително надписани със съответния лабораторен номер на пациента фласки при спазване на условията за стерилност, се поставят последователно: хранителна среда RPMI/ Lymphochrome - 5 ml; фетален телешки серум – 0,5 ml; ФХА – от 60 µl до 150 µl в зависимост от това кога е бил приготвен работния разтвор (при прясно приготвен разтвор се започва с по-малкото количество); L-glutamine - по 2-3 капки от 2 cc спринцовка без игла; кръв или плазма - съответно по 0,4 ml кръв или 0,5 ml плазма за възрастни.

Културите се слагат в термостат на 37°C, с 4,5% CO₂ и 100% влажност за 72 часа. На 48-ия час към културата се добавя 20 µl работен разтвор на FudR с концентрация 0,025

g/ml, след което култивирането продължава още 22 часа. Вторият етап на обработка започва на 69-72 час от посаявката.

Обработка на лимфоцитни култури:

1. На 70-ия час към всяка култура се добавя по 150 μ l колхицин / колцемид с концентрация 0.1 μ g/ml за 30 минути (времето може да варира). Центрофугиране на 800 оборота/минута за 10 минути
2. Супернатантът се отпипетира и към утайката при внимателно разбъркване се добавят до 5 ml KCl или p-p на Охнухи, предварително temperиран в термостат. Остава се за 20 минути на стайна температура (в термостат по преценка). Центрофугиране за 10 минути на 800 оборота/ минута
3. Супернатантът се отпипетира и към утайката при внимателно разбъркване се добавят от начало на капки, а после струйно до 5 ml стандартен фиксатор (3 части метанол : една част ледена оцетна киселина, прясно приготвен) (I-ви фиксатор). Епруветките се оставят за 30 минути в хладилник, затворени с тапи. Центрофугиране за 10 мин. на 800 оборота/ минута
4. Стъпка 3 се повтаря още два пъти – с II-ри фиксатор и III-ти фиксатор

Обработката с хипотоничен разтвор има за цел да спре действието на колхицина и да раздуе клетките като ги подготви за разпръскване. При последващото използване на фиксатор се отстранява ядрените протеини като се запазва хромозомната морфология (ключов момент за получаване на препарати с добро качество). Критичен момент е прилагането на I-ви фиксатор. Клетъчното съдържание трябва да бъде внимално ресуспендирано в остатъчния обем от хипотоничен разтвор. От най-голямо значение е фиксаторът първоначално да бъде добавян капка по капка при едновременно разклащане на епруветката. След като фиксаторът е предизвикал хемолиза на оставащите червени кръвни клетки, което личи от превръщането на червения хемоглобин в кафяв хематин, може да бъде добавен с по-бързо темпо. Недостатъчното разбъркване по време на фиксацията създава твърди кафяви парцали, които дават вид на „мръсни“ препарати с нисък митотичен индекс. Лошо фиксираните клетки изглеждат неадекватно разпръснати с „бляскав“ вид на фазово-контрастен микроскоп. Препарати с цитоплазмени остатъци, където метафазите изглеждат обвити във воал на аморфен материал, могат също да се дължат на лоша фиксация и неудачно отстраняване на белтъчния материал. Понякога след първия фиксатор се наблюдава слой от желатинозен материал над по-компактното клетъчно съдържание, което се дължи на повишените нива на белтъчно съдържание. Този слой може да се отстрани чрез отпипетиране на супернатанта, след внимателно

добавяне на няколко капки свеж фиксатор по вътрешната страна на епруветката с последващо внимателно завъртане на епруветката, така че желатиновия слой да се отдели от клетъчното съдържание. Понякога желатиновия слой е много голям и/или обособена клетъчна маса не може да се види на дъното на епруветката. В тези случаи пробите могат да бъдат изчистени чрез процес, наречен водно фиксиране.

По-малко критичен е II-ри фиксатор, който отстранява клетъчните фибри и остатъци от хематин като оставя само белите кръвни клетки. Третият етап на фиксиране се прилага за по-нататъшно изчистване на кафявите клетки или тези, които лежат под малки натрупвания на протеинов материал.

Суспензията се съхранява в хладилник на 4°C за другия ден, когато започва третия етап - изготвяне на препарати.

Изготвяне на препаратите:

Препаратите се изготвят чрез шахматно накапване на получената суспензия (около 6 капки) на отцедени от дестилираната вода предметни стъкла. Стъклата могат да бъдат изготвени веднага (особено при спешни случаи), но качество на препаратите значително се подобрява при съхранение на -20°C поне за 30 min, като се препоръчва това да е за цяла нощ.

Този етап е решаващ за крайното качество на препаратите. Препаратите за G-бендинг трябва да „старееят“ естествено за 3-5 дни на стайна температура или за цяла нощ (16-18 h) 56-60 °C за да узреят стимулирано. В някои случаи стъклата се пекат за 30-90 min на по-висока температура (обикновено на 90°C), с цел по-бърз анализ.

Скоростта, с която съхне стъклото е критична. Степента на изпарение зависи не само от състоянието на повърхността на стъклото и от начина на нанасяне на суспензията, но и от атмосферните условия в лабораторията по време на изготвянето на препаратите.

При фазовоконтрастно микроскопиране, хромозомите трябва да изглеждат бледо сиви и освободени от протеинови материи. В случай, че изглеждат много черни, лъскави или инкапсулирани в слой цитоплазма, в последствие могат да възникнат проблеми при G-бендинга. Метафазите трябва да са добре разпръснати с малко припокриващи се хромозоми, въпреки че прекалената разпръснатост може да доведе до непълни метафази. Големият брой разпилени метафази трябва да се избягва, тъй като затруднява анализа.

Проблеми свързани с тъканно култивиране

При незадоволително качество на култивиране, в зависимост от причината, може да се осъществи следния алгоритъм на действие (таблица 1).

Таблица 1. Подход за действие при незадоволителни резултати

Незадоволителни резултати от култивиране	Възможни причини	Действие
I. Културата е замърсена	I.1.Замърсен биологичен материал	I.1. По възможност и по преценка на лекар се взема нов материал. Прави се нова посевка.
	I.2.Бактериално замърсяване в бокса или в инкубатор “Heraeus” по време на култивиране	I.2. Повторна дезинфекция на бокса и инкубатор “Heraeus”.Повторна посевка със стар материал.
II. Потиснат растеж	II.1 Количеството на клетки в културата надвишава критичното ниво	II.1. Прави се нова посевка с намалено количество материал на 1 ml културална среда
	II.2.Моделът на обработка не съответства на пролиферативните особености на култивираните тъкани	II.2. Увеличава се времето на култивиране с колхицин с 10-15 мин в новата посевка
III. Липса на растеж	III.1.Недостатъчно количество материал за култивиране	III.1. По преценка на лекар се взема повторно материал за нова посевка.
	III.2. Пациентът, от когото е взет биологичен материал, приема медикаменти, подтискащи клетъчния растеж	III.2. По преценка на лекар след приключване на терапията се взема повторно материал и се прави нова посевка
	III.3.Моделът на обработка не съответства на пролиферативните особености на култивираните клетки	III.3. Прави се нова посевка, като се увеличава времето на култивиране с колхицин с 10-15 мин

Оцветяване на препарати

Протокол за за GTG техника за оцветяване:

Техниката на G-лентовото оцветяване е предпочитан метод за рутинно оцветяване на хромозоми. Препаратите предварително се третира с трипсин, след което се подлагат да въздействието на багрило (Гимза).

Резултатите от Гимза-бендинг техниката могат да бъдат твърде разнообразни. Когато хромозомите са неясни, недостатъчното остаряване на стъклата е най-вероятната причина. Претрипсинизираните хромозоми изглеждат раздути и бледи с липсващи понякога сегменти, докато недостатъчно трипсинизираните хромозоми са тъмни, с лоша разлика между светли и тъмни бендове. В случай, че хромозомите изглеждат бледи и сини, причината е в рН на буферите. Тъмно оцветените хромозоми могат да бъдат подобрени чрез отмиване на стъклата в дестилирана вода.

Потапянето на стъклата в трипсин и последващото им оцветяване позволява по-голямо хромозомно смилане и е следователно по-подходящо за получаване на по-висока хромозомна резолюция. Оптималното третиране с трипсин е определено на принципа “опит и грешка”.

По принцип оцветяването се извършва на следващия ден върху пресни препарати, обработени на 60°C за цяла нощ и на 90°C за още 30 min на сутринта. Оцветяването на “узрели“ препарати, т.е. на 7-дневни препарати, се прави само, ако няма възможност за бързо зреење върху плоча. При необходимост от експресно GTG-оцветяване, препаратите се пекат на термостатираща плоча при 800°C за 10 минути.

При оцветяване препаратите преминават последователно през три предварително подготвени и темперирани кювети:

I-ва кювета: 15% разтвор на перхидрол (50ml 30% перхидрол и 50ml d H₂O) - 5-7 s;

II-ра кювета: темпериран 0.25% трипсинов разтвор (0.0625g сух трипсин и 50ml PBS буфер);

III-та кювета: Гимза боя, 3(6) ml, двойно филтрирана и прибавена към буфер от 55ml Na₂HPO₄ · 2H₂O и 45ml KH₂PO₄.

Перхидролът има за цел да изчисти намиращите се под метафазата, останали при обработката, белтъчни нишки, а в трипсина хромозомите се раздуват и отделните бендове стават по-отчетливи.

Оцветяването се контролира под микроскоп.

Тъканно култивиране на амниоцити

След пристигане на амниотичната течност в лабораторията, епруветките се центрофугират, надутаечната част се прехвърля в друга епруветка, а останалата част се ресуспендира с 3 ml специална хранителна среда (Amniochrome) и се прехвърля във флашка. На седмият ден от посаяката фласките се проверяват на инвертен микроскоп за наличие на амниоцитни клетки. При наличие на достатъчен брой клетки се пристъпва към смяна на хранителната среда, отново с 3ml. Това се прави на всеки 3 дни до образуване на достатъчен брой колонии (обикновено до към десетия ден от посаяката). Денят преди обработката смяната (18-20 часа) се прави с 4 ml хранителна среда.

Обработка на амниоцити: Обработката на амниоцитите започва на 18-20 часа от последната смяна на средата. Тя включва:

1. На инвертен микроскоп се проверяват фласките за наличие на достатъчно колонии

2. Засичане с колцемид (използва се готова за употреба опаковка на колцемид с концентрация 10 mg/ml) - във всяка флашка се слагат по 20 μ l колцемид и се поставя в термостат за 2 часа и 15 мин.
3. Трипсинизиране - За трипсинизирането се използват два вида трипсин, предварително темперирани в термостат: 1) трипсин EDTA, фабрично готова за употреба опаковка, която след отваряне се съхранява на 4°C в хладилник и 2) работен (приготвен) трипсин с крайна концентрация 0,25% (0,250 г сух трипсин в 100 мл PBS), като за всяка обработка се приготвя 50 мл 0,25% работен трипсин, който се съхранява в хладилник на 4°C. Съдържанието на флашката се прехвърля в епруветка. Във флашката се слага 1-1,5 мл от готовия трипсин (с EDTA) за обливане, разтворът веднага се засмуква и се добавя в епруветката. В същата флашка се слага 1-1,5 мл от работния трипсин и под инвертен микроскоп, с разклащане, се следи за отлепване на клетките. След отлепването на достатъчно клетки, (по възможност единични, не струпвания) част от хранителната среда от епруветката се връща във флашката (така се спира процеса на трипсинизиране), размесва се внимателно и цялото съдържание от флашката се прехвърля обратно в епруветката. Трипсинизирането е първият критичен момент от обработката поради риск от претрипсинизиране. Всяка флашка се работи по отделно. Така приготвените епруветки се центрофугират, на 1000 оборота за 10 мин. на центрофуга с летящ ротор. Към всяка флашка се прибавя прясна среда, която се сменя периодично до приключване и даване на резултат
4. След центрофугиране, съдържанието от епруветките се отпипетира до 0,5 мл, размесва се с утайката и се прибавя внимателно по 5 мл хипотоничен разтвор от 0,7% Na цитрат – престоява в термостат около 17 мин (времето може да варира)
5. Обработката продължава както при конвенционалния цитогенетичен метод

При обработката етапите с хипотоника и I-ви фиксатор са критични и се работи максимално бързо.

Приготвяне и оцветяване на препарати от култури на амниоцити:

Приготвянето и оцветяването на препарати от амниоцити в Лабораторията по Медицинска генетика - Варна, се извършва както при лимфоцитни култури (виж Конвенционален цитогенетичен анализ).

Тъканно култивиране на фибробласти

След пристигане на материала (парченце кожа или абортивен материал), той се прехвърля в петри, с малко физиологичен разтвор или с малко среда (RPMI 1640 и

телешки серум) и антибиотик, нарязва се на ситно и се прехвърля във флашка. Така, с малкото количество хранителна среда се поставя в термостат за 1-1,5 часа, след което се долива с хранителна среда до 3 ml и се поставя обратно в термостата за 7 дни, когато се прави първа смяна с 3 ml среда. Следващите смени на фласките се извършват на всеки 3 дни по 3 ml среда до получаване на необходимата колония (обикновено тя се образува около всяко парченце) В деня преди обработката фласките се сменят с 4 ml хранителна среда.

Обработка на фибробласти:

Обработката на фибробласти се извършва както при култури от амниоцити (виж обработка на амниоцити).

Приготвяне и оцветяване на препарати от култури на фибробласти:

Приготвянето и оцветяването на препарати от фибробласти в Лабораторията по Медицинска генетика - Варна, се извършва както при лимфоцитни култури (виж Конвенционален цитогенетичен анализ).

При необходимост, за допълнително характеризиране на намерени полиморфни варианти са прилага допълнителна техника на оцветяване – **СВГ**. При С-бендинг техниката, е необходимо препаратите да бъдат 14-дневни.

Протокол за СВГ техника за оцветяване:

1. 14-дневните препарати се третира в 0.2 N HCl за 1 час
2. Изплакване в дестилирана вода
3. Поставяне в разтвор на 5% Ba(OH)₂ за 15 минути на 40-45°C във водна баня
4. Престояване 3 пъти по 5 минути в дестилирана H₂O
5. Изплакване на стъклата в 0.2 N HCl
6. Преминаване на препаратите през възходяща редица от 70° и 95° алкохоли
7. Сушене на препаратите
8. Инкубация на препаратите в 2 SSC на 60-65°C за 1,5 часа
9. Изплакване в д H₂O и изсушаване на стайна температура
10. Поставяне в 5% Gimsa в Съоренсов буфер* (pH=7.0) за 10-15 минути

* - 13 ml калиев фосфат и 36,5 ml натриев фосфат и 2 ml боя Gimsa.

Критичните моменти тук са:

- при претретиране с Ba(OH)₂, няма да се видят раменете на хромозомите;
- при не достатъчен престой в Ba(OH)₂, раменете ще стоят на ивици.

Големината на хетерохроматиновите райони се определя по стандартна 5-то бална система.

Микроскопски анализ

От всеки пациент са анализирани 11 – 15 метафазни пластинки с минимално припокриващи се хромозоми и добро качество на хромозомните ленти (резолюция 400-550 бенда). Анализът и заснемането са извършени на светлинен микроскоп Yenalval 0,25A при увеличение 1000x. Нивото на резолюция се определя по унифицирана таблица, налична във всяка лаборатория.

При съмнение за мозаичен вариант, преброяването продължава до 30 метафази при открита една аберантна клетка, или до 50 метафази при намиране на втора. Процента на аберантните клетки се изчислява по стандартна таблица за коефициент на конфиденциалност (достоверност). Всички хромозомни аберации се докладват, съгласно последната Международна стандартна номенклатура (116).

III.2.2.2. Молекулярно-цитогенетичен метод - флуорисцентна ин ситу хибридизация за субтеломерни участъци

За скриниране на субтеломерните участъци при пациенти без патологични отклонения от конвенционален цитогенетичен анализ е използван кит Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit (CE). Китът включва 41 субтеломерни сонди, специфични за p- и q- рамената на хромозоми 1-12 и 16-20, q-рамената на акроцентричните хромозоми и Xp/Yp и Xq/Yq псевдо-автозомните субтеломерни региони. Сондите са разпределени в 15 микса, позволяващи да се анализират 15 подбрани таргетни полета съдържащи метафази, разпределени на 5 стъкла по 3 зони (по протокол са по 5 на 3 стъкла). Сондите за късите рамене са белязани със Spectrun Green, а за дългите – със Spectrum Orange.

Необходими реактиви и консумативи:

20xSSC с ph 5,3; 2xSSC с ph 7,0; разтвори за измиване - 2xSSC/0,1% NP-40 и 0,4xSSC/0,3% NP-40; денатуриращ разтвор 70% формамид/2xSSC; формоалдехид фиксиращ разтвор (37ml PBS, 12,5ml 10% неутрален формалин и 0,5ml 2M MgCl); protease/pepsin разтвор (25 mg пепсин и 50ml 0,01 N HCl, приготвена екстемпоре); 70%, 85%, 100% етанол; разтвор за оцветяване DAPI; покривни стъкла (18 mm x 18 mm).

Протокол

Приготвяне на микроскопски препарат:

Приготвянето на микроскопските препарати се извършва съобразно протокола на лабораторията (виж Конвенционален цитогенетичен анализ). Клетъчна суспензия трябва

да е с достатъчно висока клетъчна концентрация и митотичен индекс и да съдържа минимално количество цитоплазмени примеси, тъй като това би могло да повлияе крайния резултат. Подбират се три зони от стъклото съдържащи качествени метафази посредством фазово-контрастен микроскоп.

Предварителна обработка на стъклата

1. Инкубиране на стъклата с пробите в 2xSSC на 73°C за 2 мин.
2. Инкубиране на стъклата в р-р на Protease/Pepsin на 37°C за 10 мин.
3. Промиване на стъклата в PBS на стайна t°C за 5 мин.
4. Поставяне в разтвор на формоалдехид на стайна t°C за 5 мин.
5. Промиване на стъклата в PBS на стайна t°C за 5 мин.
6. Дехидратация на стъклата във възходяща спиртна редица (70%, 85%, 100% етанол) за по 1 мин във всяка кювета

Денатурация

1. Потопяне на стъклата в Денатуриращ разтвор на 73°C ± 1 за 5 мин.
2. Незабавно прехвърляне на стъклата в кювета с 70% етанол, разклащане за 1-3 s и престой минимум 1 мин. Последователно се прехвърлят в кювети с 85% и 100% етанол с престой минимум по 1 мин. (стъклата се съхраняват в 100% етанол докато се подготвят сондите)

Подготвяне на сондите

1. Темпериране на миксовете със сондите на стайна температура
2. Центрофугиране на всяка една от тях за 1-3 s в микроцентрифуга
3. Прехвърляне на 3 µl от всяка сонда в микроцентрифужки и денатуриране на микроцентрифужките съдържащи сондите във водна баня на 73°C ± 1 за 5 мин.
4. Сондите се остават на гореща плоча на 45-50°C

Хибридизация

Изсушените стъкла с пробите се поставят върху гореща плоча на 45-50°C за да се изпари останалия етанол. Във всяка от таргетните зони се накапва по 3 µl от съответните приготвени сонди (микса). Поставят се покривните стъкла и се запечатват с лепило по краищата на покривното стъкло за да се получи леко уплътнение и се поставят във влажна хибридизационна камера на 37°C за 12-24 часа.

Промиване

Пробите се вадят от влажната камера и се отстраняват покривните стъкла. Незабавно се прехвърлят в 0,4xSSC/0,3% NP-40 измиващ разтвор на 73°C ± 1 водна баня,

разклащат се 1-3 s и се остават 2 мин. Пробите се прехвърлят във втория измивен разтвор 2xSSC/0,1% NP-40 на стайна температура, разклащат се отново за 1-3 s и се вадят след 30 s до 2 мин.

Оцветяване с DAPI

Накапват се по 3 μ l разтвор за оцветяване (DAPI) във всяка таргетна зона и се поставя покривно стъкло, като се избягва образуването на въздушни мехурчета. След 10 min престой на тъмно, пробата е готова за наблюдение. При невъзможност да се отчете веднага, пробата се съхранява на тъмно на -20°C

Микроскопски анализ

Наблюдават се и се анализират поотделно всички 15 участъка. Липсата, наличието и броят на флуоресцентните сигнали на хромозомния препарат говорят за евентуална промяна в броя на копията за съответния геномен сегмент. Локализацията на сигнала (при метафазен препарат) разкрива наличието на балансирани или небалансирани хромозомни преустройства. Флуоресцентните сигнали се визуализират и заснемат с помощта на дигитална софтуерна система Axio Vision и автоматизиран флуоресцентна микроскопска система Axio Imager Z2 на Carl Zeiss Ltd. Анализът на всеки участък е според общите правила на FISH.

III.2.3. Статистически методи

Статистическият анализ обхваща всички дейности, операции, методи и средства за получаване на обобщаващи данни и за тяхното интерпретиране. Целта е да се разкрие същността на явленията, както и да се определят връзки и зависимости, интересът към които е наложил съответното изследване. Задачите на статистическия анализ се свеждат до прилагането на определени статистически измерители и методи, посредством които се интерпретират получените резултати, така че потвърдят или отхвърлят хипотезите на изследването.

Обработката на събраната първична информация във връзка с извършеното изследване бе подпомогната от възможностите на медицинската статистика и по-конкретно:

- **Вариационен анализ:** използван при обработката и анализа на количествено измерими признаци. За сравняване на средни величини бе приложен t-критерия на Стюдънт. Всяка от стойностите на изследваните величини е представена като средна аритметична \pm грешка на средната аритметична. Констатираните различия

са приети за статистически значими и потвърждаващи алтернативната хипотеза (H_1) при $p < 0,05$.

- **Корелационен анализ:** използван при анализ на зависимости между изследваните съвкупности. При изследването е взето под внимание, че корелационната зависимост е непълна зависимост, при която зависимата променлива не реагира винаги по еднакъв начин на промените на независимата. Измерва се с корелационния коефициент (r) и приема стойности от 0 до ± 1 , като 0 е белегът за липса на значимост, а 1 е знак за наличие на функционална връзка.
- **Регресионен анализ:** използвани са метод на линейна регресия и трендови модел. Приложени са за изследване на конкретния механизъм на връзката между явленията, както и за моделиране на корелационните връзки, определяне формата на зависимостта, функцията на регресията и оценка на нейните параметри.
- **Графичен анализ:** използван за онагледяване на изследваните процеси и явления и илюстриране на определени закономерности и зависимости с помощта на Microsoft Excel 2016. Данните от проучването са представени чрез линейни, стълбовидни, кръгови и други видове диаграми.

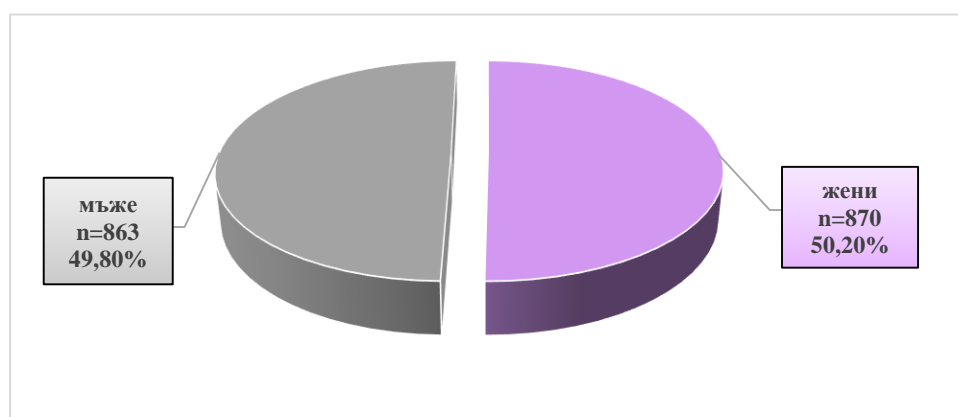
III.2.4. Софтуерни програми

- **Axio Vision (Axio Imager Z2):** микроскопска софтуерна система за дигитално документиране и обработка на молекулярно-цитогенетични резултати (субтеломерна FISH);
- **AmScope 3.7:** микроскопска софтуерна програма за документиране на цитогенетични резултати (рутинен кариотип);
- **Microsoft Excel 2016:** софтуерна програма за обработка, анализ и визуализация на цифрови данни. Тук програмата е използвана основно за анализ на първичните данни и получаване на количествен и графичен резултат, а също така и при статистическата обработка на данните от цялостното проучване;
- **Graph Pad Prism 5:** софтуерна програма, използвана за статистическа обработка на данни;

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

IV.1. Обща характеристика на пациентите - брой, възраст, пол, вид на репродуктивните неудачи и диагностичен метод

В периода на изследване от 16 години (2004-2019) бяха включени общо 1733 пациенти с репродуктивни неудачи - 870 жени и 863 мъже (съотношение 1.01) (фиг.3)



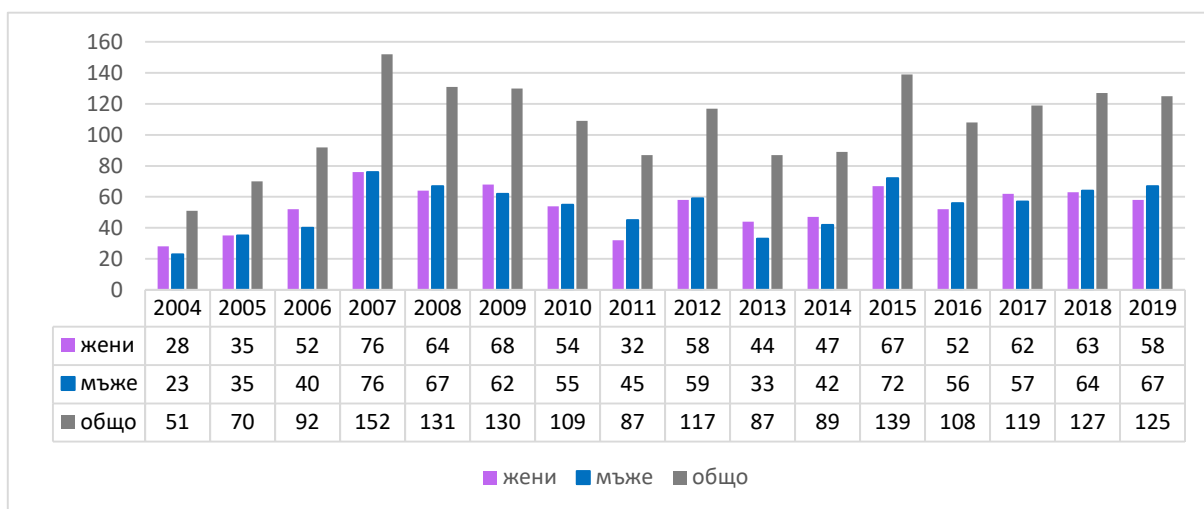
Фигура 3. Разпределение на пациентите по пол

Минималната възраст на включените пациенти е 16 г., а максималната 60 г. Средната възраст на изследваната група лица - 38 г. (таблица 2).

Таблица 2. Разпределение на пациентите по възраст и пол

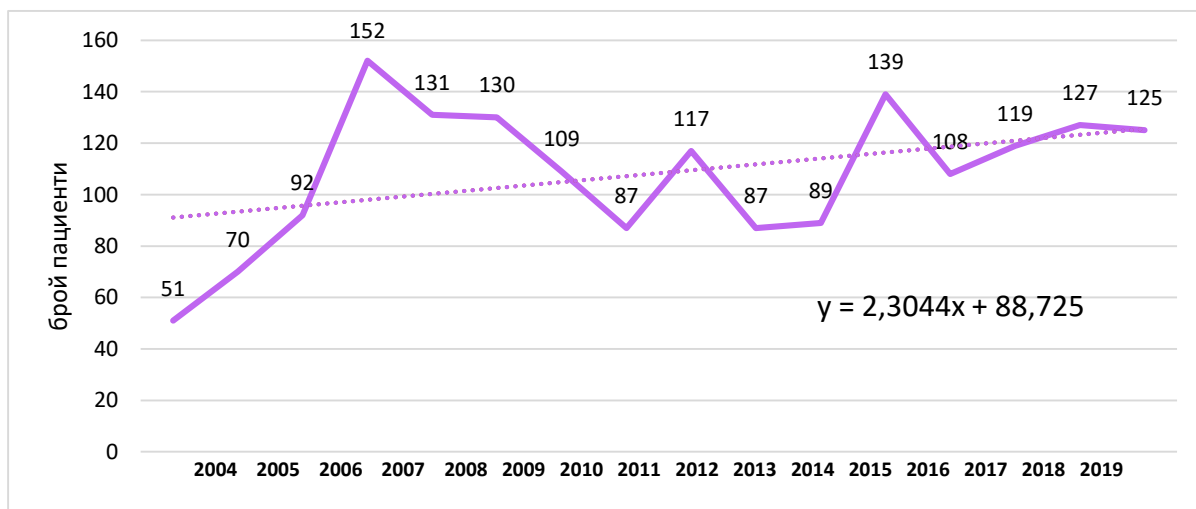
Възрастова група	ЖЕНИ		МЪЖЕ		ОБЩО	
	брой	%	брой	%	брой	%
до 35 г.	564	32,5	443	25,6	870	50,2
над 35 г.	306	17,7	420	24,2	863	49,8
ОБЩО	870	50,2	863	49,8	1733	100

Разпределението на изследваните пациенти по години показва най-общо тенденция към увеличаване на лицата с репродуктивни проблеми – от 51 лица през 2004 г. до 125 лица през 2019 г. или увеличение с около 2,5 пъти (фиг. 4). Особено изразено е нарастването в броя на пациентите в първите пет години, за което влияние оказва разкриването на цитогенетичната лаборатория през предходящата година.



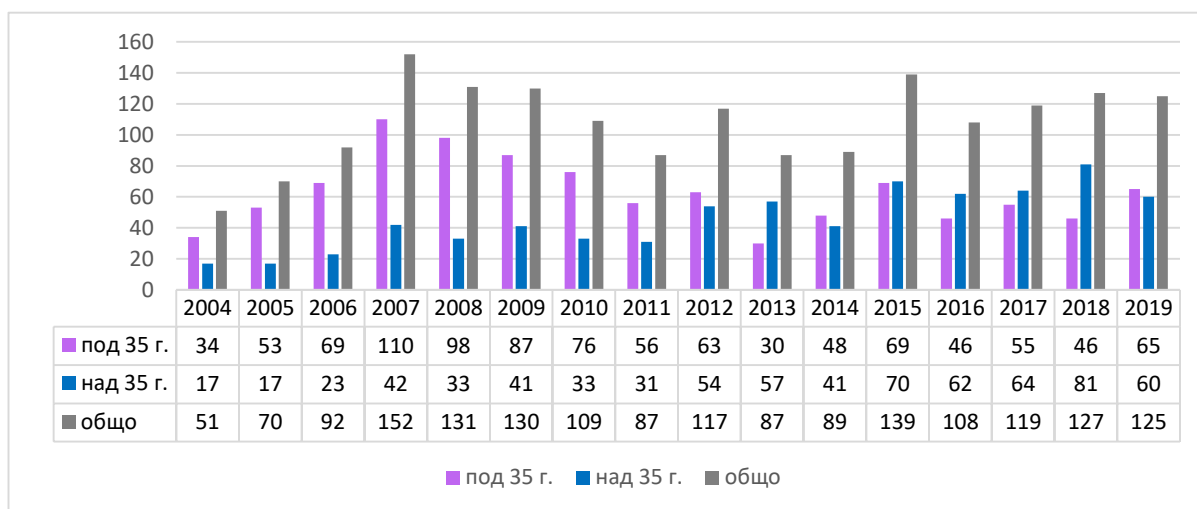
Фигура 4. Тенденция в разпределение на изследваните пациенти по години

Средният темп на нарастване броя на изследваните лица е около 6% (или 4,9 лица на година среден прираст). Не се наблюдава съществена разлика в броя на изследваните мъже и жени през годините. Ако се следва трендовият модел (от фиг.5), може да се предскаже, че след 5 години, броя на пациентите с РН, би бил около 137, т.е. тенденцията е към слабо и плавно покачване.



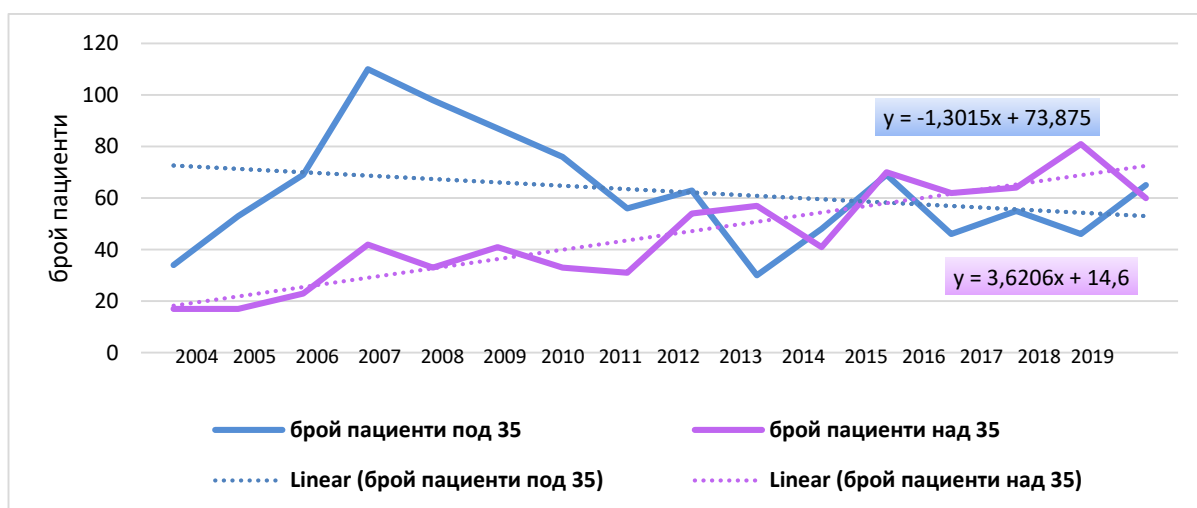
Фигура 5. Трендови модел на пациентите с РН за периода на проучването (2004-2019)

По отношение на възрастта се наблюдава нарастване в годините на броя на лицата, както на тези над 35 г., така и на тези под 35 г., съответно 3,5 пъти и 1,9 пъти. (фиг. 6).



Фигура 6. Разпределение на изследваните пациенти по години според възрастта им

Ако се разгледа, обаче, трендовия модел (фиг.7) се вижда, че въпреки, че средният темп на нарастване е с около 4% на година, посоката на развитие като цяло е негативна и тенденцията е към намаляване на общия брой на пациентите под 35 г. възраст. За разлика от тях, при пациентите с РН над 35 г., чийто среден темп на нарастване е около 9%, тенденцията е към увеличение на общия им брой. На базата на този модел може да се прогнозира, че след 5 години броят на лицата с РН под 35 г. би бил два пъти по-малък от този над 35 г. възраст (47 : 91).

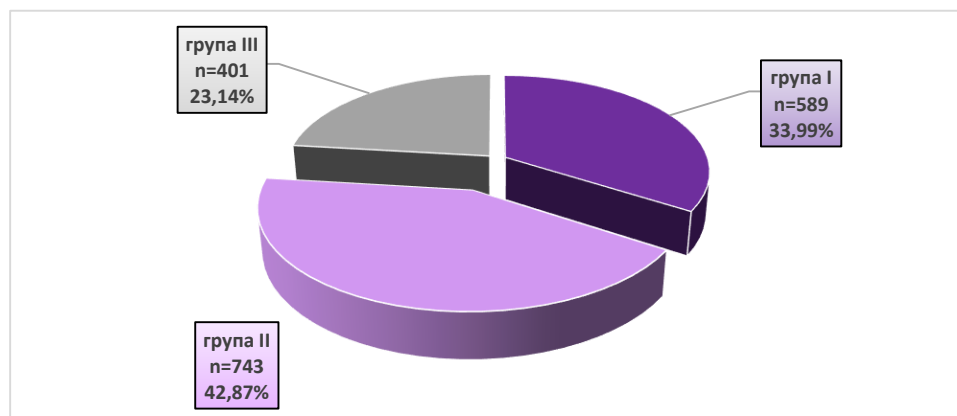


Фигура 7. Трендови модел за периода на проучването на пациенти с РН по възраст

Според вида на репродуктивния проблем пациентите се разпределят в 3 групи (фиг.8):

- **Група I** – Пациенти с Инфертилитет (липса на бременности) с неуспешни АРТ процедури и такива без опити за АРТ; мъжки фактор – **589** лица;
- **Група II** – Пациенти с ≥ 2 СПА (независимо от наличието или отсъствието на живо и здраво дете в семейството) – **743** лица;

- **Група III** – Комбинирана репродуктивна история от *минимум 2 неудачи* (мъртвородено, прекъсната бременност по медицински показания за вродена аномалия, живородено с аномалии и/или УМИ, спонтанен аборт, неуспешни АРТ процедури) и пациенти с фамилна хромозомно преустройство – **401 лица**.



Фигура 8. Разпределение на пациентите според вида на репродуктивната неудача

Разпределението на изследваните пациентски групи по пол (таблица 3) не показва статистическо значимо различие в нито една категория ($\chi^2= 5,040$; $p=0.08$).

Таблица 3. Групово-полово разпределение на анализирания извадка пациенти

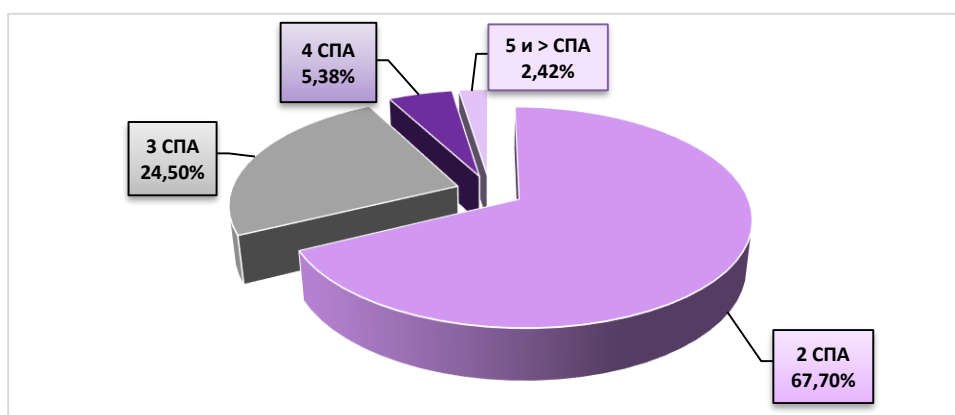
Категория пациенти	ЖЕНИ			МЪЖЕ			ОБЩО			стойност на p
	брой	%	% от групата	брой	%	% от групата	брой	%	% група	
група I	275	31,61	46,68	314	36,38	53,32	589	34,0	100	P=0.08
група II	380	43,68	51,14	363	42,07	48,86	743	42,9	100	
група III	215	24,71	53,62	186	21,55	46,38	401	23,1	100	
ОБЩО	870	100	50,2	863	100	49,8	1733	100	100	

Лицата от **група I** на пациенти с липса на бременности (589 лица) беше втора по големина и включваше следните подгрупи:

- Пациенти с инфертилитет (без АРТ) – 308 лица;
- Пациенти с инфертилитет (с неуспешни АРТ) – 224 лица;
- Мъжки фактор (МФ) – 57 лица. Условно изведена подгрупа пациенти насочена поради клинично изяснена причина (азооспермия, олигозооспермия, астенотератозооспермия и др.).

Най-голям е броят на изследваните пациенти от **група II** (≥ 2 СПА) – 743 лица. При подразделяне в подгрупи (фиг.9), ясно се наблюдава многократното преобладаване на семейства с два СПА. По-големият брой лица с 2 СПА се дължи на факта, че наличието на два аборта е първата индикация за насочване към диагностичен панел от изследвания според национален стандарт по Медицинска генетика и Европейската асоциация по Репродуктивна медицина, 2018 г.

- с два СПА – 503 пациента;
- с три СПА – 182 пациента;
- с четири СПА – 40 пациента;
- с пет и повече СПА – 18 пациента.

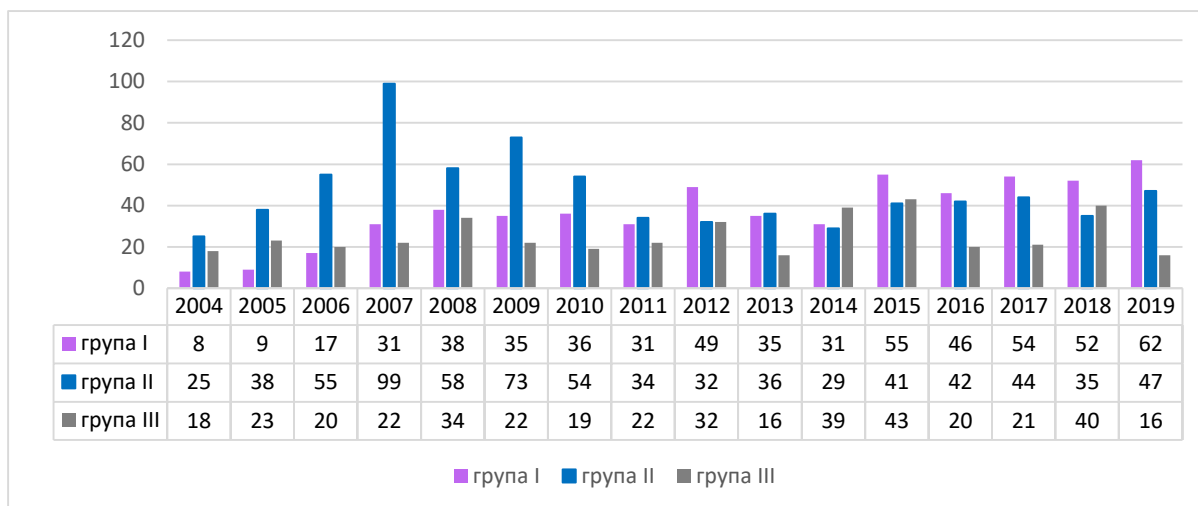


Фигура 9. Разпределение на пациентите от група II според броя на СПА

Изследваните пациенти от **група III** може да се раздели на две подгрупи:

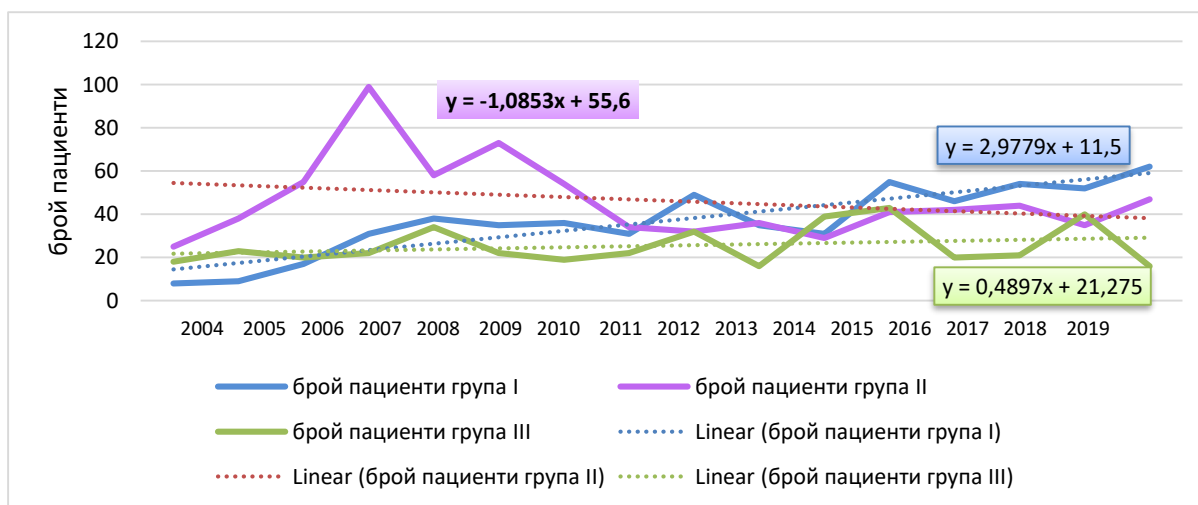
- Пациенти с комбинирана репродуктивна история (КРИ) – 364 лица;
- Пациенти с фамилно хромозомно преустройство – 37 лица (лица от първа степен на родство).

При проследяване на пациентските групи в годините за които се провежда проучването се наблюдава нарастване в *броя* на пациентите от група I (липса на бременност) и група II (с повтарящи се СПА); при пациентите от група III (комбинирани неудачи) не се отчита промяна (фиг.10).



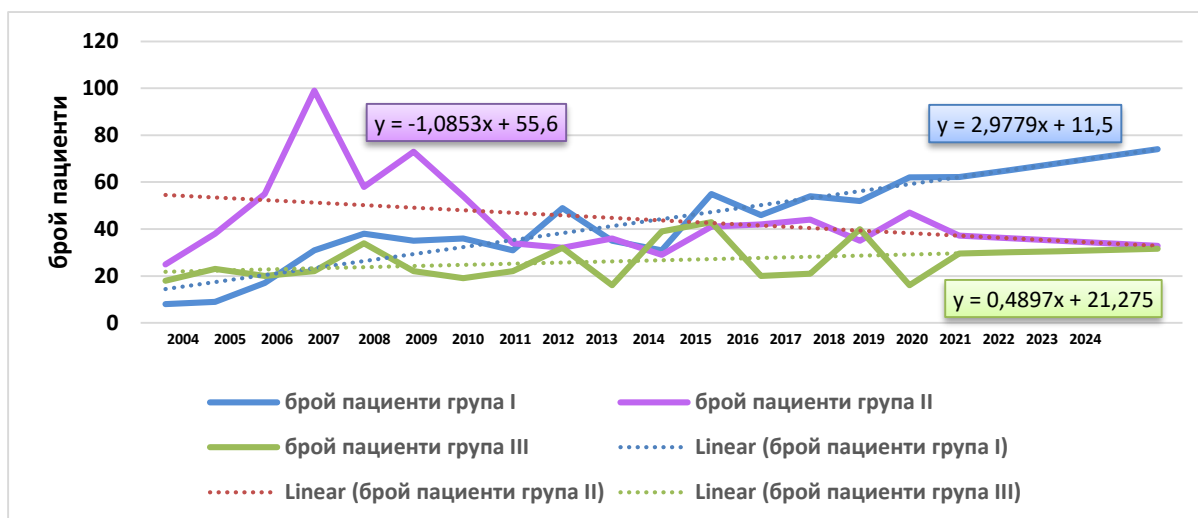
Фигура 10. Разпределение на изследваната извадка пациенти по години и групи

Съгласно трендовия модел (фиг.11), обаче, *тенденцията* към отчетливо нарастване е само за групата лица с инфертилитет (група I), при лицата с повтарящи се СПА (група II) е към слабо намаляване. Почти незабележимо е нарастването при двойките с комбинирана репродуктивна история (група III).



Фигура 11. Трендови модел на пациентите с РН по групи

Според този модел, (фиг.12) след 5 години пациентите и от трите групи биха били от сходен порядък: група I ≈ 74 , група III ≈ 32 , а тези от група II ≈ 33 .



Фигура 12. Трендови модел на пациентите с РН по групи

Резултати получените от нашата извадка пациенти като цяло корелират с данните в световен мащаб, където броя на инфертилините двойки за период от 2010 до 2016 нараства около 1,5 пъти (от 48,5 млн до 60-80 млн) (114,127). За България, нарастването на броя двойките с РН е почти два пъти за една година (от 145 хил. през 2017 до 300-400 хил. през 2018) (7). При анализа на пациентите преминали през нашата лаборатория не се наблюдава такъв отчетлив скок, по-ясна тенденция към увеличение има само при пациенти с липса на бременности (група I) (от 8 през 2004г до 62 през 2019). В група II, съгласно трендовия модел се отчита леко намаляване на броя на пациентите само със СПА, но това понижение е по-скоро в резултат на сериозен връх от по-масово насочване за цитогенетично изследване на пациенти в периода 2006-2008г. след стартирането и акредитиране на Лабораторията по медицинска генетика през 2003. Ако, обаче, се проследи броят им в началото на периода на проучването (2004 г. - 25 лица) и крайният период (2019 – 47 лица), нарастването им е почти два пъти, т.е тенденцията като цяло е към увеличение.

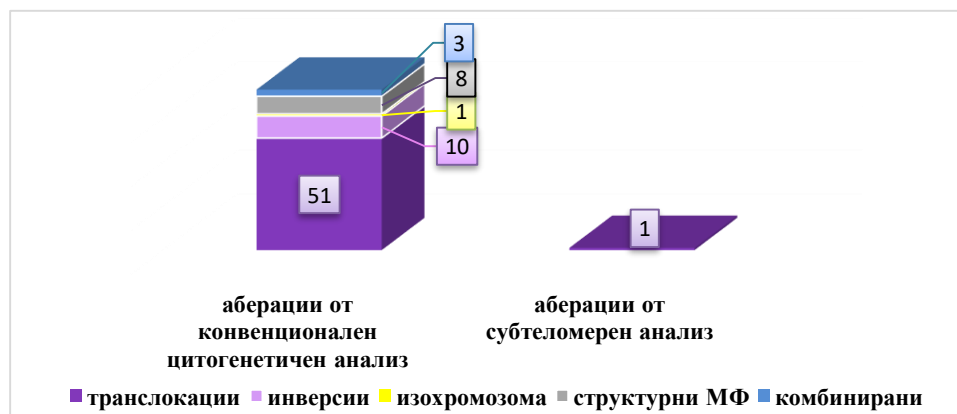
Според лабораторния диагностичен метод – обща характеристика

В зависимост от използвания метод за диагностициране на бройни и структурни хромозомни нарушения (в това число позицията и големината на хромозомния участък включен в преустройството) са приложени:

- Конвенционална (класическа) цитогенетика на 1733 с разкрити бройни ($n=37$) и структурни хромозомни нарушения ($n=70$), комбинирани ($n=3$) и хромозомни полиморфизми ($n=173$);
- Молекулярна цитогенетика за субтеломерни хромозомни региони при избрани 20 пациенти с нормален кариотип и разкрити ($n = 1$).

Структурните и комбинирано структурни аберации, разкрити чрез конвенционална цитогенетика в изследваната в настоящия дисертационен труд извадка от пациенти с РН са 73 (n=73). Намерени са 51 транслокации (39 реципрочни и 12 – Робертсонови), 10 инверсии (4 пара- и 6 пери-центрични) и 1 изохромозома, всички в пълна форма. Извън тях са открити още 8 структурни нарушения в мозаична форма и 3 пациента с комбинирани вкл. структурни нарушения.

Аберациите, разкрити чрез субтеломерна молекулярна цитогенетика е 1 (фиг.13).



Фигура 13. Разпределение на пациентите с установени структурни аберации в зависимост от вида на включения хромозомен участък

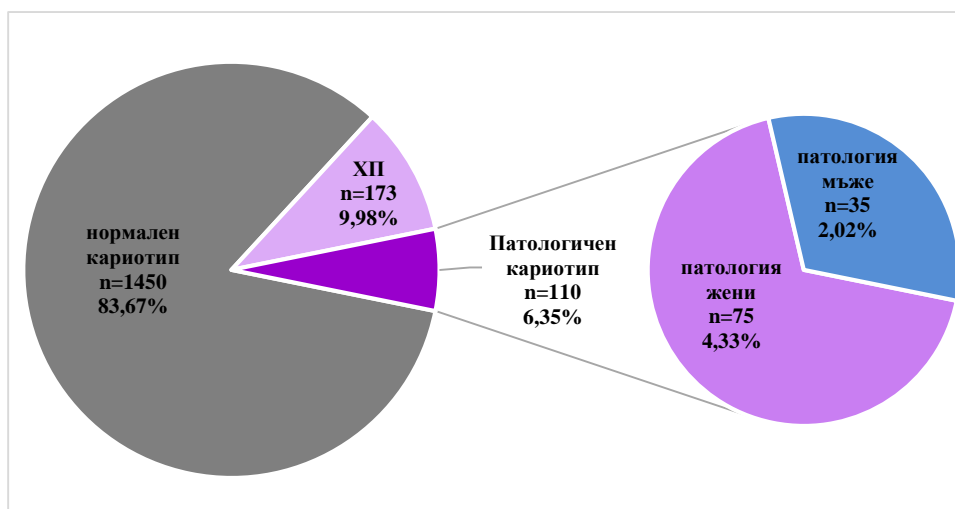
IV.2. Конвенционални цитогенетични изследвания

IV.2.1. Обща характеристика

Конвенционален цитогенетичен метод е приложен при **1733** пациента вградени в 764 семейства и 205 отделни лица с репродуктивни неудачи за периода 2004-2019 г. На всички пациенти е проведен анализ на лимфоцити от периферна венозна кръв. Допълнително, по показания, са изследвани амниоцити при 21 лица (осъществили следваща бременност), и фибробласти (кожни или от абортивен материал) - при 22 лица.

Бройни, структурни и комбинирани хромозомни нарушения са диагностицирани в **6,35%** (110 лица) от всички изследвани, като делът на жените (4,33%) е два пъти по-голям от този при мъжете (2,02%) (фиг.14).

Установената от нас **честота** на бройни и структурни хромозомни нарушения в 6,35% от пациентите с РН е близка до средните проценти съобщавани в други подобни изследвания - 5.3% с (*Azim M, et al.*), 6% (*AL-Hassanee AJ, et al.*), 7,3% (*Gonçalves RO, et al.*), 7,7% (*Al Hussain M, et al.*) (22,14,72,13).



Фигура 14. Разпределение на пациентите според установения кариотип

По-висок процент ХА намират *Jiang J, et al.* (11.5%) и *Tsui KM, et al.* (9,92%) (92,188). Като цяло при семейства с РН, хромозомните аберации (бройни и структурни) описани в литературата варират от 3% до 11%, но средния процент не се отличава съществено в различните описани проучвания (12,25,42,43,54,68,69,155). Смята се, че вариациите в честотата са резултат както от подбора на пациентите, така и от популационните различия (92,191).

Съотношението по **пол** при тези 110 лица дава значим превес на жените (68,2%) спрямо мъжете - 31,8%. То корелира с данните от други сходни проучвания като се смята, че е резултат от по-високата честота на бройните аберации по половите хромозоми при жени, обикновено представени под формата на ниско степенен мозаицизъм (68,80,115,120,145,160,161,189). *Morel F, et al.* в своето проучване на пациенти с инфертилитет или неуспешни IVF процедури, подложени на ICSI докладват много по-висок процент на хромозомни нарушения при инфертилни жени (13%) спрямо инфертилни мъже (2,7%), като тази разлика се дължи отново на намерения голям брой варианти на полово хромозомен мозаицизъм при тях (91,7% от всички аберации) (128).

Най-много хромозомни нарушения са открити в пациенти от група III – 45 лица от 110 (40,9%) са показали патологични резултати, следвана от група I – 33 лица (30%) и група II с 32 лица (29,1%). В направено изследване по групи, броя на жените с патологичен кариотип е около два пъти по-висок от този при мъжете във всяка група, т.е. влиянието на пола е сигнификантно по отношение на изследваното нарушение ($\chi^2=15,19$; $p < 0,0001$).

Хромозомен полиморфизъм е установен в 9,98% (173 лица) от анализиранияте 1733 пациента. Този резултат се доближава до честотата на полиморфизмите при

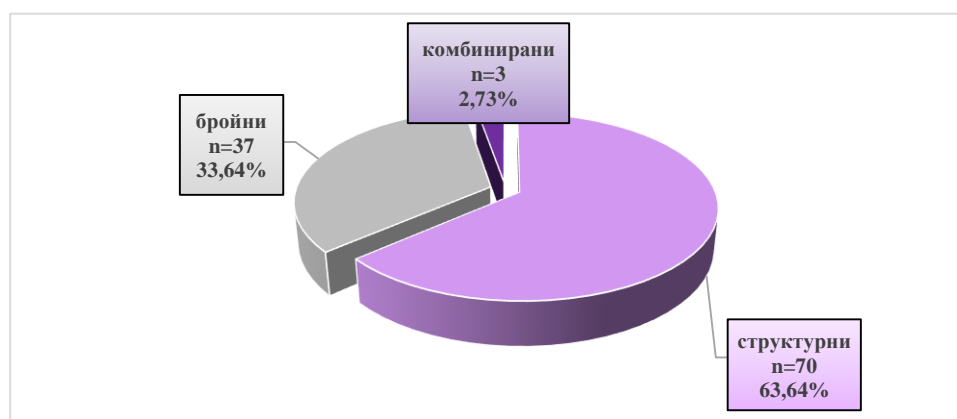
пациенти с РН описани в литературата (10-15%) и е два пъти повече в сравнение с този установен при нормалната популация (2-5%) (15,199). Намереният от нас процент на полиморфизъм е статистически значимо по-висок от установения в нормалната популация ($t=9$; $p<0,001$). По отношение на пола, при мъжете ХП е статистически значимо два пъти по-често срещан (6,52%) в сравнение с този при жените (3,46%) (от всички полиморфни варианти 65,3% са открити при мъже и 34,7% – при жени) ($p=0,0001$ според теста на Фишър). По-високият процент полиморфизъм при мъжете се дължи на Y-хромозомата, която показва висока честота на полиморфност и варира в широки граници между отделните индивиди и различните популационни групи (199). Това се потвърждава и от нашите резултати.

В 8 (7,27%) от диагностицираните 110 пациенти с бройно или структурно нарушение имаше съчетание с хромозомен полиморфизъм.

IV.2.2. Хромозомни аномалии по вид и група репродуктивно нарушение

Откритите от нас хромозомни аномалии са разгледани и обсъждани по-долу според приетото разделение) (фиг.15) и впоследствие категоризирани според произхода на аберацията:

- Бройни – при 37 пациента;
- Структурни – при 70 пациента;
- Комбинирани (структурни с бройни нарушения) – при 3 пациента.



Фигура 15. Разпределение на патологията по вида на аберацията

Бройните нарушения (33,63% от пациентите) са почти два пъти по-малко от структурните (63,64%). Делът на комбинираните нарушения е много нисък (2,72%).

IV.2.2.1. Бройни хромозомни нарушения

Бройни нарушения са открити само по половите хромозоми в **37** пациента, според формата на нарушението в пълна форма (ПФ) в 3 пациента и мозаична форма (МФ) в 34 пациента. Съгласно международните стандарти, мозаицизмът представлява наличие на две или повече клетъчни линии с различен кариотип в един и същ индивид (116).

Пълна форма на анеуплоидия по полови хромозоми е открита само при 3 лица, всички от мъжки пол (0,2% спрямо общия брой пациенти, 3/1733; 0,3% спрямо всички мъже, 3/863; 8,1% от всички бройни аберации, 3/37). И тримата пациента са от групата лица с първичен инфертилитет (група 1) - двама със синдром на Клайнфелтър (47,XXY) и един пациент с кариотип 48,XXYY,inv(9)(qh). Единият от пациентите с цитогенетично диагностициран синдром на Клайнфелтър (клинично неразпознат) и пациентът с 48,XXYY кариотип са изследвани по повод нарушена спермограма – азооспермия, а другият пациент – по повод дългогодишен стерилитет (таблица 4).

Не се откриват пълни форми на бройни нарушения по половите хромозоми при изследваните от нас жени с РН. Липсата на очаквана монозомия X в пълна форма вероятно се дължи на фенотипна изява (пренатална, детска възраст и пубертет) и ранно диагностициране.

Таблица 4. Пълни форми на бройни хромозомни нарушения по половите хромозоми при пациенти с РН

ПОКАЗАНИЕ (клинична диагноза)	ГРУПА	КАРИОТИП
Инфертилитет	I	47,XXY
Азооспермия	I	47,XXY
Азооспермия	I	48,XXYY, inv(9)(qh)

Мозаичните форми по половите хромозоми са най-често срещаните бройни нарушения при пациентите с РН, като в 88,2% това бяха лица от женски пол. Те са намерени при 30 жени (1,7% спрямо общия брой пациенти, 30/1733; 3,4% спрямо всички жени, 30/870; 81,2% от всички бройни нарушения, 30/37), и 4 мъже (0,2% спрямо общ брой пациенти, 4/1733; 0,5% спрямо всички мъже, 4/863; 10,8% от всички бройни нарушения, 4/37). С прилагането на теста на Фишър се намери статистическа свързана зависимост между пола и полово-хромозомния мозаицизм, като при женския пол честотата му е сигнификантно по-висока ($p < 0,0001$). Същото се установява и чрез анализа на статистически хипотези ($\chi^2 = 20,07$; $p < 0,0001$).

Броен мозаицизъм при жени

При използване на стандартизиран протокол се намира по-висок процент на X-хромозомен мозаицизъм - две или повече клетъчни линии в един и същ организъм. Установява се предимно кариотип в съчетание с монозомия X. По литературни данни ниският процент (1-2%) с кариотип 47,XXX, както и липсата на една X хромозома в единична клетка при 46,XX жени (много ниско-степенен мозаицизъм), се приема за норма, т.к. се предполага, че се касае за едноклетъчен псевдомозаицизъм (68,80,115,145,160,161). В други проучвания дори се счита, че не се индикира повишен риск за репродукцията при мозаицизъм в < 10%, за жени без стигми за синдром на Търнър (120). *В нашето проучване за бройно нарушение в мозаичен вариант приехме наличие на минимум две клетки от една и съща патологична клетъчна линия, а за ниско-степенен мозаицизъм - при процент на аберантната клетъчна линия ≤ 10 .*

В 2 случая беше установен мозаицизъм само от по две патологични клетъчни линии: случай №1 (тризомия X в 96,2% към тетразомия X в 3,8%) и случай №24 (монозомия X в 73,4% и тризомия X в 26,6%) (таблица 5). И двете жени са от група I, подгрупа 1 с дългогодишен стерилитет, а при първата има и олигоаменорея. По-висок процент на патологична клетъчна линия (случай №7) беше намерен при 1 жена на 34 г от група I, подгрупа 1. Мозайка от три патологични клетъчни линии, но в съчетание с доминираща нормална линия показва още 1 жена от групата с инфертилитет, при която има и два неуспешни опита от АРТ (случай №29). В същата група (група I), но подгрупа 1, попадат и 4 други пациентки с патологична клетъчна линия - монозомия X, в различно процентно съотношение (случаи №8, №18, №26, №28, съответно 10%,14%,10%,16,7%). При последната пациентка (случай №28), в допълнение са изследвани и кожни фибробласти, при които също се установява мозаичен кариотип с монозомия X, в по-нисък процент (6,7%).

Броят на жените-мозаици по половите хромозоми са разпределени почти по-равно между група I (инфертилитет) – 13 лица и група II (спонтанни борти) – 14 лица. Прави впечатление, обаче, че при жените принадлежащи към група II се касае основно за наличие на нискостепенен мозаицизъм (от 4% до 6,7%) **в съчетание с нормална клетъчна линия**, докато при тези от група I – процентът на патологичната клетъчна линия в повечето случаи е доста по-висок, като при две от пациентките дори бяха намерени само патологични клетъчни линии (случай №1 и №24).

Таблица 5. Мозаични форми на бройни нарушения по половите хромозоми при жени с РН

№	ПОКАЗАНИЯ	КАРИОТИП	Аберантна клетъчна линия в %
1	Първичен инфертилитет-олигоаменорея	mos47,XXX[25]/48XXXX[1]	100 (96,2/3,8)
2	2 СПА	mos45,X[2]/46, XX [48]	4
3	2 СПА	mos45,X[2]/46,XX[48]	4
4	3 СПА	mos45,X[3]/46,XX[47]	6
5	2 СПА	mos45,X[2]/46,XX[48]	4
6	Инфертилитет - 3 неуспешни ART	mos45,X[2]/46,XX[48]	4
7	Инфертилитет	mos47,XXX [17]/ 46,XX[13]	56,7
8	Първичен инфертилитет	mos45,X[3]/46,XX[27]	10
9	3 СПА	mos45,X [3]/46,XX[47]	6
10	Първичен инфертилитет	mos45,X[4]/47XXX[1]/46XX[95]	5
11	2 СПА	mos45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[47]	6
12	Хромозомна болест на плода	mos47,XXX[2]/49,XXXX[1]/46,XX[48]	6
13	Инфертилитет-3 неуспешни ART	mos45,X[2]/46,XX[48]	4
14	1СПА,1прекъсната бременност и 1 хиперактивно дете	mos45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[27]	10
15	2 СПА	mos45,X[2]/46,XX[48]	4
16	2 СПА	mos47,XXX[3]/46,XX[47]	6
17	2 СПА	mos47,XXX[3]/46,XX[47]	6
18	Първичен инфертилитет	mos45,X[7]/46,XX[43]	14
19	Първичен инфертилитет	mos45,X[2]/46,XX[28]	6,7
20	3 СПА	mos45,X[3]/46,XX[47]	6
21	2 СПА	mos45,X[2]/ 46,XX [28]	6,7
22	Прекъсната бременост с T21 при плода	mos45,X[1]/47,XXX[1]/46,XX[28]	6,7
23	2 СПА	mos45,X[2]/46,XX [48]	4
24	Инфертилитет от 2 год.	mos45,X[22]/47,XXX[8]	100 (73,4/26,6)
25	3 СПА	mos45,X[2]/47,XXX[1]/46,XX[27]	10
26	Първичен инфертилитет	mos45,X[3]/46,XX,[27]	10
27	Първичен инфертилитет	mos47,XXX[2]/46,XX[28]	6,7
28	Първичен инфертилитет	45,X,15ps+pstk+[5]/46,XX,15ps+pstk+[25] фибробласти 45,X,15ps+pstk+[2]/46,XX,15ps+pstk+[28]	16,7 6,7
29	Инфертилитет - 2 неуспешни ART	mos45,X[4]/47,XXX[2]/48,XXXX[1]/46,XX[23]	23,4
30	2 СПА	mos45,X[4]/47,XXX[1]/46,XX[95]	5

При пациентките от група III (комбинирани репродуктивни нарушения) също е налице нискостепенен мозаицизъм по половите хромозоми. В тази група, една от жените (случай №22) независимо, че е показала много ниско степенен полово - хромозомен мозаицизъм, е отчетена за паталогична, т.к. тук повода за изследване е прекъсната бременност с T21, което показва тенденция към повишена склонност за неправилно разделяне на хромозомите.

Броен мозаицизъм при мъже

От изследваните мъже с РН, мозаични форми на бройни нарушения бяха установени само по половите хромозоми, общо в 4 пациента (таблица 6). При двама се касаеше за нискостепенен мозаицизъм в 4% патологична клетъчна линия за ХХУ синдром (случай №1 от група II и случай №3 от група I). Нисък процент мозаицизъм се намира основно при мъже от двойки със СПА, полово-хромозомният мозаицизъм при мъжете се свързва основно с техния инфертилитет (50,54). При третия пациент (случай № 2 от група II) се установиха две патологични клетъчни линии (отсъстваща Y хромозомата) и една нормална, съответна на мъжки пол. При четвъртия случай, мъж с астенотератозооспермия (случай №4, група I), се установи 10% патологична клетъчна линия на монозомия X.

Таблица 6. Мозаични форми на бройни нарушения в половите хромозоми при мъже с РН

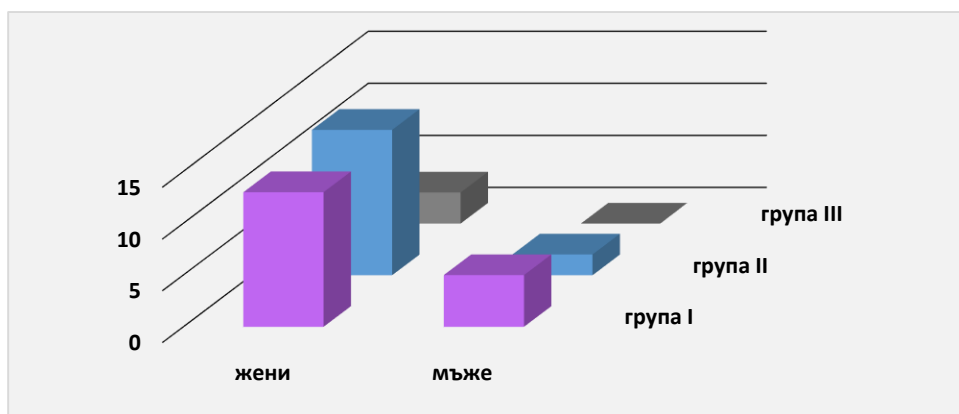
№ на пациент по реда на изследване	ПОКАЗАНИЯ за изследване	КАРИОТИП	Аберантна клетъчна линия в %
1	2 СПА	mos47,XXY[2]/46,XY[48]	4
2	3 СПА	mos45,X[1]/46,XX[2]/46,XY[47]	6
3	Първичен инфертилитет-1 неуспешно АРТ	mos47,XXY[2]/46,XY [48]	4
4	Астенотератозооспермия	mos45,X,[3]/46,XY[27]	10

Разпределение на разкритите бройни хромозомни аномалии според вида на репродуктивното нарушение (група)

Съгласно обобщените резултати може да се каже, че бройни нарушения бяха намерени почти по равно в група I – 18 лица и група II -16 лица. Най-малко бяха пациентите от **група III** (комбинирани репродуктивни неудачи) – 3 лица (таблица 7; фиг.16). Не се установи статистическа значима зависимост между груповата принадлежност на пациентите с открити бройни нарушения и пола ($\chi^2=2,051$, $p=0,35$).

Таблица 7. Разпределение на бройни хромозомни нарушения по пол, форма и група РН

ГРУПИ	ЖЕНИ					МЪЖЕ					ОБЩО			p
	ПФ	МФ	% общ брой	% брой жени	% бройни	ПФ	МФ	% общ брой	% брой мъже	% бройни	бройни нарушения	% общ брой пациенти	% бройни	
I група	0	13	0,7	1,5	35,1	3	2	0,3	0,6	13,5	18	1,0	48,6	
II група	0	14	1,2	2,3	37,8	0	2	0,1	0,2	5,4	16	0,9	43,2	
III група	0	3	0,2	0,3	8,1	0	0	0	0	0	3	0,2	8,1	
ОБЩО	0	30	1,7	3,4	81,1	3	4	0,4	0,8	18,9	37	2,1	100	



Фигура 16. Разпределение на бройните нарушения по полови хромозоми по пол и групи

В огромната си част, очаквано, бройните нарушения са установени в мозаична форма и то основно при лица от женски пол. И тук делът на пациентите жени от група I (13 лица) и група II (14 лица) е почти равен. По-висока степен на мозаицизъм по патологична клетъчна линия, обаче, се установява при жените от **група I** (инфертилитет без или с приложение на АРТ процедура) (съответно **подгрупа 1**, 10/13, 77% и **подгрупа 2**, 3/13, 23%). **Пълна** форма на бройно нарушение бе открито единствено по **половите** хромозоми, при лица от **мъжки** пол от група I (таблица 7).

При разпределението на пациентите от група I и група II в подгрупи, се вижда че, в група I преобладават лицата с първичен инфертилитет, без АРТ процедури – 66,7% т.е.10/15, а от група II преобладават тези с 2 СПА - 68,7% т.е. 11/16, следвани от тези с 3 СПА (подгрупа 2, 31,3%, 5/16) (таблица 8). При двойки с 4 и 5 СПА не беше намерена бройна патология, вероятно защото, както показват и литературните данни, с повишаване броя на спонтанните аборти нараства честотата на **структурните** хромозомни нарушения (13,14,22,63,70,72,167).

Таблица 8. Общо разпределение на МФ на бройните нарушения по пол, групи и подгрупи

	Група I			Група II				Група III	
	инфертилитет без АРТ	инфертилитет (с неуспешни АРТ)	Мъжки фактор	2 СПА	3 СПА	4 СПА	5 и > СПА	КРИ	Фамилно хромозомно преустройство
жени	10	3	0	10	4	0	0	3	0
мъже	0	1	1	1	1	0	0	0	0
общо	10	4	1	11	5	0	0	3	0
общо	15			16				3	

Обобщение по бройни хромозомни нарушения

Известно е по литературни данни, че **бройните** хромозомни аберации, намерени при двойки с РН, включват основно половите хромозоми и са представени най-често под формата на **мозаицизъм, основно в лицата от женски пол** (68,161). Нашите резултати, корелират с резултатите докладвани от сходни проучвания, според които по-високият процент на хромозомни нарушения при жени спрямо мъже (съответно 4,44% към 1,89%) е свързан с установеният по-голям брой варианти на полово хромозомен мозаицизъм при жени с РН, под формата на нискостепенен мозаицизъм (68,80,115,120,145,160,161). **Morel F, et al.**, в своето проучване например, дори докладват 10 пъти по-висок процент хромозомни нарушения при инфертилни жени (13%) спрямо инфертилни мъже (2,7%), като тази разлика се дължи именно на намерения голям брой варианти на полово хромозомен мозаицизъм при жените (91,7% от всички аберации) (128).

По отношение на групата репродуктивни нарушения, нашите резултати за анеуплоидии показват, че по-висок процент на патологична клетъчна линия по половите хромозоми се открива именно в групата с инфертилитет. Смята се, че високият процент мозаицизъм по половите хромозоми се отразява на успешната репродукция (особено при неуспешната асистирана репродукция) (128,132,186), въпреки, че наличието му в различните тъкани и последиците от него все още не са напълно проучени.

От друга страна, според редица съобщения, нискостепенният полово хромозомен мозаицизъм е често срещан сред фенотипно нормални индивиди, кариотипирани поради анамнеза за повтарящи се СПА. Това се потвърди и от нашето проучване, където такъв беше отчетен именно в групата с повтарящи се СПА. Ако се приеме тезата, че мозаицизмът по половите хромозоми е предпоставка за ранна менопауза, връзката на анеуплоидията с ранната менопауза би обяснила повтарящите се загуби на бременност при тези жени (136,165).

На базата на описаните по-горе резултати, може да се заключи, че при лица с репродуктивни проблеми, **бройните** хромозомни нарушения:

- 33.63% (37/ 110) са почти два пъти *по-рядко* срещани от структурните 63,64% (73/110);
- в голямото си болшинство (81,1% т.е. 30/37) ангажират лица от *женски пол*;
- в голямото си болшинство (91,9% т.е. 34/37) са представени в *мозаична* форма:
 - ✓ със сходен дял между група I и група II, но с най-висок процент на патологична клетъчна линия в група I (инфертилитет)

- ✓ по отношение група II, е характерен ниско-степенен мозаицизъм по полови хромозоми, като с повишаване броя на СПА намалява вероятността да се намери мозаицизъм (за сметка на по-високата честотата на структурни хромозомни нарушения виж раздел IV.2.2.2).

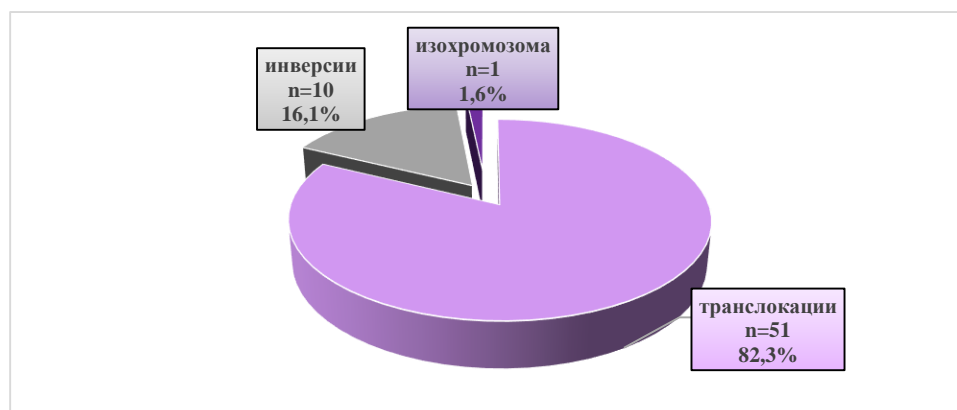
IV.2.2.2. Структурни хромозомни нарушения

Структурни хромозомни преустройства бяха открити в 70 пациента от изследваната извадка. Касае се за *балансиран* преустройства в пълна форма (ПФ) - 62 лица и мозайчна форма (МФ) - 8 лица.

Структурни хромозомни нарушения в пълна форма

Намерените структурни хромозомни аберации в пълна форма (фиг.17) при 62 пациенти с репродуктивни неудачи са:

- ***Транслокации*** – реципрочни и Робертсонови (51 лица);
- ***Инверсии*** – парацентрични и перичентрични (10 лица);
- ***Изохромозома*** - (1 лице);
- ***Инсерция (еднопътна транслокация)*** – (0 лица).



Фигура 17. Разпределение на пациентите по вида на структурна хромозомна аберация ПФ

Транслокация

Най-често откриваната структурна хромозомна аберация в ПФ в изследваната от нас извадка пациенти с РН е **транслокацията**.

Общо **51 пациенти** (82,3% т.е. 51/62 от всички структурни преустройства) са диагностицирани с транслокации:

- ✓ *Реципрочни* балансираны транслокации – 39 (76,5%)
- ✓ *Робертсонови* транслокации – 12 (23,5%).

По литературни данни *честотата* на балансираните преустройства варира от 0,08% до 0,3% (19,42,66) в общата популация, но сред пациенти с репродуктивни неудачи за последните 20 години се докладва 1,28% до 4,5% (151), съпоставима със съобщената от нас (2,9% - 51/1733). Установената от нас честота, съгласно t-критерия, е статистически значимо по-висока от тази в нормалната популация ($t=5,38$; $p<0,001$)
 Прави впечатление, че установеният от нас процент транслокации (46,3%; 51/110) е малко по-нисък от аналогично проучване за *българската* популация (58,4%) (151). Вероятно обяснение е три пъти по-малкия брой изследвани от нас пациенти (1733 спрямо 5088) в по-малък период на обхващане (16 спрямо 20 години).

По отношение на *вида* на структурните преустройства откритите *реципрочни транслокации* в 62,9% (39/62 от всички структурни преустройства) са съпоставимо по-малко от докладвани в сходни проучвания 81% (63,70,167,180,201). Балансираните реципрочни транслокации в нашето проучване са с по-нисък дял (76,5% спрямо 88%) при два пъти по-висок дял Робертсонови транслокации (23,5% към 12%) и при сравнение цитираното по-горе българско проучване (151). Най-често срещаната структурна аберация показва дял от 2,3% (39/1733), преценена спрямо всички обхванати в проучването лица. Той е по-нисък от съобщения в литературата, където балансираните реципрочни транслокации представляват 4,8 - 5,5% от патологията намерена в изследвани двойки с РН (54,63,70,167,180,201). Вероятно причини за това са популационни различия, мащаб на проучването, селективни критерии за изследване, дълбочина на резолюция и техника на цитогенетичен анализ (183). Този факт беше и основен мотивиращ фактор за опит за въвеждане на молекулярно-цитогенетичен анализ при нашия контингент изследвани пациенти.

Показанията, видът на кариотипа и групата репродуктивно нарушение са представени детайлно на таблици 9 и 10.

Таблица 9. Реципрочни транслокации, намерени при жени по групи (с различен цвят са обозначени различни семейства с членовете - носители на различно преустройство)

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
1	4 СПА и 1 починало дете с МВА	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
2	Родено дете с хромозомна болест 47,XX,+der(9),t(2;9)(q36;q21)mat	III	46,XX,t(2;9)(q36;q21)
3	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(2;9)(q36;q21)
4	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(7;22)(q11;q12)
5	Родено дете с хромозомна болест 46,XY,t(5;19)(q12;q13.1)mat	III	46,XX,t(5;19)(q12;p13.1)
6	2 СПА	II	46,XX,t(9;11)(q10;q10)
7	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(8;13)(q22.1;q31)
8	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(8;13)(q22.1;q31)
9	2 СПА	II	46,XX,t(15;17)(q22;q12)

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
10	2 СПА	II	46,XX,t(2;21)(q22;q21)
11	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
12	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(7;9)(p13;q32)
13	Родено дете с хромозомна болест 47,XY+mar	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
14	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(5;15)(p15;q22)
15	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(1;9)(q21;q32)
16	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
17	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
18	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
19	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(7;22)(q11;q12)
20	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
21	3 СПА	II	46,XX,t(12;18)(q21.3;q12.3)
22	Родено дете с хромозомна болест 46,XY,der(5)t(5;11)(p15.2;q23.2)	III	46,XX,t(5;11)(p15.2;q23.2)
23	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
24	4 СПА	II	46,XX,t(11;13)(q22.2;q14.2)
25	Родено дете с хромозомна болест 46,X,der(X)t(X;7)(q21.1;q31.1)mat	III	46,X,t(X;7)(q21.2;q31.1)
26	Родители на дете с хромозомна болест 46,XX,der(9)t(9;14)(p22;q24.3)	III	46,XX,t(9;14)(p22;q24.3)
27	Родено дете с хромозомна болест 46,XY,der(18)t(7;18)(q35;q22)	III	46,XX,t(7;18)(q35;q22)

От установените транслокации, 26 са между автозомни хромозоми, и само една включва автозома и полова хромозома - 46,X,t(X;7)(q21.2;q31.1) (случай № 25). Повода за изследване при това семейство е родено дете с дериватна X хромозома с майчин произход - 46,X,der(X)t(X;7)(q21.1;q31.1) mat.

Реципрочните транслокации бяха намерени при 8 двойки със спонтанни аборти, половината от които с по 2 СПА (случаи № 6, № 9 и № 10 от таблица 9 и случай № 1 от таблица 10).

Таблица 10. Реципрочни транслокации, намерени при мъже по групи

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
1	2 СПА	II	46,XY,t(13;20)(q21;q12)
2	Фамилно хром. престройство брат с 47,XXY, t(17;20)(q11;q13.2)	III	46,XY,t(17;20)(q11;q13.2)
3	Родено дете със с-м на Даун	III	46,XY,t(11;22)(q24;q12.3)
4	4 СПА	II	46,XY,t(7;9)(p13;q32)
5	Две деца с ВА и 1 аборт по мед.показания с ВА	III	46,XY,t(3;13)(p25;q31)
6	Родено дете с ХБ	III	46,XY,t(11;22)(q23.3;q11.2)
7	Родител на дете с ХБ- der(5)der(8)	III	46,XY,t(5;8;13;)(p14;q23;q31)
8	Множество. СПА	II	46,XY,t(5;7)(q34;q33)
9	Първичен инфертилитет	I	46,XY,t(7;17)(q31.1;q11.2)
10	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XY,t(1;9)(q21;q32)mat
11	Олигозооспермия	I	46,XY,t(3;15)(p25;q15)
12	Родители на дете с хидроцефалия и родено дете с МВА	III	46,XY,t(9;18)(p22;p11.2)

В тази група попада интересен случай на мъж – родител с рядко срещана тройна транслокация, 46,XY,t(5;8;13;)(p14;q23;q31) (случай № 7). Поводът за изследване беше родено дете с ХБ с наличие на две дериватни хромозоми (der(5) и der(8)), а именно - 46,XX,der(5)t(5;8;13;)(p14;q23;q31),der(8)t(5;8;13;)(p14;q23;q31)pat (74). Открити са и

реципрочни транслокации при мъж с първичен инфертилитет и мъж с олигоазооспермия (случаи №9 и №11).

Робертсонови транслокации бяха установени при общо 12 пациента (12/62, 19,3% от всички структурни преустройства в ПФ). Те са в 50% (n=6) между акроцентричните хромозоми 13/14, преобладаващи в жени (в 83,3% или 5/6). Детайлното представяне по показание, пол и група репродуктивно нарушение представено в таблица 11 и 12. По литературни данни, този е най-често срещан - около 75% от всички варианти (54). Установеният от нас процент е по-нисък, но като цяло се наблюдава еднопосочност между получените от нас резултати и тези съобщени в литературата.

Таблица 11. Видове Робертсонови транслокации, намерени при жени

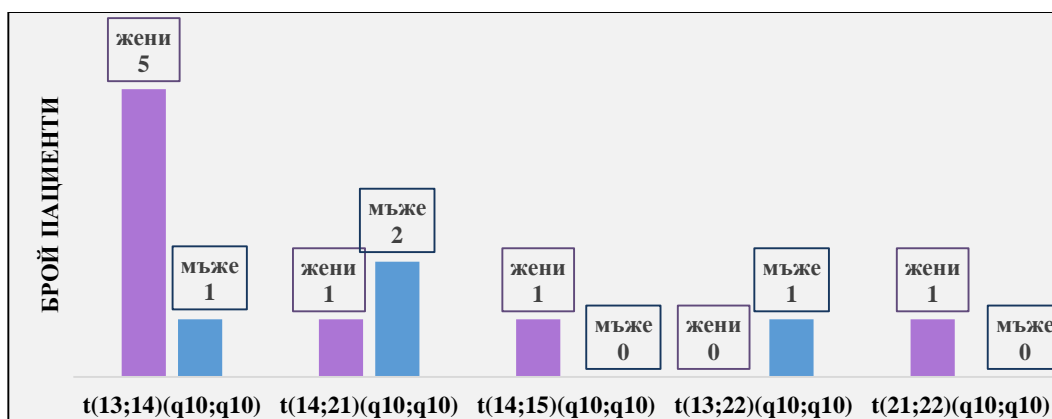
№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	ПОД ГРУПА	КАРИОТИП
1	2 СПА	II	1	45,XX,rob(13;14)(q10;q10)
2	Фамилно хромозомно преустройство	III	2	45,XX,rob(13;14)(q10;q10)
3	Носителство на балансирана транслокация	III	2	45,XX,rob(14;21)(q10;q10)
4	Инфертилитет	I	1	45,XX,rob(21;22)(q10;q10)
5	Инфертилитет с 1 неуспешно АРТ	I	2	45,XX,rob(14;15)(q10;q10)
6	Инфертилитет с 5 неуспешни АРТ	I	2	45,XX,rob(13;14)(q10;q10)
7	2 СПА	II	1	45,XX,rob(13;14)(q10;q10)
8	Родители на дете с t(13;14) + 1 СПА	III	1	45,XX,rob(13;14)(q10;q10)

Таблица 12. Робертсонови транслокации, намерени при мъже по групи

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	ПОД ГРУПА	КАРИОТИП
1	Родено дете с хром. болест - 46,XY,der(14;21),+21	III	1	45,XY,rob(14;21)(q10;q10)
2	Инфертилитет	I	1	45,XY,rob(13;22)(q10;q10)
3	Инфертилитет с 3 неуспешни АРТ	I	2	45,XY,rob(14;21)(q10;q10)
4	Фамилно хромозомно преустройство	III	2	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)

Пациентите имат повишен риск от неправилно разделяне на хромозомите, което по време на първото мейотично делене може да доведе до различни форми на сегрегация и да резултира в анеуплоидия на транслоцираните хромозоми.

Транслокационна тризомия 14 в плода нормално води до загубата му още в първи триместър или до невъзможност за бременност (50%) (105). Това бе потвърдено и от нашите резултати, където при три от жените с rob (13;14) има повтарящи се ранни СПА, а при другите две – неуспешни АРТ процедури (фиг.18).



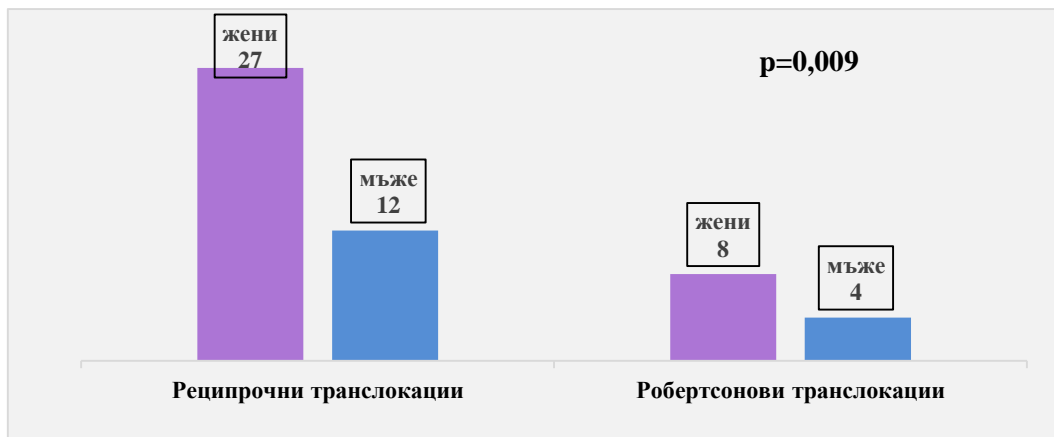
Фигура 18. Разпределение на Робертсоновите транслокации по вид и пол

За носителите на rob(13;14) общият риск от аборт не се очаква да бъде значително различен от статистически определения от 15% (105). Очаквана, спрямо същия автор, беше и втората по честота Робертсонова транслокация - между хромозоми 14/21, установена при нас в 25% от всички намерени Робертсонови транслокации (3/12).

Не беше открит пациент от мъжки пол с 45,XY,rob(14;15)(q10;q10) или 45,XY,rob(21;22)(q10;q10), нито пациент от женски пол с 45,XX,rob(13;22)(q10;q10). Робертсонова транслокация 14/15 и 21/22 се среща изключително рядко при мъже. *Kumar R, et al., (105)* например в своето проучване върху 120 лица от мъжки пол намират само един пациент с rob(14;15) (0,8%) и нито един с rob(21;22). Последната е докладвана като рядък, частен случай при мъж с дългогодишен инфертилитет (170). В друго проучване на *Ogur G, et al.,* намират две лица с rob(14;15) и едно с rob(21;22) от общо 14 робертсонови транслокации, всички при мъже с инфертилитет (141). Подобна закономерност се наблюдава при жени по отношение rob(13;22), рядко преустройство между акроцентрици (<1% от всички Робертсонови варианти) (16), съобщено в по един пациент с инфертилитет (16,18).

Значимостта на Робертсоновите транслокации се определя както от поведението на участващите хромозоми по време на мейоза, така и от пола - с повишен риск за гаметна смърт и невъзможност за бременност или раждане на дете с хромозомна болест. При носителство на транслокацията от мъжа вероятността за живородено дете с хромозомна болест е нисък (<1%), поради запазена фертилност, за сметка на повлияване на сперматогенезата (олигоспермия), невъзможност за бременност (34,40,140).

По отношение на *пола*, прави впечатление, че при **жените** бяха намерени статистически значимо **два пъти повече реципрочни и робертсонови транслокации** (n=35, 68,6%) спрямо тези при мъжете (n=16, 31,4%) (p=0,009, Фишър тест) (фиг.19).



Фигура 19. Разпределение на транслокациите по пол

Двукратното преобладаване на лица от женски пол с реципрочни транслокации (27 към 12) е съпоставимо с данните от проучвания при двойки с РН (64,139,180). Вероятно обяснение за половото различие е, че носителството на реципрочни транслокации при мъжете може да доведе до инфертилитет, т.к. присъствието на автосомна реципрочна транслокация води до смущение в мейозата и от там до задържане в сперматогенезата. Нещо повече, мейотичните разстройства, причиняващи хромозомни нарушения, се ограничават в сперматогенните клетки и не се долавят по време на изучаването на соматичните карิโอטיפове (64). Резултатите от други проучвания също показват, че относителният дял на балансирани транслокации при двойки с РН, е по-висок при жените отколкото при мъжете (21,34). Обяснението е свързано с факта, че тези аберации са съвместими с фертилността при жени, докато при мъже, те се асоциират с тяхната инфертилност поради увреждане в сперматогенезата.

От описаните до тук резултати може да се обобщи, че балансирани реципрочни транслокации (ПФ) се срещат в над половината 62,9% (39 от 62) от всички структурни преустройства на двойки с РН. Техните носители имат повишен риск ($\geq 50\%$) за хромозомна нестабилност (частични дупликации/делеции) по време на гаметогенезата, което води до неправилна мейотична сегрегация на балансираната транслокация и по-висок риск от повтарящи се СПА, инфертилитет, раждане на деца с малформации (39,62,140,143). В зависимост от вида на реципрочната транслокация рискът за раждане на дете с малформативен синдром варира между 1 и 50%. В този смисъл разкриването на балансирана реципрочна транслокация в двойки с РН има както важно диагностично, така и важно прогностично значение при евентуална бъдеща бременност.

Инверсия

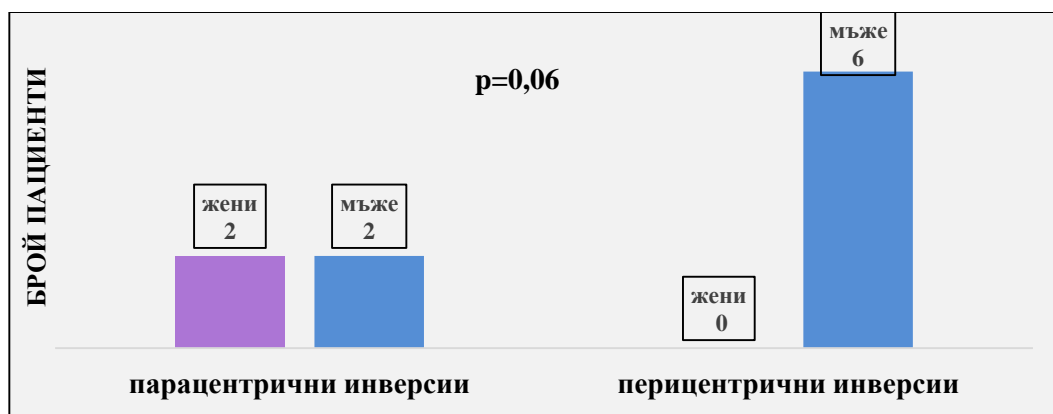
Втората по честота структурна аберация намерена в пациенти с РН в нашето проучване е инверсията. Тя беше установена в **16,1%** (10/62 с разкрито балансирано преустройство); или 0,6% от всички изследвани пациенти (10/1733).

Прави впечатление, че при този вид балансирано структурно преустройство пореоблават перичентричните (9,6%; 6/62) над парацентричните (6,4%; 4/62), въпреки, че и при двата вида определящ е по-скоро размерът на инвертирания сегмент за риск от аборт при носители. Обзорно проучване посочва, че само тези с големина повече от 100 Мвр биха били сигнификантни за фертилността (146).

Процентът на намерените от нас *перичентрични* инверсии (9,6%) е сходен с този посочен в други проучвания в семейства с РН - около 8% от балансираните преустройства (60). Относно *парацентричните* инверсии, установеният от нас процент (6,4%) е по-нисък в сравнение с този докладван от други проучвания – 10,3% (107). Причината за това вероятно е по-трудната идентификация на еднораменните завъртания на резолюция 400-550 бенда (107,146).

Установената от нас честота на инверсиите при семейства с РН е в пъти по-висока от тази в общата популация (1-3% за перичентрични и 0,1-0,5% за парацентрични инверсии) (107,152) и има статистическа значимост (съответно $t=10,7$; $p<0,001$ за перичентричните инверсии и $t=10,4$; $p<0,001$ за парацентричните инверсии). С това, нашите резултати потвърждават тяхната ролята в репродукцията.

Интересен е фактът, че перичентрични инверсии са намерени само при мъже (фиг.20), но този факт има по-скоро случаен характер, поради липса на сигнификантна значимост по метода за статистическа обработка на нашите резултати - доказано с точният тест на Фишър по отношение пола на пациентите $p=0,06$ (към броя на пациентите по пол); $p=0,2353$ (към всички иверсии). При анализа на литературата включена в настоящата дисертация също не се отчита полово значима разлика в носителите на инверсии (13,21,122,180,189).



Фигура 20. Разпределение на намерените инверсии по вид и пол

Всички открити инверсии в изследваната извадка пациенти са представени в таблица 13.

Таблица 13. Пациенти с репродуктивни неудачи, при които са установени инверсии

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	ПОД ГРУПА	КАРИОТИП
1	2 СПА	II	1	46,XY, inv(2)(p11.2-q13)
2	3 ранни СПА	II	2	46,XY,inv(2)(p11.2-q13)
3	Инфертилитет	I	1	46,XY,inv(2)(p11.2-q13)
4	Фамилно хромозомно преустройство	III	2	46,XY,inv(7)(p12-q21.1)
5	Дете с 46,XY,inv(7)(p11;q11.2)	III	1	46,XY,inv(7)(p11-q11.2)
6	Родители на дете с inv(4)	III	1	46,XY,inv(4)(p16.3-q13)
7	Родители на дете с inv(10)	III	1	46,XY,inv(10)(q11.2-q23.2)
8	Първичен инфертилитет	I	1	46,XY,inv(11)(q21-q24)
9	Инфертилитет	I	1	46,XX,inv(13)(q13-q31)
10	Родители на дете с inv(18)	III	1	46,XX,inv(18)(q11.2-q21.1)

Най-често намираната от нас инверсия е перицентрична инверсия в хромозома 2 - inv(2)(p11.2-q13). И при тримата пациенти се засягат идентични точки на счупване, и са от мъжки пол. Други две перицентрични инверсии, също при мъже, засягат хромозома 7 с различни точки на счупване - inv(7)(p12-q21.1) и inv(7)(p11-q11.2) (случаи №4,5). По една инверсия е открита в 4, 10, 11,13 и 18-та хромозома. Няма статистическа значимост фактът, че в настоящото проучване, най-честа е инверсията в хромозома 2 ($\chi^2=0,6043$; $p=0,9878$).

По отношение видът на репродуктивното нарушение двама от пациентите са насочени по повод ранни СПА в семейството (случаи №1 и 2) (група II), а трима - инфертилитет (случаи №3, 8 и 9) (група I) (таблица 13). При четирима от пациентите поводът за изследване е търсене на родителски произход/ фамилност на хромозомното преустройство; нямаме данни за предишна репродуктивна неудача в семейството (случаи № 4, 5, 6, 7, 10).

Изохромозома

Намерен е само един пациент – жена на възраст 40г. с изохромозома по дълго рамо на X -хромозомата - 46,X,i(X)(q10), като повод за изследване е посочен родено дете с хромозомна болест - 46,i(Xq)Y.

Структурни хромозомни нарушения в мозаична форма

В изследваната от нас извадка пациенти с РН бяха намерени и 8 пациента с мозаични варианти на структурни аберации. Преобладаваше нисък процент на аберантната клетъчна линия (4-10%), лицата от мъжки пол, показание – инфертилитет. Всички намерени структурни аберации в мозаични форми са представени в таблица 14. Това са 3 мъже и 2 жени с инфертилитет (група I); 2 мъже от двойки със СПА (група II), 1 мъж с комбинирана репродуктивна история (група III).

Таблица 14. Пациенти със структурни аберации - мозаична форма

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП	% аберантна кл. линия
1	Прекъсната бременност поради ВА на плода	III	46, XY,t(7;14)(q36;q21.1)[1]/46,XY,t(1;6)(q21;p11)[1]/46,XY[28]	6,7
2	3 неуспешни ART	I	mos46,XX,t(5;6)(q10;q10[2])/46,XX[28]	6,7
3	2 СПА	II	mos46,XY,t(?;21)(?;q22.2)[3]/46,XY[27]	10
4	3 СПА	II	mos46,dup(X)(p22.2;22.3)Y [4]/46,XY [26]	13,3
5	Вторичен инфертилитет	I	mos45,XY,t(13;21)(q10;q10)[2]/46,XY [48]	4
6	3 неуспешни ART	I	mos 46,X,del(Y)(q11.2?)[3]/46,XY[47]	6
7	3 неуспешни IVF	I	mos46,XX,16q+[2]/46,XX[48]	4
8	2 неуспешни ICSI	I	mos46,XY,1qh+,del(5)(q22-q23)[17]/46,XY,1qh+[13]	56,7

Рядък случай (№8) беше установената интерстициална делеция в дълго рамо на 5 хромозома в 56,7% от анализираниите метафази. В този регион е картиран генът APC, молекулни дефекти в който водят до увеличен риск от развитие на Фамилна Аденоматозна Полипоза (ФАП), както и други клинично значими гени, като TSSK1B гена, за който се счита, че има отношение към мъжката репродукция (8).

В 6 пациента (случаи №1, №2, №3, №5, №6 и №7) се касаеше за нискостепенен мозаицизъм. Значението за репродуктивния изход при нисък процент на аберантната клетъчна линия може да бъде спорно преценено, като спорадично явление - резултат от влияние на външен фактор (в т.ч. технически артефакт); мутагени с ендегенен произход (например, при някои автоимунни заболявания или нарушен обмен на витамин B₁₂); вътрешни фактори (семейна предразположеност) (9). В някои случаи мутагенния етиологичен фактор не може да бъде идентифициран, и в този случай възникналите нарушения се определят като спонтанно възникнали, а не индуцирани (9). Литературните данни и номенклатура не дават ясен праг за процентът на клетките с

аберантен кариотип считащ се за хромозомно отклонение със значение за репродукцията (116). Приетият от нас протокол (Методи) за наличие на минимум две клетки от една и съща патологична клетъчна линия ни позволи да потвърдим принадлежността на находките при тези пациенти като хромозомно отклонение.

IV.2.2.3. Комбинирани хромозомни нарушения

Комбинираните хромозомни нарушения включват наличие едновременно на структурни и бройни промени в даден пациент. В изследваните от нас пациенти с репродуктивни неуспехи, бяха открити три лица със съчетание от бройни и структурни хромозомни нарушения (табл. 15). И тримата пациенти са от женски пол. Нямаме данни за произхода на структурното хромозомно преустройство в тези комбинирани нарушения.

Две пациентки са изследвани по повод два спонтанни аборта - 45X,t(5;7)(q33;q22)[2]/46,XX,t(5;7)(q33;q22)[28] и 46,XduplX(p22.2→pter)[2]/ 47,XXX[2]/46,XX[26] (таблица 15).

Таблица 15. Пациенти с комбинирани хромозомни нарушения

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	ПОД ГРУПА	КАРИОТИП
1	Родено дете с ХБ	III	1	45,X,t(2;9)(q36;q22)[6]/46,XX,t(2;9)(q36;q22)[24]
2	2 СПА	II	1	45X,t(5;7)(q33;q22)[2]/46,XX,t(5;7)(q33;q22)[28]
3	2 СПА	II	1	46,XduplX(p22.2→pter)[2]/47,XXX[2]/46,XX[26]

Интересен е случаят с повод за изследване родено дете с хромозомна болест, (синдром на Даун), в чийто кариотип едновременно с допълнителна хромозома 21, се установява и условно балансирана транслокация (2;9) във всички анализирани метафази (пълна форма). При изследване на родителите, носител на структурното преустройство в пълна форма се оказва майката; нещо повече, в 20% от анализираните метафази се установи и втора, патологична линия с монозомия X - 45,X,t(2;9)(q36;q22)[6]/46,XX,t(2;9)(q36;q22)[24]. Условно е прието, че на хромозомно ниво структурни преустройства нямат излишък или загуба на наследствен материал и съответно фенотипен ефект поради – т.н. балансирани хромозомни аномалии. Въпреки, че се приемат за благоприятни, натрупващи се в семействата, имащи почти пълна липса на фенотипна изява (185), голяма част от публикуваните балансирани хромозомни преустройства са на индикирани / засегнати индивиди. Откриването им при двойки с РН е в подкрепата на хипотезата за „условна“ балансираност и необходимост от търсене молекулни данни за това (24).

IV.2.3. Разпределение на *структурните* хромозомни аномалии според вида на репродуктивното нарушение (група)

Разпределение на откритите структурни хромозомни аберации (в ПФ) според групата на репродуктивното нарушение за двата пола са представени в таблица 16.

Таблица 16. Разпределение на пациентите по вид на структурната аберация, пол и групи

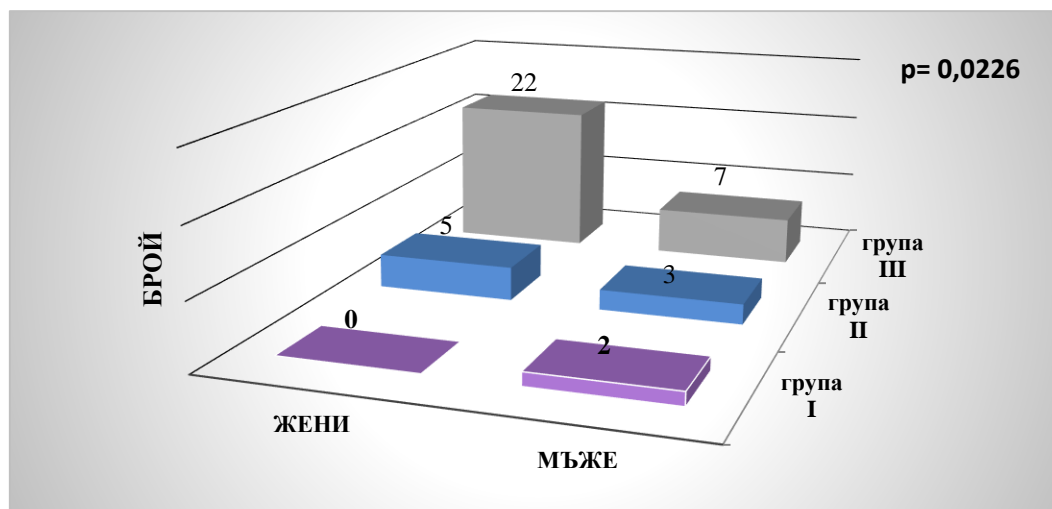
Вид структурно преустройство	ЖЕНИ			МЪЖЕ			ОБЩО
	I група	II група	III група	I група	II група	III група	
ТРАНСЛОКАЦИИ	3	7	25	4	3	9	51
Реципрочни	0	5	22	2	3	7	39
Робертсонови	3	2	3	2	0	2	12
ИНВЕРСИИ	1	0	1	2	2	4	10
парацентрични	1	0	1	1	0	1	4
перицентрични	0	0	0	1	2	3	6
ИЗОХРОМОЗОМА	0	0	1	0	0	0	1
	4	7	27	6	5	13	62
ОБЩО	38 (4,4% от всички 870 изследвани жени)			24 (2,8% от всички 863 изследвани мъже)			

По отношение на всички структурни преустройства намерени в настоящото изследване, чрез анализа на статистически хипотези, беше намерена статистическа значима зависимост по пол и групи, като честотата на женският пол като носител на структурни преустройства е сигнификантно по-висока ($\chi^2=64,64$ $p < 0,0001$).

Най-голям е дялът на балансираните преустройства в група III (фамилно хромозомно преустройство или комбинирана репродуктивна история) - (2,3%; 40/1733). В групата с инфертилитет (група I) ние намерихме 0,6% (10/1733) балансирани преустройства, резултат сходен с подобни проучвания (95). В групата с повтарящи се СПА (група II) обаче, дялът на тези преустройства, носещи практически най-висок риск от аборт (54), е много по-нисък (0,7%; 12/1733) в сравнение със средния процент описан в литературата – 5-7% за двойка с два и/или повече СПА (95).

Водещо място сред структурните хромозомни нарушения са *реципрочните транслокации отново* в група III репродуктивно нарушение (фиг.21). По отношение на пола от пациентите с реципрочни транслокации, в група III превес имат жените спрямо мъжете, доказано чрез точния тест на Фишър ($p=0,0214$), докато по отношение на група II не се намери статистически значима връзка между пола и броя на реципрочните

транслокации ($p=0,7258$). Не открихме реципрочна транслокация при жени с инфертилитет. Сравнителният анализ за всички групи показва статистическа значимост в полза на жените като носители на реципрочни транслокации ($p=0,0226$, Фишър тест).



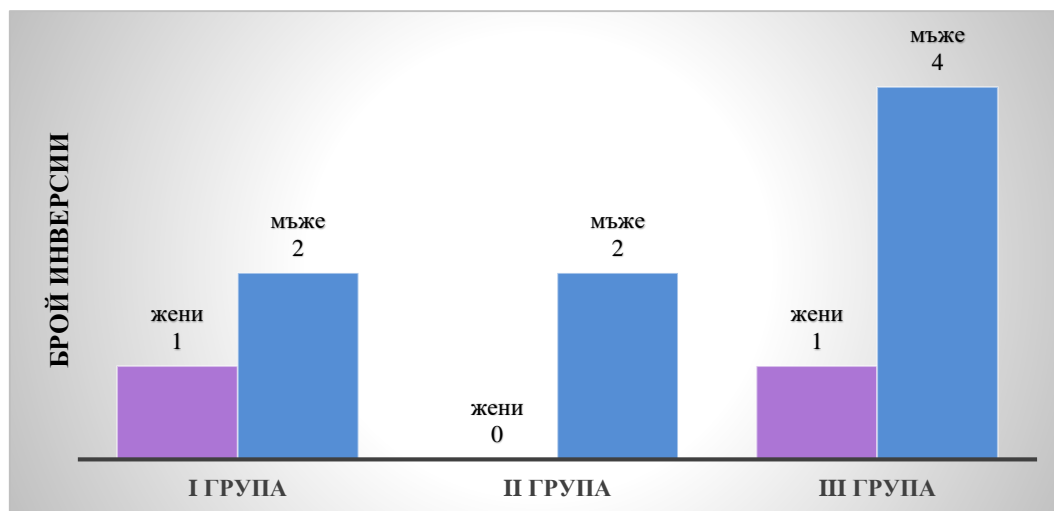
Фигура 21. Разпределение на пациенти с установени реципрочни транслокации по група репродуктивно нарушение

Този резултат корелира с литературните данни, където относителният дял на балансираните транслокации при двойки с РН е по-висок при жените. Обяснението се търси в по-добрата фертилност при жени, с възможен нормален или абнормен хромозомен набор и изход за потомството, докато при мъжете те се асоциират по-често с инфертилитет от увреждане в сперматогенезата и малката възможност за развитие на жизнеспособен плод (10,139). Известно е, че средният риск за живородено дете с небалансиран хромозомен набор е около 12% при жена - носител на балансирана транслокация и 5% ако тя е налична при мъжа (10,57).

По отношение на Робертсонова транслокация (таблица 16) не установихме зависимост по група репродуктивно нарушение ($\chi^2=1,200$; $p=0,5448$) или пол ($p=0,3861$ според точния тест на Фишър). Множество научни съобщения посочват, че хромозомното нарушение може да повлияе сперматогенезата в т.ч. олигоспермия и невъзможност за бременност (инфертилитет) (19,117,140,164). При жени носители на Робертсонови транслокации *Keymolen K, et al.*, докладват резултати с небалансиран хромозомен набор в 10,3% от изследани хорионни вѐси и 5,9% - от амниоцентези, докато при мъже носители, тези цифри са съответно 3,6% и 0%. В същото проучване, в 52,7% от тези жените се е стигнало до раждане на здраво дете (96). Според данните от нашето проучване, половината от мъжете (50% или 2/4), както и 37,5% от жените (3/8) с Робертсонова транслокация бяха от група I с инфертилитет, както с, така и без

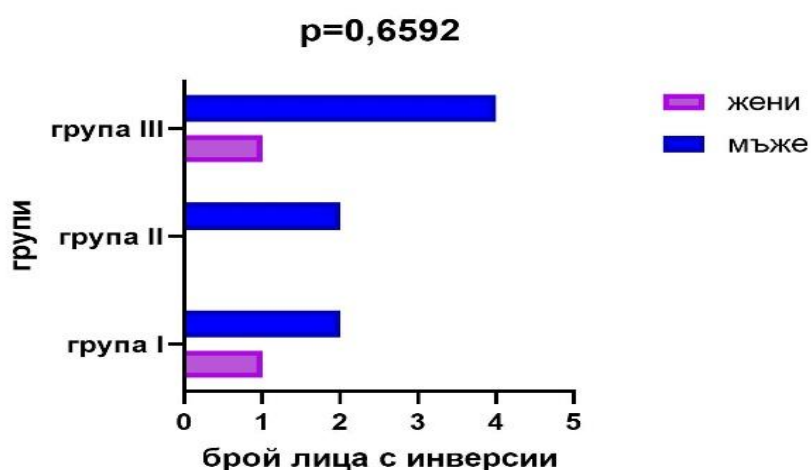
неуспешни опити за асистирана репродукция. При мъже-носители, със запазена фертилност, съществува, макар и изключително нисък риск (<1%) за живородено дете с хромозомна болест. Случай №1 от таблица 12 показва мъж диагностициран по повод родено дете с хромозомна болест - 46,XY,der(14;21),+21.

Друг вид балансирано хромозомно преустройство (инверсия) преобладаваха отново пациенти с комбинирани РН - група III (фиг.22)



Фигура 22. Разпределение на намерените инверсии по групи

Въпреки 4 пъти по-големия брой мъже (8 мъже) спрямо жени (2 жени) носители на инверсии намерени в нашата извадка, както и факта, че повече от половината инверсии са от група III (5/8), при анализа на хипотези не се установи статистически свързана зависимост по пол и групи ($\chi^2 = 0,8333$, $p = 0,6592$) (фиг.23).



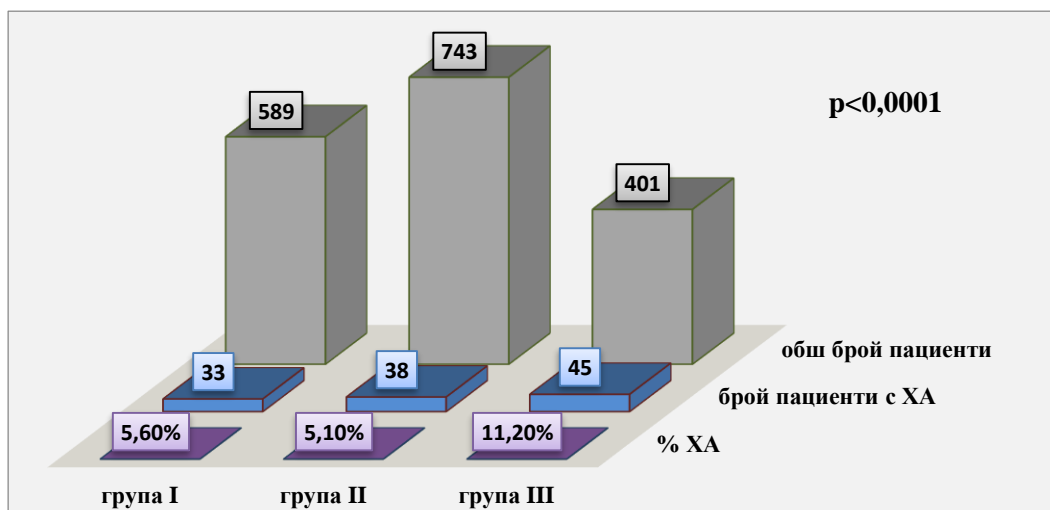
Фигура 23. Статистическа зависимост на инверсиите по пол и групи

На базата на описаните по-горе резултати, може да се заключи, че при лица с репродуктивни проблеми, **структурните** хромозомни нарушения:

- в болшинство си (57,1% т.е. 40/70) ангажират лица от *женски* пол;
- голямото си болшинство (88,6%) т.е. 62/70 са представени в *пълна* форма; процентът при жените (61,3% или 38/62 лица) е статистически значимо по-висок ($p < 0,0001$);
- Балансираните *транслокации* са най-често откриваната структурна хромозомна аберация (72,9% т.е. 51/70 от всички структурни преустройства), като реципрочните транслокации са около три пъти повече от Робертсоновите и при двата вида статистически значимо доминира женски пол ($p = 0,009$); Най-често срещаната Робертсонова транслокация е между хромозоми 13 и 14 (50% или 6/12);
- *Инверсиите* са статистически значимо по-често срещани при РН отколкото в нормалната популация ($p < 0,001$), няма значма разлика по пол $p = 0,06$;
- Според групата репродуктивно нарушение преобладават пациентите от *група III* (64,5% или 40/62), статистически значимо по-висок ($p < 0,0001$).

IV.2.4. Разпределение на всички хромозомни нарушения (бройни, структурни, комбинирани) по вид репродуктивно нарушение (група)

Обобщено, най-висок процент хромозомни нарушения беше намерен сред пациентите от **група III -11,2%** (45/401). Съгласно анализа на статистически хипотези, процентът на аберации установен в групата с комбинирана репродуктивна история в нашето изследване, е статистически значимо по-висок от този в другите две групи ($\chi^2 = 22,06$, $p < 0,0001$). Пациентите от група I и група II показват сходен процент хромозомни аберации, съответно за група I - 5,6% (33/589) и за група II – 4,3% (32/743) (фиг.24).



Фигура 24. Разпределение на пациентите с хромозомни нарушения по групи

Данните в литературата за честотата на хромозомните нарушения в пациентите с РН са разнопосочни. Според *Coulam CB, et al.*, група III, също се представя с най-висок процент на хромозомни аномалии, макар и три пъти по-висок от установения при нас (37% към 11,2%) (46), докато *Gadow EC, et al.*, докладват почти идентичен с нашия резултат (10%) (64).

По отношение на група II (повтарящи се спонтанни аборти), делът е съпоставимо по-нисък (6%) (46) или съпоставимо по-висок (2,8%) (64) спрямо пациентите от тази група в нашето проучване (4,3%, 32/743).

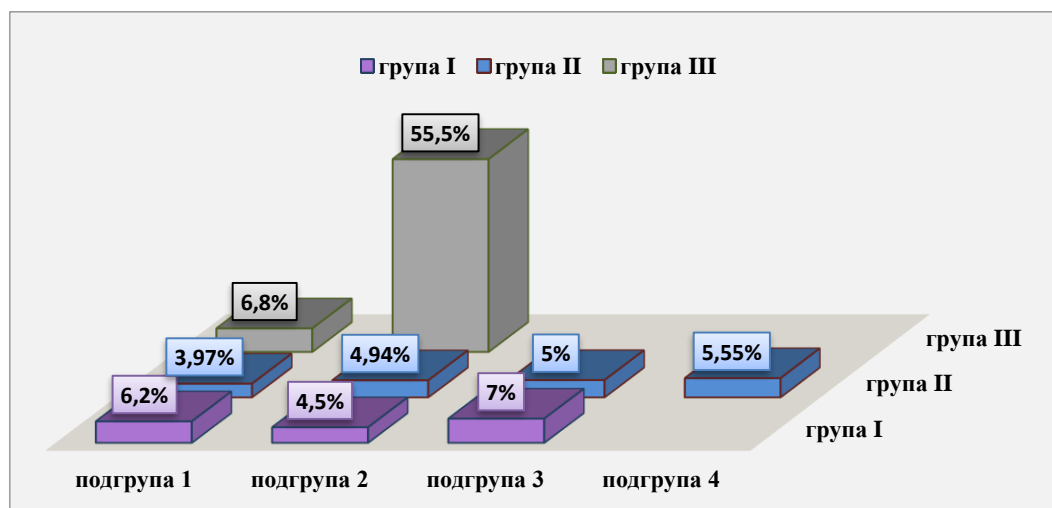
При сравнителен анализ на честотата на хромозомните аберации, намерени при двойки от група с повтарящи се спонтанни аборти и такива с инфертилитет (с или без АРТ) *Stern C, et al. u Mozdarani H, et al.*, докладват два пъти повече хромозомни нарушения при двойките с повтарящи се аборти спрямо тези с инфертилитет, съответно **4,7% към 2,5%** (176) и **13,9% към 7,04%** (130). Съгласно тези автори, носителството на балансирано преустройство създава вероятност за образуване на небалансирани гамети с неуспешно развитие на ембриона още в преимплантационната фаза, и повтарящи се ин витро неуспехи (130,176). В нашето проучване съотношението на разпределение на ХА между група II и група I е в полза на семействата с инфертилитет (5,6%) над тези с повтарящи се СПА (4,3%). Подобни на нашите резултати докладват *Düzcan F, et al.* - по-висок процент за групата с инфертилитет (4,8%) в сравнение с групата с повтарящи се спонтанни аборти (3,1%) (55).

По отношение разпределението на хромозомните аберации по подгрупи данните са:

Група I: подгрупа 1 (без АРТ процедури) – 19 лица (6,2%); подгрупа 2 (с неуспешни АРТ процедури) – 10 лица (4,5%); подгрупа 3 (мъжки фактор) - 4 лица (7,0%).

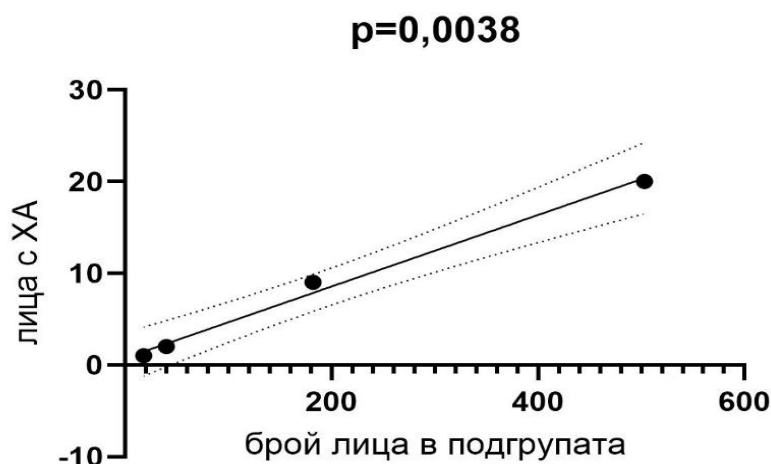
Група II: подгрупа 1 (с 2 СПА) – 20 лица (3,97%; 20/503); подгрупа 2 (с 3 СПА) - 9 лица (4,94%; 9/182); подгрупа 3 (с 4 СПА) – 2 лица (5%; 2/40); подгрупа 4 (с 5 и > СПА) – 1 лице (5,55%; 1/18).

Група III: подгрупа 1 (КРИ) - 25 лица (6,8%); подгрупа 2 (фамилно хромозомно преустройство) – 20 лица (55,5%) (фиг.25).



Фигура 25. Разпределение на ХА по подгрупи

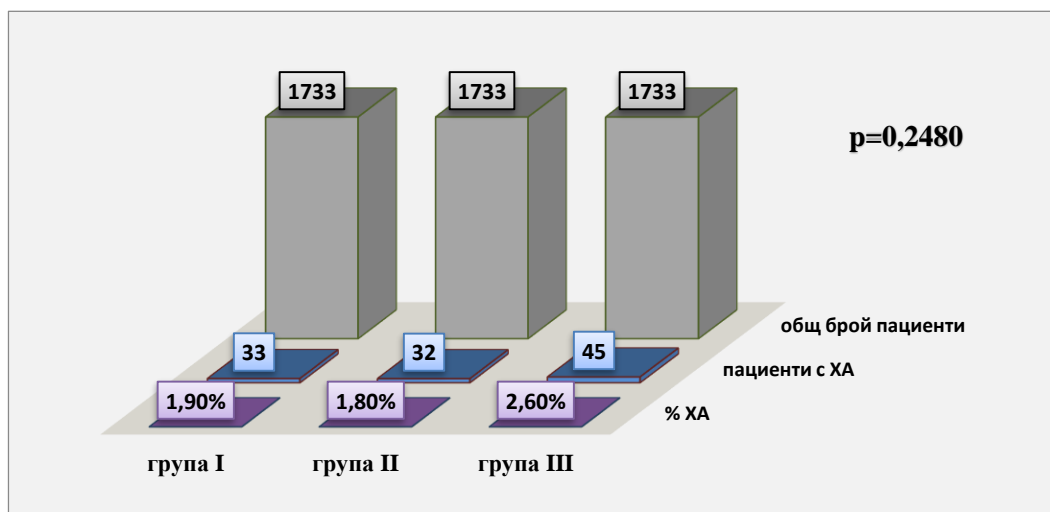
Внимание привличат подгрупите от група II. Съгласно литературните данни, честотата на хромозомните нарушения нараства с броя СПА (13,63,70,147,167). *Sider D, et al., Gaboon NEA, et al.,* и *Ghazaey S, et al.,* съобщават за следните резултати по подгрупи при 2 СПА, 3 СПА, 4 СПА и ≥ 5 СПА: 6%, 10,2%, 7,4%, 11,1% (167); 4,4%, 6%, 8,3%, 13% (63); 11%, 15%, 15%, 21,2% (70). *Pokale YS, et al.* (147), също намират висок процент хромозомни аберации при двойки с ≥ 4 СПА (9,1%) в сравнение с тези с 3 СПА (4,7%), а *Yu MY, et al.* (201), отчитат сигнификантно по-голям процент хромозомни преустройства в двойки с ≥ 4 СПА (4,9%, $p < 0,01$). На базата на своите проучвания, тези автори достигат до извода, че **при двойки със спонтанни аборти, процента на намерените хромозомни аберации нараства с броя на абортите** ($p = 0,005$) (13,63,70,147,167,201). В нашето изследване се наблюдава подобна закономерност - с 2 СПА в 3,97%; с 3 СПА в 4,94%, с 4 СПА в 5%; и с ≥ 5 СПА в 5,55%. Това беше потвърдено чрез проведения регресионен анализ (линейна регресия) и установената статистическа значимост ($p = 0,0038$; $p < 0,05$), водещи до извода, че с нарастване на броя на СПА нараства и вероятността за наличието на ХА (фиг.26).



Фигура 26. Статистически анализ за брой СПА/брой ХА- линейна регресия

Тази закономерност се наблюдава и в други, по-малки по обем проучвания върху пациенти с повтарящи се СПА, където честотата на цитогенетичните аберации варира между 1% и 4.8%, като техният процент нараства с броя ранни (повече от три) и/или късни спонтанни аборти и загуба на плода с множествени вродени малформации (84,109,142,158,169,184,187,196).

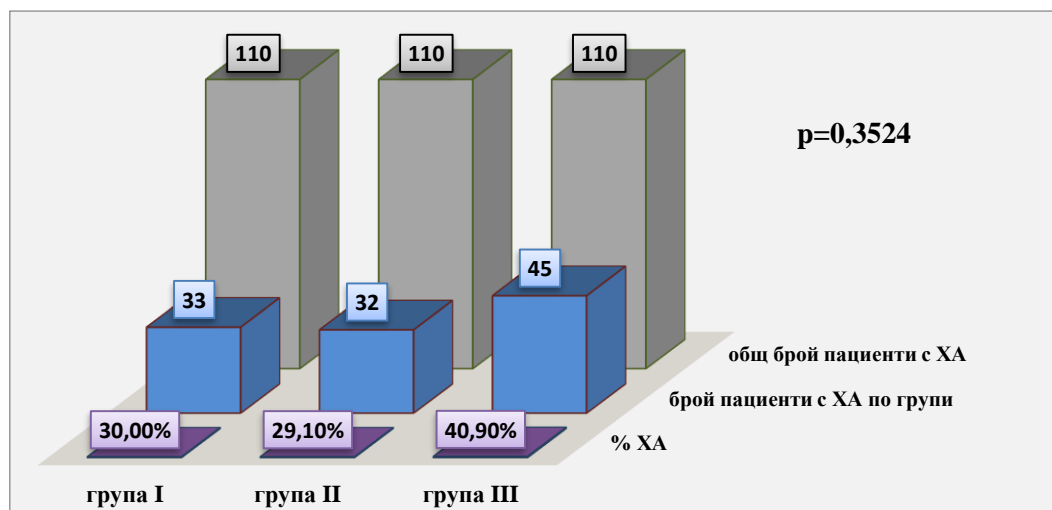
Разпределението на хромозомните нарушения спрямо общия брой изследвани пациенти (n=1733), по групи, **не показва статистически свързана зависимост** между установената патология и група репродуктивно нарушение ($\chi^2=2,789$; p=0,2480) (фиг.27).



Фигура 27. Сравнение на пациентите с ХА по групи спрямо цялостната изследвана група

Разпределението на хромозомните нарушения спрямо броя на пациентите с намерена патология (n=110), по групи отново, **не показва статистически свързана**

зависимост между установената патология и група на репродуктивно нарушение ($\chi^2=2,086$, $p=0,3524$) (фиг.28)

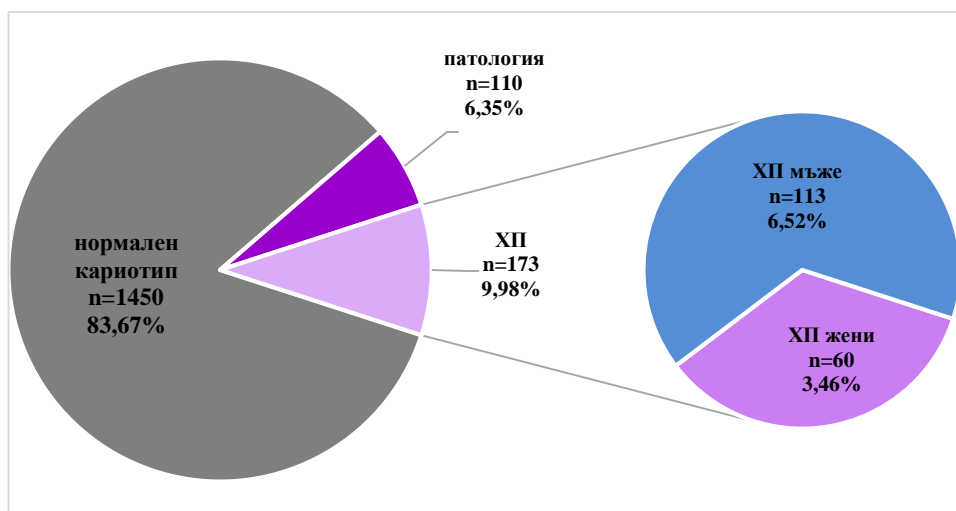


Фигура 28. Сравнение на пациентите с ХА по групи спрямо общия брой пациенти с ХА.

Репродуктивната история и снимков материал на някои двойки и фамилии с намерени хромозомни нарушения при класически цитогенетичен анализ са налични в приложение 2.

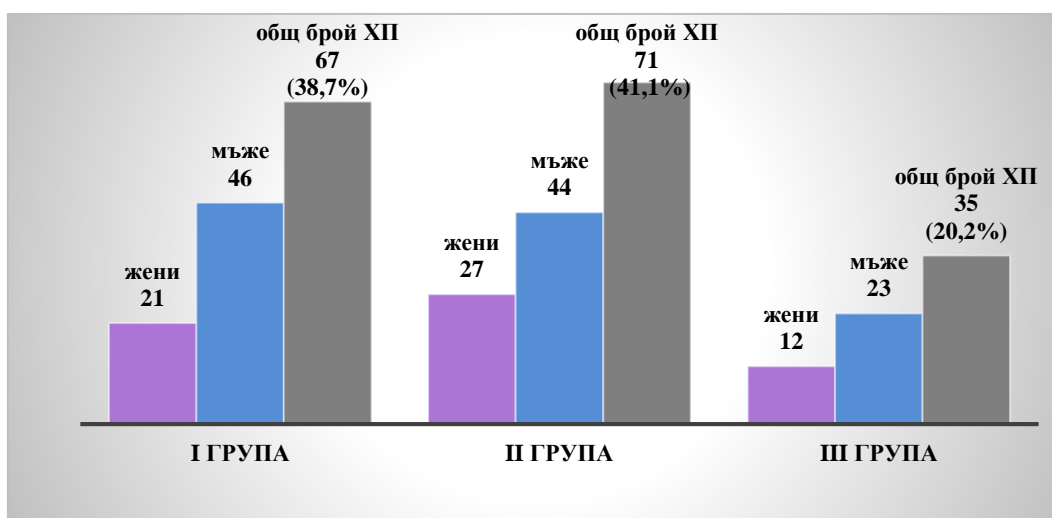
IV.2.5. Хромозомен полиморфизъм

От изследваните 1733 пациента с РН, в 173 е намерен хромозомен полиморфизъм (ХП) (9,98%) (фиг.29). Тази стойност е близка до цитираната по литературни данни (10-15%) (15,199). Касае се и за два пъти по-висока честота спрямо нормалната популация, където полиморфни варианти се срещат в 2-5% (15,199). Ние установяваме, че намереният от нас процент на полиморфизъм е **статистически значимо по-висок от установения в нормалната популация ($t=9$; $p<0,001$)** при прилагане на t-test за сравняване на относителен дял от извадка и нормалната популация (генерална съвкупност). **Мъжете показват почти два пъти повече полиморфизми (113/173 т.е. 6,52%)** отколкото жените (60/173 т.е. 3,46%) (отношението мъже/жени е 1,9), установено чрез Фишър тест ($p=0,0001$). Тази тенденция е еднопосочна с данните от литературата за пациенти с първичен инфертилитет и неуспешни ин витро процедури където ги установяват, че при мъжете ХП е два пъти повече (12%), в сравнение с жените (6%) (190). Те смятат, че това се дължи на наличието на различни варианти в Y хромозомата и предполагат, имащи неблагоприятен ефект върху сперматогенезата и негативно отражение на изхода от ин витро процедурите.



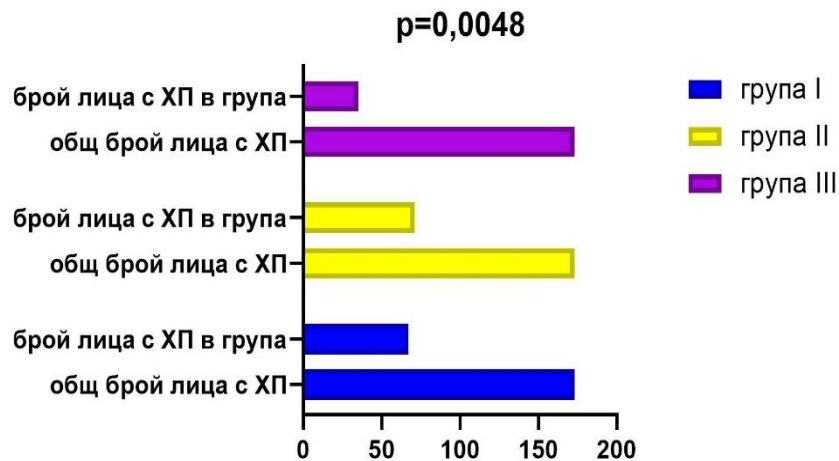
Фигура 29. Разпределение на пациентите с полиморфизъм по пол

Сред лицата с установен хромозомен полиморфизъм най-голям е дялът на тези, принадлежащи към **група II** (аборти) - (41,1% т.е. 71/173); близко следвани от група I (инфертилитет) - (38,7% т.е. 67/173) и най-малко в група III с комбинирана репродуктивна история - (20,2% т.е. 35/173) (фиг.30).



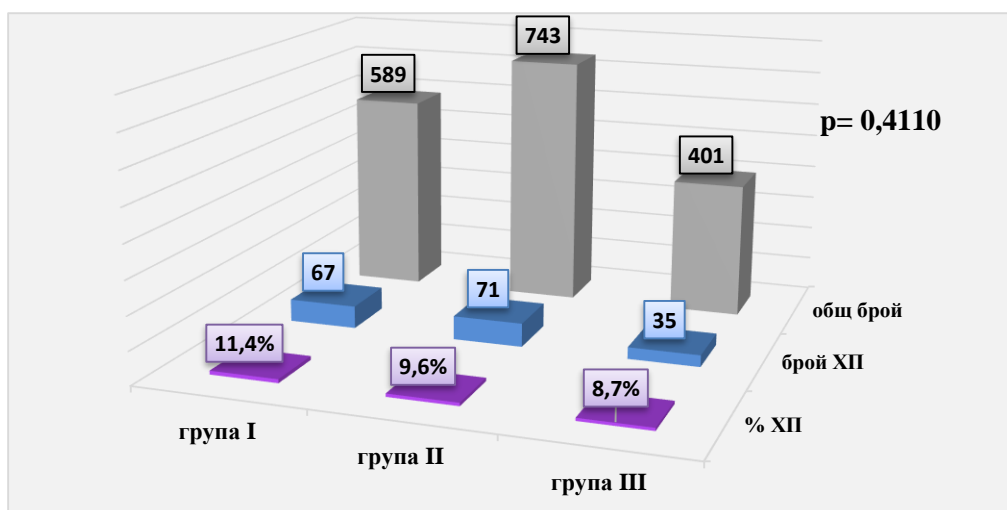
Фигура 30. Разпределение на пациентите с установени ХП по група репродуктивно нарушение и пол

По отношение на получените стойности по групи отнесени към общия брой намерени ХП в изследваната извадка, анализът на статистически хипотези **установи статистическа значима зависимост** между груповата принадлежност и намерения ХП ($\chi^2=10,68$; $p= 0,0048$) (фиг.31).



Фигура 31. Статистическа свързана зависимост между груповата принадлежност и установения ХП

Делът на лицата с хромозомен полиморфизъм, отнесен към общия брой изследвани пациенти от всяка група, е най-висок в **група I** - 11,4% т.е. 67/589 пациенти; следвани от в група II - 9,6% т.е. 71/743 пациенти; и група III - 8,7% т.е. 35/401 пациенти. Сходен резултат за **група I** - 11,7% съобщават *Turan GA, et al.* (190). По отношение на резултатите докладвани за другите две групи, обаче, отчитаме разлика – нашите стойности са трикратно по-високи за група II (9,6% спрямо 2,9%), и обратно двукратно по-ниски за лицата от група III (8,7% спрямо 17,7%). Повишеното отчитане на полиморфизми в това проучване, авторите обясняват с наличие на механизъм включващ транскрипционна активация на гени в хетерохроматиновите региони на хромозомите, който може да бъде отговорен за асоциирането на полиморфните варианти с дадено клинично състояние чрез включване на епигенетични механизми на генна регулация и контрол (190). В този случай анализът на статистически хипотези **не установи статистически значима зависимост** между груповата принадлежност и установения ХП ($\chi^2=1,778$, $p=0,4110$) (фиг.32).



Фигура 32. Разпределение на намерените полиморфизми по групи и тяхното процентно съотношение спрямо броя пациенти в групата

От група I най-висок е дялът на лицата с ХП в подгрупа 3 (мъжки фактор) - 21% т.е. 12/57 пациента; докато в подгрупа 2 (пациенти с АРТ) те са 12% т.е. 27/224, а в подгрупа 1 (без АРТ) те са 9,6% т.е. 28/308 пациенти. Анализът на хипотези показва **сигнификантно** по-висока честота на намерените хромозомни полиморфизми в подгрупа 3 спрямо останалите подгрупи ($\chi^2=10,85$, $p=0,0044$) (таблица 17). Този резултат корелира и с данните от други подобни проучвания (74,126,135,148).

Таблица 17. Разпределение на лицата с разкрити ХП в зависимост от групата и подгрупата репродуктивно нарушение

	Група I			p	Група II				p	Група III		p
	Под група 1	Под група 2	Под група 3		Под група 1	Под група 2	Под група 3	Под група 4		Под група 1	Под група 2	
брой ХП	28	27	12	0,0044	35	23	9	4	0,0044	31	4	0,5481
общ брой	308	224	57		503	182	40	18		365	36	
% ХП	9,6%	12%	21%		6,9%	12,6%	22,5%	22,3%		8,7%	11,1%	
общ % ХП	11,4%				9,6%					8,7%		

От група II, най-висок е дялът лицата с ПМ в подгрупа 3 (с 4 СПА) - 22,5% т.е. 9/40 лица и подгрупа 4 (с 5 СПА) - 22,3% т.е. 4/18. В подгрупа 2 (с 3 СПА) - процента е 12,6% т.е. 23/182 лица, а в подгрупа 1 (с 2 СПА) – 6,9% т.е. 35/503 пациента (таблица 17). На базата на анализа на хипотези може да се заключи, че в нашата извадка с **нарастване броя на СПА** нараства и вероятността за откриване на ХП ($\chi^2=13,12$; $p=0,0044$).

За група III, пациентите с комбинирана репродуктивна история показват хромозомен полиморфизъм в 8,5% т.е. 31/365 лица, а при тези с фамилна обремененост

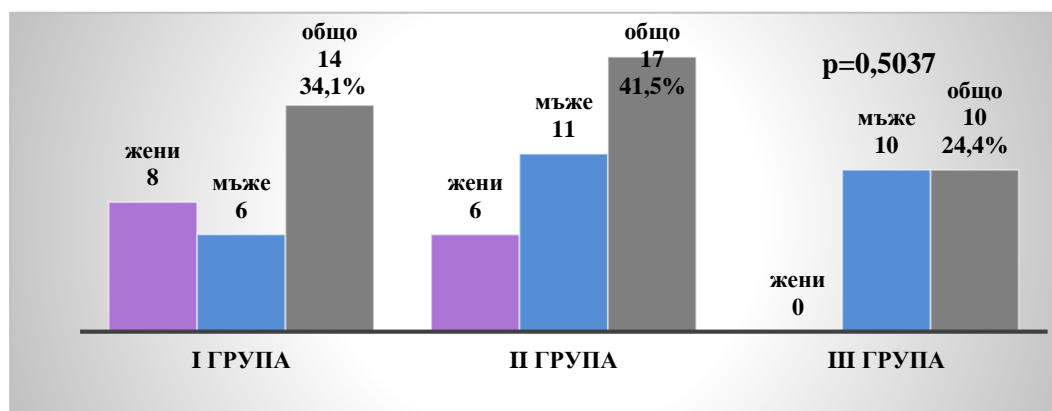
в 11,1% т.е. 4/36. Тук не се установи статистическа закономерност в отделните подгрупи ($p=0,5481$).

В проведеното от нас проучване, **полиморфизмът по хромозома 9** е застъпен в най-голям процент - 3,9% (67/1733), което е около два пъти повече от общата честота на полиморфизмите в хромозома 9 в общата популация - 1,5% (103). С прилагането на t критерият на Стюдънт се установи, че този процент е статистически значимо по-висок от установения в нормалната популация ($t=5,2$; $p<0,001$).

Хромозомен полиморфизъм по хромозома 9

От полиморфните варианти на хромозома 9 в изследваната от нас извадка, най-често срещаният ХП, е **инверсия на хетерохроматиновия блок в хромозома 9 - $inv(9)(qh)$** . Това са общо 41 пациента - 23,7% (41/173), в това число 14 жени и 27 мъже. Делът на пациентите с $inv(9)(qh)$ отнесен към всички изследвани пациенти с РН, е 2,4% (41/1733), което е малко по-високо от процентът съобщен от други проучвания - 1,5% (175), но като цяло не се различава от този установен в общата популация (1-3%) (129).

Най-много пациенти с $inv(9)(qh)$ са установени в група II - 41,5% т.е. 17/41; следвани от група I - 34,1% т.е. 14/41 и група III - 24,4% т.е. 10/41 (фиг.33). Намереният от нас по-висок процент при пациенти с повтарящи се СПА, корелират с все по-често съобщавани данни от други проучвания. Тази инверсия се асоциира основно с по-големия брой аборти, т.к. може да доведе до формирането на генетично небалансирани гамети в процеса на фертилизация (с летални делеции или големи дупликации), което води до спонтанни аборти (53). При анализа на статистически хипотези обаче, **не се установи статистически значима зависимост** между броя на пациентите с установена $inv(9)(qh)$ и принадлежността им към дадена група ($\chi^2= 1,372$; $p= 0,5037$) (фиг.33).



Фигура 33. Разпределение на пациентите с $inv(9)(qh)$ по пол и групи

Показанието за изследване, което категоризира групата на репродуктивно нарушение и кариотипа за пациенти от женски пол са представени в таблица 18. Интересен вариант е намерен в случай 6, жена с дългогодишен инфертилитет, при която се наблюдава завъртане само на центромерната част от дългото рамо на хромозома 9 (q11) и част от късото и рамо в точка p13.1. Това е по-рядко срещан вариант, който трудно се улавя с класическия цитогенетичен анализ. В своето проучване *Kosyakova N, et al.* описват тази и още много различни варианти на хромозома 9 установени чрез FISH анализ (102).

Таблица 18. Жени с inv(9)(qh)

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
1	Първичен инфертилитет	I	46,XX,inv(9)(qh)
2	3 СПА	II	45,X,inv(9)(qh)[1]/47,XXX,inv(9)(qh)[1]/46,XX,inv(9)(qh)[28]
3	Инфертилитет -2 неуспешни АРТ	I	46,XX,inv(9)(qh)
4	Вторичен инфертилитет	I	46,XX,inv(9)(qh)
5	2 СПА	II	46,XX,inv(9)(qh)
6	Инфертилитет	I	46,XX, inv(9)(p13.1;q11)
7	2 СПА	II	46,XX,inv(9)(qh)
8	2 СПА	II	46,XX,inv(9)(qh)
9	Първичен инфертилитет	I	46,XX,inv(9)(qh)
10	3 СПА	II	46,XX,inv(9)(qh)
11	2 СПА	II	46,XX,inv(9)(qh)
12	Инфертилитет - множество неуспешни АРТ	I	46,XX,inv(9)(qh)
13	Инфертилитет	I	46,XX,inv(9)(qh)
14	Първичен инфертилитет	I	46,XX,inv(9)(qh)

Инверсия на хетерохроматиновия блок в хромозома 9 беше статистически **значимо** два пъти по-често откривана при мъже (n=27) спрямо жени (n=14) (p=0,0404, тест на Фишър). Показанието за изследване, което категоризира групата на репродуктивно нарушение и кариотипа за пациенти от мъжки пол са представени в таблица 19. Интерес представляват двама мъже, при които инверсията бе налична едновременно и в двете им хромозоми 9 - 46,XY,inv(9)(p11;q13); inv(9)(p11;q13) (случаи №7 и №22). И двамата пациенти са от група II, съответно с 2 СПА и 4 СПА. По-рядко срещани са случаи 3 и 25. Тук е засегнат p12 бенда, за който се предполагат наличие на няколко горещи точки за рекомбинация. Освен това конституционните инверсии, засягащи перицентромерната област на хромозома 9 имат прекъсващи точки локализиращи в този регион. Именно констатацията на тези точки на прекъсване в региони с повтаряща се последователност, какъвто е 9p12, е важна и може да обясни

защо подобни инверсии нямат клинични последици, извън инфертилитета и повтарящите се СПА (175).

Таблица 19. Мъже с inv(9)(qh)

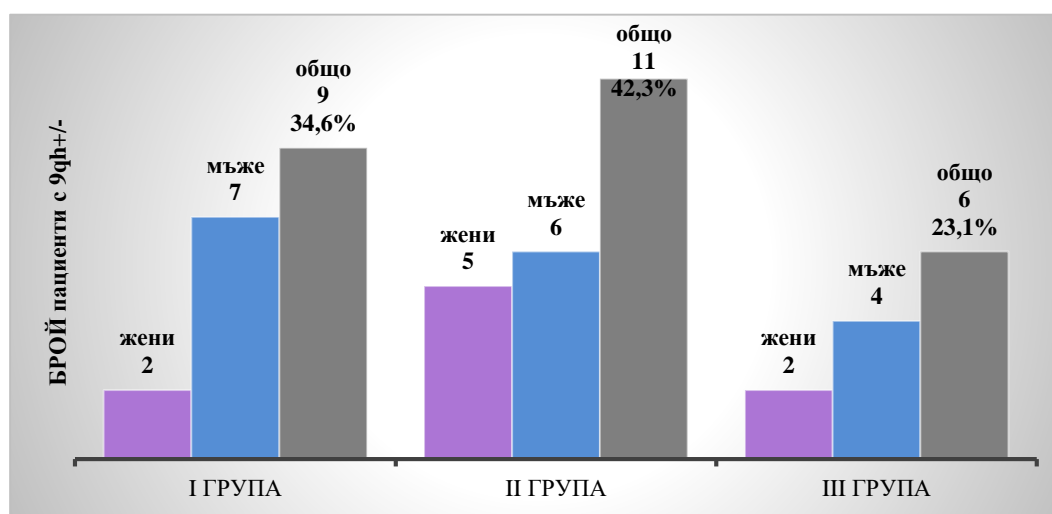
№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
1	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
2	Фамилно хромозомно преустройство	III	46, XY, inv(9)(qh)
3	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(p12;q12)
4	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
5	4 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
6	Плод със структурна аномалия	III	46, XY, inv(9)(qh)
7	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(p11;q13); inv(9)(p11;q13)
8	3 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
9	Родено дете с траслокационна форма на S. Down -	III	46, XY, inv(9)(qh)
10	Родено дете с допълнителен материал в хромозома 15 - 46, XX, add(15)(p11)	III	46, XY, inv(9)(qh)
11	Инфертилитет - нарушена спермограма	I	46, XY, inv(9)(qh)
12	Родено дете с изоставане в растежа и кариотип 46, XY, inv(9)(qh)	III	46, XY, inv(9)(qh)
13	Родено дете с малформативен синдром и кариотип 46, XY, inv(9)(qh)	III	46, XY, inv(9)(qh)
14	Родено дете с МВА и УМИ - 46, XY, inv(9)(qh), der(15)	III	46, XY, inv(9)(qh)
15	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
16	Първичен инфертилитет	I	46, XY, inv(9)(qh)
17	Инфертилитет	I	46, XY, inv(9)(qh)
18	Родено дете с ВА (хейлосхизис) - mos45, X[21]/46, X, der(X;7)(p10;q10)+7[29]	III	46, XY, inv(9)(qh)
19	4 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
20	Първичен инфертилитет	I	46, XY, inv(9)(qh)
21	3 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
22	4 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh), inv(9)(qh)
23	Вторичен инфертилитет	I	46, XY, inv(9)(qh)
24	Инфертилитет	I	46, XY, inv(9)(qh)
25	Родено дете с имунодефицитно заболяване - 46, XY, inv(9)(p12q11), хромозомна чупливост-1,23%	III	46, XY, inv(9)(p12q11)
26	5 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
27	Родено дете с дисморфичен синдром и ХБ -46, XY, inv(9)(qh), der(4)	III	46, XY, inv(9)(qh)

Хромозомен хетероморфизъм - разлика в големината на хетерохроматиновия блок в хромозома 9 (9qh+/-) беше намерена в 26 пациента с РН, 15% (26/173), в това число 9 жени и 17 мъже. За 9qh+ вариант приемаме големина на хетерохроматиновия блок поне два пъти по-голям от аналогичния му в другата хромозома 9, а за 9qh- вариант - с липсващ или редуциран блок. Преобладаваха пациентите с 9qh+ вариант, в 25 лица, 9qh- вариант установихме само в 1 пациент. Повод за изследване в семейството с 9qh- варианта са били 3 СПА. Делът и на двата варианта,

установени сред всички пациенти с РН в нашето проучване е 1,44% (25/1733) за 9qh+ варианта и 0,05% (1/1733) за 9qh- варианта. Той е съпоставимо по-нисък от този цитиран в литературата в сродни проучвания – 3,67% за 9qh+ варианта по данни на *Gonçalves RO, et al.* (72), или съответно около 8% и < 1% по данни на *Starke H, et al.* (175). Причината за установения от нас по-нисък процент по този ХП вероятно се дължи на факта, че в началото на обследвания период 9qh- (минус) вариантите не бяха отчитани и отразявани.

Делът на пациентите с 9qh+/- отнесени към общия брой пациенти с ХП, показва разпределение по групи както следва: група I - 5,2% (9/173); група II - 6,4% (11/173); група III - 3,5% (6/173). При подобно проучване, *Minocherhomji S, et al.* (123), намират по-високи проценти за 9qh+ вариант както за групата с инфертилитет (12,7%, 42/330), така и за групата с комбинирана репродуктивна история (11,5%, 38/330), спрямо този от нашето изследване, съответно 5,2% и 3,5%. По отношение групата с повтарящи се СПА от същото проучване, процент е по-нисък (2,1%, 7/330) спрямо нашия (6,4%) (123). Вероятна причина за значимото различие по отношение на групите е по-големия брой намерени полиморфизми (общо 330) като цяло в проучването на *Minocherhomji S, et al.*, и съответно по-големия брой намерени полиморфизми в групите с инфертилитет и комбинирана репродуктивна история. По-ниският процент за групата със СПА вероятно е резултат от малобройната извадка изследвани лица с повтарящи се СПА (53 пациенти) и съответно по-малко намерения брой полиморфизми в тази група (7/333, 2,1%) (123).

Най - много пациенти с хромозомен полиморфизъм по големина на хетерохромативния блок в хромозома 9 беше установен отново в група II (42,3% т.е. 11/26); следвани от група I – (34,6% т.е. 9/26), и група III – (23,1% т.е. 6/26) (фиг.34).



Фигура 34. Разпределение на пациентите с 9qh+/- по пол и групи

Като цяло, редица автори съобщават за значително по-високо присъствие на 9qh+ варианта при пациенти с репродуктивни проблеми в сравнение с тези от общата популация. Според тях големият хетерохроматинов блок може да причини хромозомно нарушение и мейотично задържане, което от друга страна да доведе до аборт (123,147).

- Честотата на хромозомния полиморфизъм по хромозома 9 (inv(9)(qh) и 9qh+) е статистически значимо по-висок от този в нормалната популация (t=5,2; p<0,001);
- В нашето проучване за хромозомен полиморфизъм по хромозома 9 лицата от мъжки пол показват статистически значимо (p=0088, тест на Фишър) преобладаване над тези от женски пол (съответно 65,7% т.е. 44/67 лица спрямо 34,3% т.е. 23/67 лица);
- Най-голям е дялът на лицата с полиморфизъм по хромозома 9 в група II (със СПА) - 41,8%, а най-нисък – в група III (24,4%).

Хромозомен полиморфизъм по Y хромозома

Y хромозомен полиморфизъм беше установен в 31 пациенти - 3,6% т.е. 31/863 изследвани мъже с РН или в 27,4% т.е. 31/113 мъже с хромозомен полиморфизъм. В нашето изследване той е представен единствено с вариации в дължината на Y хромозомата. От тях Yqh+ варианта (4-5 бал на хетерохроматиновия блок или с размер по-голям от хромозома 18) заема 90,3% от всички намерени полиморфизми по Y хромозомата (28/31), а Yqh- варианта (с размер по-малък от размера на хромозомите от група G) – едва 9,7% (3/31). Не беше намерена инверсия в Y хромозомата.

Намереният в нашата извадка XII по Y хромозомата по групи и подгрупи е предствен в таблица 20.

Таблица 20. Хромозомен полиморфизъм по хромозома Y при мъже с РН

№	ПОКАЗАНИЕ	ГРУПА	ПОД ГРУПА	КАРИОТИП
1	Инфертилитет -1 неуспешно АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
2	Инфертилитет - азооспермия	I	3	46,XY,Yqh+
3	Инфертилитет - 2 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
4	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
5	3 СПА	II	2	46,XY,Yqh+
6	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
7	Прекъсната бременност с ХБ на плода (синдром на Търнър)	III	1	46,XY,Yqh+
8	Родено дете с УМИ с неясна причина	III	1	46,XY,Yqh+
9	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
10	3 СПА	II	2	46,XY,Yqh+
11	Фамилно хромозомно преустройство	III	2	46,XY,Yqh+

№	ПОКАЗАНИЕ	ГРУПА	ПОД ГРУПА	КАРИОТИП
12	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
13	Родено дете с ВА	III	1	46,XY,Yqh+
14	РН - мъртъв плод и 2 неуспешни АРТ	III	1	46,XY,Yqh+
15	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
16	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
17	5 СПА	II	4	46,XY,Yqh+
18	Инфертилитет --1 неуспешно АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
19	Инфертилитет --3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
20	Инфертилитет	I	1	46,XY,Yqh+
21	Хабитуални аборти	II	4	46,XY,Yqh+
22	4 СПА	II	3	46,XY,Yqh+
23	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
24	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
25	Инфертилитет	I	1	46,XY,Yqh-
26	Инфертилитет - 2 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
27	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
28	Инфертилитет - азооспермия	I	3	46,XY,Yqh-
29	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh-
30	Инфертилитет - азооспермия	I	3	46,XY,Yqh+
31	3 СПА	II	2	46,XY,Yqh+

От таблица 20 е видно, че Yqh- варианта беше намерен единствено при мъже с инфертилитет (група I) (случаи №25; №28 и №29).

Най-голям е броят на мъжете с полиморфизъм по Y хромозома от група I (51,6% т.е. 16/31 мъже); следван от група II (32,3% т.е. 10/31 мъже); в група III - само при 5 мъже е намерен Yqh+ вариант (16,1% т.е. 5/31 мъже). Анализът на хипотези **установи** статистически значима зависимост между групата репродуктивно нарушение и броя на мъжете с полиморфизъм по Y хромозомата ($\chi^2 = 5,798$; $p=0,05$).

Y хромозомата показва широки граници на вариации не само между отделни индивиди, но и между различни популационни групи. Именно полиморфните варианти в Y хромозомата са причина за по-високата честота на полиморфизъм при инфертилните мъже в сравнение с тези при инфертилните жени. Данните за клиничната значимост на полиморфизмите в Y хромозомата относно фертилността са все още противоречиви. Предполага се, че те могат да имат вредни ефекти и че играят важна роля за мъжкото безплодие, чрез въздействието им върху разнообразни физиологични процеси, включително сперматогенезата и качеството на спермата (199).

Съгласно литературните данни, полиморфизмът по Y хромозомата е разпространен основно сред инфертилните мъже - 27,4% (199); 29,2% (123); 30,7% (132); 65,1% (73) от общия брой изследвани мъже, като по-висока е честота на полиморфизми при установен мъжки фактор - тежка олигоспермия, азооспермия (73,132,144). Това корелира с резултатите от нашето изследване, където най-голям е броят на мъжете с

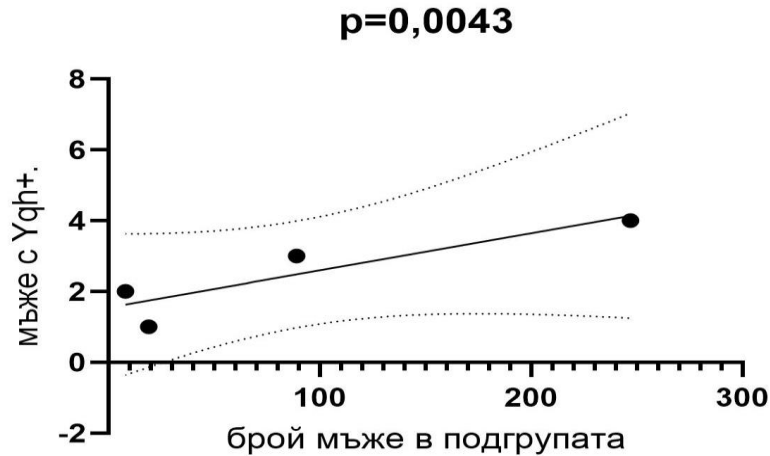
установен Y хромозомен полиморфизъм в групата с инфертилитет (група I) – 51,6% (16/31). За разлика от тези проучвания, обаче, които съобщават най-голям процент на Y-хромозомен полиморфизъм в групата с мъжки фактор, като *Minocherhomji S, et al. (123)*, – 30,7% (44/143), в нашето бяха намерени само 3 мъже от тази подгрупа (подгрупа 3, група I) – 18,7% (3/16).

Най-често срещаната форма на полиморфизъм касае дължината на хетерохроматиновия регион на Y хромозомата, като в повечето доклади е намерен по-висок процент на Yqh+ варианта: 91,9% (123); 86% (73); 90% (199); 100% (144). Подобно, и в нашето проучване, най-често срещаният вариант на Y хромозомата е Yqh+ варианта (90,3%; 28/31) от всички намерени варианти. Счита се, че големият хетерохроматинов блок в Yqh+ варианта играе значителна роля в процеса на репродукция, т.к. се асоциира със заглушаване на генната експресия, особено на гените свързани със сперматогенезата и фертилитета, а от там и влиянието му върху неблагоприятният изход от ART процедурите (73,123,144). От друга страна, редуващите се хетерохроматинови и еухроматинови секвенции в специфичния за мъжа регион, посредством индуцирането на епигенетични промени, вероятно е причина за асоциирането на хетерохроматиновите варианти на Y хромозома с инфертилитета (134).

Повишено присъствие на Y хромозомен полиморфизъм се докладва и в двойки с повтарящи се СПА (15,113,132). *An C, et al.*, съобщават честота на Y хромозомен полиморфизъм в 60,7% от мъжете сред такива двойки, като от тях, вариациите в дължината на Y хромозомата заемат 91,5% (15). В нашата извадка 1/3 от мъжете с установен полиморфизъм по Y хромозомата са от група II (с повтарящи се СПА) - 32,3% (10/31), всички с Yqh+ вариант. Два пъти по-ниския процент (32,3%) на Y хромозомен полиморфизъм отчетен в групата с повтарящи се СПА в нашето проучване спрямо това на *An C, et al. (60,7%)*, се дължи на много по-големия брой изследвани от тях мъже от двойки с повтарящи се СПА (1543 мъже) спрямо тези от настоящата извадка (363 мъже). Близък до нашият процент (32,3%) съобщават *Madon PF, et al. (113)* - 35,1%, като Yqh+ варианта е представен в 80%. Някои автори докладващи резултати от хромозомни проучвания при инфертилни мъже с олигозооспермия и не-обструктивна азооспермия *Nagvenkar P, et al.*, (132), *Penna SV, et al.*, (144), смятат, че именно Yqh+ варианта би могъл да се асоциира с повишен риск от аборт, като се има предвид ролята на хетерохроматина по време на мейоза. В нашето проучване се отчете и статистическа значима зависимост между Yqh+ варианта и броя на СПА ($p=0,0043$).

Съгласно литературните данни полиморфния вариант $invY$ включва както перичентрични инверсия, от които най-често съобщавани са $inv(Y)(p11.2;q11.2)$ и $inv(Y)(p11.3;q12)$, така и парацентрична инверсия (завъртане на хетерохроматиновия блок в Y хромозомата в дълго рамо (166). Честотата на перичентричната инверсия в Y хромозомата е около 1-2% в различните човешки популации (166). Като най-чест вариант е съобщавана в различни проучвания, основно проведени върху Азиатски пациенти с РН (165,166), като на базата на относително високото и разпространение сред тези популации, авторите предполагат нейната роля най-вече при повтарящите се загуби на бременност (113,165,166). Честотата на намерената $invY$ в мъже в двойки с повтарящи се СПА варира от 2,22% в индийска популация до 30,5% установени в ограничена популация от емигранти в Южна Африка (резултат от рядко срещан генетичен дрифт) (166) (процентите са отнесени към общия брой изследвани мъже в извадките). *Sheth FJ, et al.*, (165) в свое проучване също върху двойки с повтарящи се СПА от Индия, отчитат 2,4% полиморфизми в мъжките партньори, измежду които инверсията в Y хромозомата била най-често срещаният вариант (76,2%). *García-Peiró A, et al.* (65), от друга страна установяват, че има значително високи мейотични изменения и анеуплоидия, високо фрагментиране на дезоксирибонуклеинова киселина на сперматозоидите и променени параметри на спермограмата сред мъжете с инверсия в Y хромозомата, от там и ролята и в инфертилитета. За разлика от тези проучвания в нашата извадка **български пациенти** не установихме такъв вид полиморфизъм. Подобно, *Penna, et al.* (144), в проучването си върху испанска популация, също не намират инверсия в Y хромозомата, а само Yqh^+ вариант. Причината за това вероятно е, че тя е сравнително по-рядко срещан вариант в Европейската популация (166). На базата на нашият резултат не може да бъде изказано твърдение за връзка на този вариант с РН в тази извадка изследвани пациенти.

В настоящата извадка интерес представляват данните ни за лицата с РН от група II, ако се разгледат *по подгрупи* където се установи зависимост. Вероятността за наличие на Yqh^+ варианта в мъжете нараства с увеличаване броя на СПА в двойката: при 2 СПА - 1,6% т.е. 4/247 мъже (случаи №4, №6, №9, №15); при 3 СПА - 3,4% т.е. 3/89 мъже (случаи №5, №10, №31); при 4 СПА - 5,3% т.е. 1/19 (случай №22); при 5 СПА - 25% т.е. 2/8 мъже (случаи №17 и №21). В достъпната за нас литература не намерихме данни за такава зависимост, но нашето наблюдение беше потвърдено чрез регресионен анализ (линейна регресия) с установена статистическа значимост ($p=0,0043$) (фиг. 35).



Фигура 35. Разпределение на Yqh+ по подгрупи

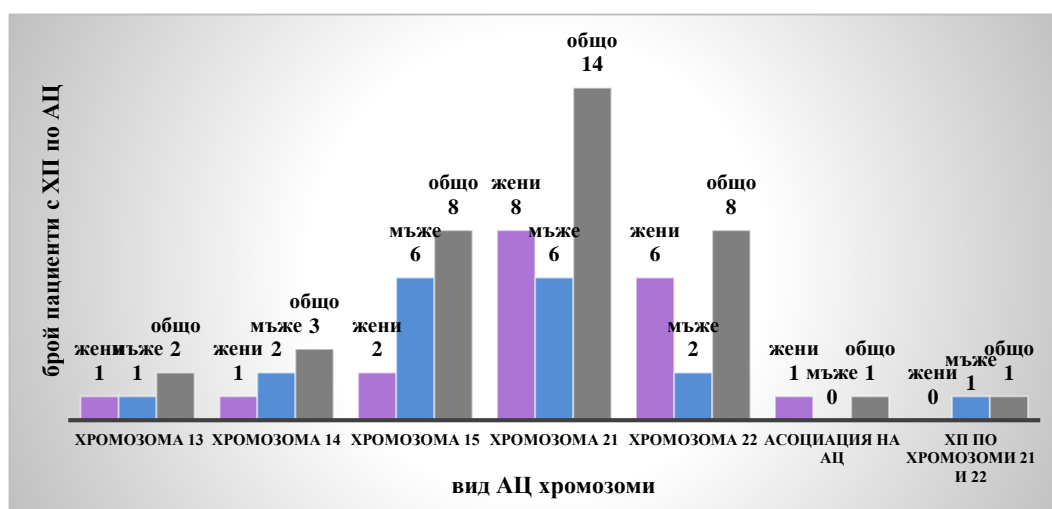
В обобщение за хромозомния полиморфизъм по Y хромозомата, може да се каже:

- Полиморфният Yqh+ вариант е доминиращ - в 90,3% (28/31) над Yqh- вариант; не беше установена инверсия в хетерохроматиновия блок на Y (invY);
- Най-голям е делът на мъжете с Y хромозомен полиморфизъм в група I (инфертилитет) – 51,6% (16/31), който е статистически значимо по-висок (p=0,05);
- С нарастване броя на СПА в двойката статистически значимо нараства вероятността за наличие на Yqh+ варианта (p=0,0043).

Хромозомен полиморфизъм по акроцентрични хромозоми

Полиморфизмът, общо за всички **акроцентричните хромозоми** е вторият по честота ХП, установен в общо 37 пациента (19 жени и 18 мъже), като отношението жени/мъже е 1,05. Това представлява **21,4%** от намерените от нас полиморфизми (37/173) и **2,1%** от всички анализирани пациенти (37/1733). Установената честота спрямо всички пациенти с РН (**2,1%**), е близка до този съобщена от *Hussen DF, et al.* (82), по-висока от тази при *Mierla, et al.* (122) (0,99%), и *Sheth FJ, et al.* (165) (0,12%), и два пъти по-ниска в сравнение с проучване на *Boronova, et al.* (32), които намират значително присъствие на полиморфните варианти на акроцентрични хромозоми - 4,65%.

Най-често срещаният полиморфизъм по АЦ хромозоми при жените, е този по *хромозома 21* – 8 жени (фиг. 36), като при шест от тях са засегнати само сателитите (s) (случаи №4, №5, №12, №13, №16 и №17), а при две - освен сателитите (s), и стълбчетата (stk) дават разлика в дължината (случаи №10 и №11). Вторият по честота полиморфизъм е по хромозома 22 (шест жени - случаи №, №6, №14 и №19). Единично представени са ХП по хромозома 13 (случай №18); хромозома 14 (случай №3); хромозома 15 (случаи №7 и №9). Тук интерес представлява случая на жена с установена склонност към асоциация на всички АЦ хромозоми във всички анализирани метафази между хромозоми 13, 14 и 22; между хромозоми 15, 21, 22, както и по двойки (хромозоми 13 и 14; 14 и 21; 15 и 14) (случай №2) (таблица 21). При мъжете полиморфизмът по *хромозома 21* и *хромозома 15* (по 6 мъже) показват равен дял (фиг. 36). И при двата полиморфни варианта, по четирима от мъжете имат промени само в сателитите (случаи №3, №5, №6; №8, №9; №10, №12; №16), а по двама са с промяна и в дължината на стълбчетата (случаи №4; №7; №11; №17). По отношение на показанията за изследване за тези полиморфни варианта, най-голям е броя на мъжете от група II (с ХП по хромозома 21 – 4, а с ХП по хромозома 15 - 3). По-рядко срещан е ХП по хромозома 13 (случай №13), по хромозома 14 (случаи №2 и №15) и по хромозома 22 (случаи №14 и №18). ХП едновременно по две акроцентрични хромозоми е намерен в един пациент (случай №1). Показанието за изследване, което категоризира групата на репродуктивно нарушение и кариотипа за пациенти от мъжки пол са представени в таблица 21.



Фигура 36. Разпределение на ХП според вида на АЦ хромозома и пол

Таблица 21. Пациенти с XII по АЦ хромозоми

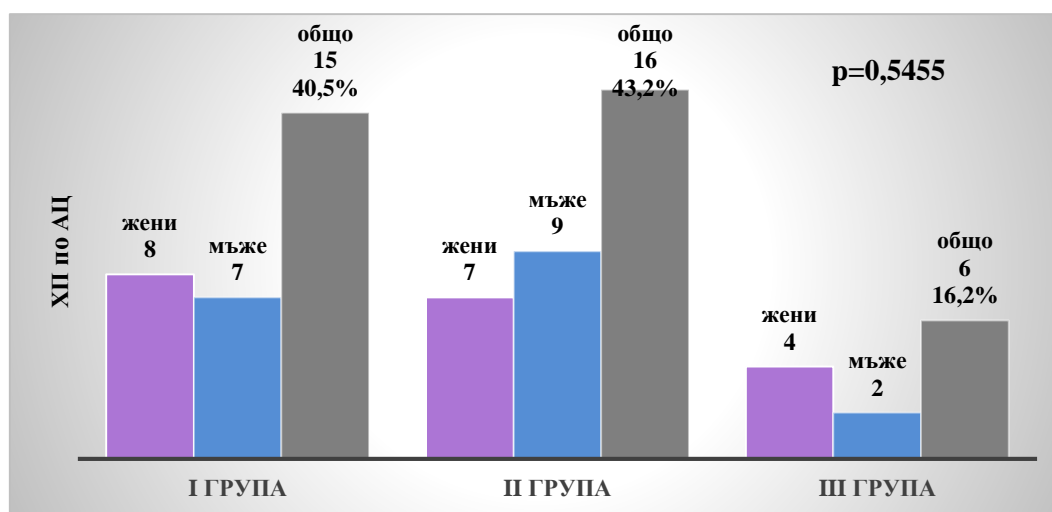
№	ПОКАЗАНИЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
ЖЕНИ			
1	Фамилно хромозомно преустройство	III	46, XX, 22ps+
2	Първичен инфертилитет	I	46,XX - асоциация на АЦ
3	Родено дете с със синдром на Rett и кариотип 46,XX,der(14p+)	III	46,XX,14ps+
4	Инфертилитет	I	46,XX,21ps+
5	3 СПА	II	46,XX,21ps+
6	2 СПА	II	46,XX,22ps+
7	Инфертилитет - 3 неуспешни ART	I	46,XX,15pstk+
8	Инфертилитет - 5 неуспешни ART	I	46,XX,22pstk+ps+
9	3 СПА	II	46,XX,15pstk+ps+
10	2 СПА	II	46,XX,21pstk+ps+
11	3 СПА	II	46,XX,21pstk+ps+
12	Инфертилитет-2 неуспешни ART	I	46,XX,21ps+
13	РН - 2 родени деца с аномалии (22 и 28 гс)	III	46,XX,21ps+
14	Родено дете с МВА и кариотип 47,XX+mar (idic(15?;22?))	III	46,XX,22ps+
15	Инфертилитет	I	46,XX,22pstk+ps+
16	Инфертилитет	I	46,XX,21ps+
17	2 СПА	II	46,XX,21ps+
18	4 СПА	II	46,XX,13pspstk
19	Първичен инфертилитет	I	46,XX,22ps+
МЪЖЕ			
1	3 СПА	II	46, XY, 21pstk+,22pstk-
2	Родено дете със синдром на Rett и кариотип 46,XX,der(14p+)	III	46,XY,14ps+
3	3 СПА	II	46,XY,15ps+
4	2 СПА	II	46,XY,21pstk+ps+
5	3 СПА	II	46,XY,21ps+
6	3 СПА	II	46,XY,21ps+
7	Родено дете със съмнение ли е за чуплива X синдром - 46,XY,15pstkstkps	III	46,XY,15pstkstkps
8	Инфертилитет	I	46,XY,15ps+
9	Инфертилитет - азооспермия	I	46,XY,21ps+
10	Инфертилитет-2 неуспешни ART	I	46,XY,15ps+
11	3 СПА	II	46,XY,21pstk+ps+
12	Инфертилитет	I	46,XY,21ps+
13	2 СПА	II	46,XY,13ps+
14	Инфертилитет - астенотератозооспермия	I	46,XY,22pstk+
15	Инфертилитет - 1 неуспешна ART	I	46,XY,14ps+
16	2 СПА	II	46,XY,15ps+
17	2 СПА	II	46,XY,15pspstk
18	3 СПА	II	46,XY,22ps+

В една от изследваните двойки (родено дете със синдром на Rett и с кариотип 46,XX,der(14p+), е намерен XII по хромозома 14 и при двамата партньори (случаи № 3 от жените и № 2 от мъжете в таблица 21).

Най-често срещания XII е този по *хромозома 21* (37,8% от всички варианти на АЦ хромозоми) (фиг.36). Полиморфизмите по хромозома 15 и хромозома 22 показват

еднакъв процент (по 21,6% или 8/37). Полиморфизмът по хромозома 15 не е най-често срещаният в нашата извадка, но е два пъти по-висок (4,62%, 8/173) от този посочен в проучването на *Boronova, et al. (32)* (2,2%), и *Turan GA, et al. (190)* (1,7%), които го докладват като най-чест от намерения при тях полиморфизъм при АЦ хромозоми.

При разпределението на този вид ХП по групи, групи I и II показват почти еднакво съотношение, съответно за група I - 15 пациента (15/37, 40,5%) и за група II - 16 лица (16/37, 43,2%). В група III, пациентите с установен ХП по АЦ хромозоми са 6 (6/37, 16,2%) (фиг. 37). По литературни данни големите сателити в късите рамена на акроцентричните хромозоми могат да доведат до неправилна хромозомна сегрегация по време на мейозата и от там до загуба на плод, поради което имат по-голямо значение при изследване на двойки с *повтарящи се СПА* (77). Това, обаче, не може да се потвърди категорично от нашите резултати, т.к. броя на пациентите с установен полиморфизъм по АЦ хромозоми е сходен както в групата с повтарящи се СПА, така и в тази с инфертилитет и не се установява статистически значима зависимост между тях ($\chi^2=1,212$; $p=0,5455$) (фиг. 37).



Фигура 37. Разпределение на пациентите с ХП по АЦ по пол и групи

- Полиморфизмът по хромозома 21 е най-често срещаният вариант от АЦ – 37,8% (14/37) с равно участие на двата пола - 19 жени (51,4%) и 18 мъже (48,6%);
- При разпределението на пациентите по вид РН, група I и група II имат почти равен дял (40,5% и 43,2%) без статистически значима зависимост между тях ($p=0,5455$).

Хромозомен полиморфизъм по хромозома 16

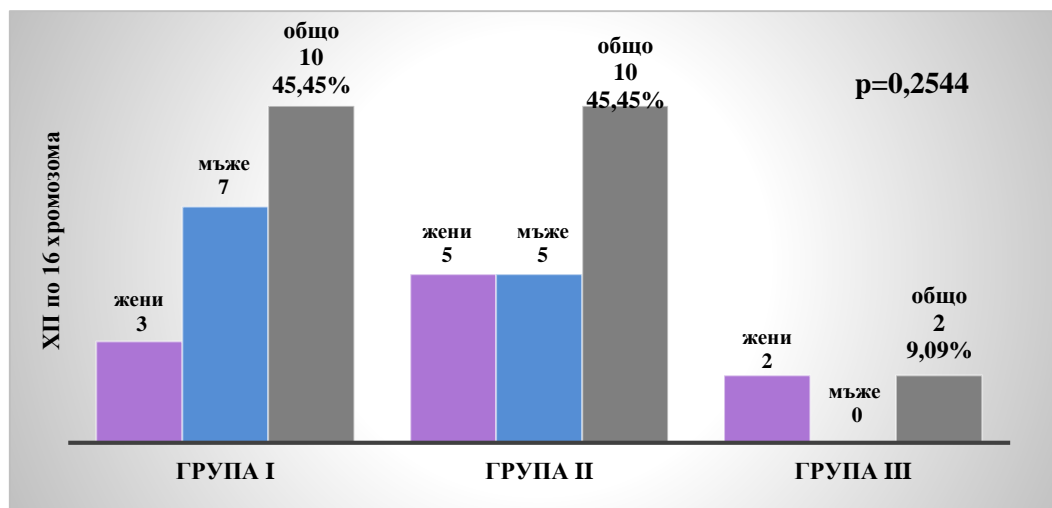
Хромозомен полиморфизъм по хромозома 16 беше намерен при 22 пациенти (12,7%; 22/173), в т.ч. 10 жени и 12 мъже (несигнификантна разлика по теста на Фишър- $p=0,8266$). Това представлява 1,3% от всички изследвани от нас пациенти с репродуктивни нарушения (22/1733). Намерената честота е сходна с тази докладвана от *Turan GA, et al., (190)* - 1,04% и е по-висока от тази намерена при *Düzcan F, et al., (55)* - 0,4%, *Mierla D, et al., (122)* - 0,28% и *Hussen DF, et al., (82)* - 0,6%. Резултатите от нашето изследване, както и от тези в други проучвания потвърждава факта, че честотата на полиморфизъмът по хромозома 16 е почти еднаква при пациенти с РН и нормалната популация – със силно вариращи граници от 0 до 6%. Това предполага, че този полиморфизъм почти няма ефект върху човешката репродукцията (146,171). Показанието за изследване, което категоризира групата на репродуктивно нарушение, кариотипа за пациенти с полиморфизъм по хромозома 16 са представени в таблица 22.

Таблица 22. Пациенти с ХП по хромозома 16

№	ПОКАЗАНИЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
ЖЕНИ			
1	Инфертилитет-1 неуспешни АРТ	I	46,XX,16qh+
2	2 СПА	II	46,XX,16qh+
3	Родено дете с ВА	III	46,XX,16qh+
4	1 починало дете и 1 неусп. АРТ	III	46,XX,16qh+
5	4 СПА	II	46,XX,16qh+
6	Вторичен инфертилитет	I	46,XX,16qh+
7	Инфертилитет-4 неуспешни АРТ	I	46,XX,16qh+
8	2 СПА	II	46,XX,16qh+
9	3 СПА	II	46,XX,16qh+
10	3 СПА	II	46,XX,16qh+
МЪЖЕ			
1	Инфертилитет - 6 неуспешни АРТ	I	46,XY,16qh+
2	2 СПА	II	46,XY,16qh+
3	2 СПА	II	46,XY,16qh+
4	Инфертилитет - азооспермия	I	46,XY,16qh+
5	Първичен инфертилитет	I	46,XY,16qh+
6	3 СПА	II	46,XY,16qh+
7	2 СПА	II	46,XY,16qh+
8	Инфертилитет - 1 неуспешно АРТ	I	46,XY,16qh+
9	Първичен инфертилитет	I	46,XY,16qh+
10	4 СПА	II	46,XY,16qh+
11	Инфертилитет -1 неусп. АРТ	I	46,XY,16qh+
12	Първичен инфертилитет	I	46,XY,16qh+

Сред нашите пациенти с РН не бяха намерени 16qh- и inv(16)(p11;q11) полиморфни варианти, чиято честота по литературни данни варира в широки граници - 0,04% - 23,6% и е около 1,4% в общата популация (151).

При разпределението на пациентите с установен полиморфизъм в хромозома 16 по групи, беше установено, че в групи I и II броя на лицата е равен – по 10 пациента (10/22; 45,45%), докато в група III – бяха намерени само 2 жени с 16qh+ (2/22; 9,09%) (фиг.38).



Фигура 38. Разпределение на пациентите с ХП по хромозома 16 по пол и групи

Анализът на статистически хипотези не отчете статистически значима зависимост при разпределението на ХП по хромозома 16 по групи ($\chi^2=2,738$; $p=0,2544$).

- По отношение на пола, лицата от мъжки пол с полиморфизъм по хромозома 16 (12 лица; 54,5%) имат лек превес над тези от женски пол (10 лица; 45,5%), но без статистически значима зависимост ($p=0,8266$, точния тест на Фишър);
- По отношение на групата репродуктивно нарушение, делът на пациентите с полиморфизъм по хромозома 16 в група I и група II е равен (по 45,45% или 10/22); не се намери статистически значима зависимост по Хи-квадрат ($p=0,2544$).

Хромозомен полиморфизъм по хромозома 1

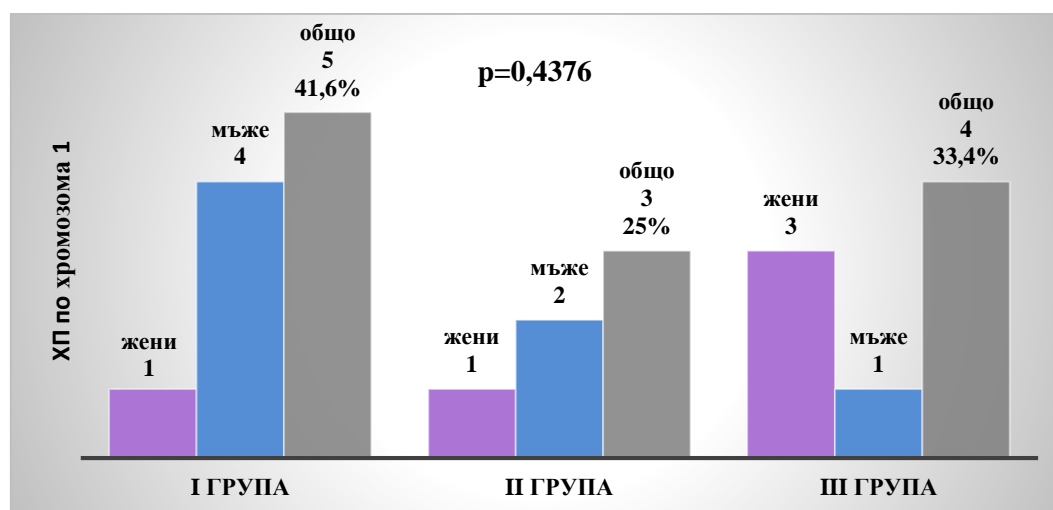
В нашето проучване броят на пациентите с полиморфизъм по хромозома 1 е най-малък, и то единствено с 1qh+ варианта – 12 лица, в т.ч. 5 жени и 7 мъже. Това бяха 6,9% т.е. 12/173 от всички установени хромозомни полиморфизми, или 0,7% т.е. 12/1733 от всички изследвани пациенти. Намереният от нас дял (0,7%) отнесен към цялата извадка

е сходен и е в границите на честотата докладвана от други проучвания - 0,4% (55) до 1,83% (199). Всички намерени полиморфизми по хромозома 1 по пол, групи и са представени в таблица 23. Не бяха намерени 1qh- и inv(1)(qh) варианти.

Таблица 23. Пациенти с ХП по хромозома 1

№	ПОКАЗАНИЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
ЖЕНИ			
1	Родено дете с ВА и кариотип 46,XX,1qh+	III	46,XX,1qh+
2	РН -2 СПА и 1 дете с ДНТ	III	46,XX,1qh+
3	Родено дете с ВА и кариотип 46,XY,1qh+	III	46,XX,1qh+
4	Инфертилитет	I	46,XX,1qh+
5	4 СПА	II	46,XX,1qh+
МЪЖЕ			
1	2 СПА	II	46,XY, 1qh+
2	2 СПА	II	46,XY,1qh+
3	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	46,XY,1qh+
4	РН - 1 аборт по медицински показания и 3 неуспешни АРТ	III	46,XY,1qh+
5	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	46,XY,1qh+
6	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	46,XY,1qh+
7	Инфертилитет - олигоспермия	I	46,XY,1qh+

При анализирането им по групи, тези пациенти се разпределят по следния начин: група I – 5 лица (5/12; 41,7%); група II – 3 лица (3/12; 25%); група III– 4 лица (4/12; 33,4%). Не се установи статистическа значимост на зависимостта между полиморфизъм по хромозома 1 и група репродуктивно нарушение ($\chi^2=1,653$; $p=0,4376$) (фиг.39).



Фигура 39. Разпределение на пациентите с ХП по хромозома 1 по пол и групи

По литературни данни, 1qh+ вариантът се среща с повишена честота при инфертилни жени и мъже с азооспермия, както и се асоциира с множество аборти (122,123). От нашите резултати не може да се изведе подобен извод, т.к. от групата с

инфертилитет има само една жена с установен такъв полиморфизъм, а от 4 мъже с 1qh+ вариант само един е с азооспермия. От групата със спонтанните аборти само един от пациентите е с повече от два СПА. Причината вероятно е разликата в размера на изседваните извадки и вида на репродуктивната неудача разглеждан в тези проучвания (изследване само на пациенти с инфертилитет (122) или на такива с повтарящи се СПА).

- И тук мъжете показват лек превес над жените – 7 мъже (58,3%) и 5 жени (41,7%), без този превес да е сигнификантен от статистическа гледна точка ($p=0,7706$, по Фишър);
- Лицата от група I са с най-голям дял – 41,6% (5/12), без да има статистическа значимост ($p=0,4376$).

Хромозомен полиморфизъм по две различни хромозоми

Полиморфизъм едновременно по две хромозоми беше намерен в двама от пациентите с репродуктивни проблеми. Единият е мъж насочен за изследване по повод родено дете с ХБ (синдром на Патау). При него се установява голям хетерохроматинов блок в хромозома 1 и хромозома Y с хетерохроматинов блок съответстващ на 5-ти бал - 46,XY,1qh+,Yqh+. Другата пациентка е жена с 4 СПА. При нея се намира голям хетерохроматинов блок едновременно в хромозоми 1 и 16 - 46,XX,1qh+,16qh+. Наслагването на два полиморфни варианта, вероятно има утежняващо обстоятелство върху репродукцията. Счита се, че 1qh+ варианта се асоциира с множество СПА (122,123), а полиморфизмът по хромозома 16, срещан със сходна честота в нормалната и засегнатата популация почти няма значение за репродукцията (146,171). Комбинацията от двата полиморфни варианта, обаче би могло да обясни четирите СПА при засегнатата жена. От Y хромозомния полиморфизъм, Yqh+ вариант е нй-често докладван както във връзка с инфертилитета (73,123,144,199), така и с повтарящи се СПА (15,113,132). Този вариант в комбинация с 1qh+ варианта вероятно има връзка с репродуктивната неудача при мъжа.

Хромозомен полиморфизъм - рядко срещан

При две жени в изследваната от нас група пациенти с РН, беше намерен рядко срещан полиморфизъм засягащ центромерните райони на хромозома 19 и хромозома 20. Едната е с кариотип 46,XX,19qcenh+, чийто повод за изследване са претърпени 2 СПА. Другата жена, с кариотип 46,XX,20pcenh+, е изследвана по повод родено дете с ХБ

(синдром на Търнър, доказан при нас). При анализа на детето, освен монозомия по X-хромозомата, се намери и тази допълнителна находка. За установяване нейният произход бяха изследвани двамата родители. Майката показва същата находка, което определя нейния полиморфен произход.

Обобщен вид на намереният ХП по пол и вид е предстван в таблица 24.

Таблица 24. Обобщение на ХП по пол и вид

	ЖЕНИ		МЪЖЕ		p	ОБЩО			p
	брой	% от ХП	брой	% от ХП		брой	% от ХП (173)	% от общ брой (1733)	
Хромозома 1	5	2,9	7	4	0,7706	12	6,9	0,7	0,4376
Хромозома 9	23	13,3	44	25,4	0,0088	67	38,7	3,9	<0,001
Хромозома 16	10	5,8	12	6,9	0,8266	22	12,7	1,3	0,2544
АХ	19	11	18	10,4	>0,9999	37	21,4	2,1	0,5455
ХП по 2 хромозоми	1	0,6	1	0,6	-	2	1,2	0,1	-
ХП 19qcenh+	1	0,6	-	-	-	1	0,6	0,05	-
20pcenh+	1	0,6	-	-	-	1	0,6	0,05	-
Хромозома Y	-	-	31	17,9	-	31	17,9	1,8	0,05
ОБЩО	60	34,7	113	65,3		173	100	9,98	p<0,001

Обобщение на ХП:

- Хромозомен полиморфизъм е намерен в 9,98% (173/1733) от изследваните пациенти с РН - статистически значимо по-висока честота в сравнение с нормалната популация (t=9; p<0,001); пациентите от мъжки пол показват статистически значимо два пъти повече полиморфност 6,52% (113/173) спрямо женски пол 3,46% (60/173) (p=0,0001);
- Полиморфизъм по хромозома 9 заема най-голям дял (38,7% т.е. 67/173); инверсията на хетерохроматиновият блок е най-честа (61,2% т.е.41/67); преобладават лицата от мъжки пол (65,8% т.е. 27/41); превес имат пациенти от група II (41,8% т.е. 28/67);
- Плиморфизмът по Y хромозома при мъже е втори по честота: доминиращ е Yqh+ вариант (90,3%); със статистически значима зависимост при разпределението им по групи (p=0,05); в група II (аборти) с нарастване броя

на СПА статистически значимо нараства и вероятността за наличие на Yqh+ варианта ($p=0,0043$).

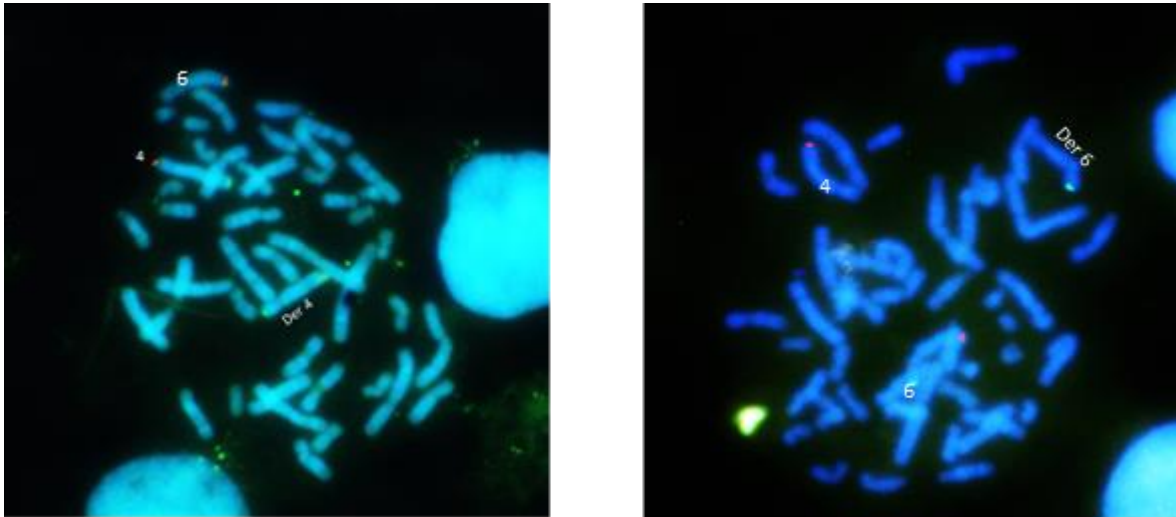
- Полиморфизмът по хромозома 1 и хромозома 16 е представен единствено с 1qh+ и 16qh+ варианти; от акроцентричните хромозоми, най-често срещаният е този по хромозома 21 - 37,8% (14/37);
- По отношение вида репродуктивно нарушение (групата), при съпоставяне към общия брой лица в групата, най-висока е честотата на хромозомния полиморфизъм при група I (инфертилитет) - 11,4% т.е. 67/589 пациента), следван от група II - 9,6% т.е. 71/743 пациента и група III - 8,7% т.е. 35/401 пациента, без статистически значима зависимост ($p=0,4110$); при разпределението на намерения полиморфизъм по групи обаче, най-висок е процентът в група II (41,1%), следван от група I (38,7%) и група III (20,2%) със статистическа значима зависимост между тях ($p= 0,0048$).

V.3. Молекулярно-цитогенетични изследвания за субтеломерни хромозомни преустройства

Субтеломерни хромозомни нарушения

От включените в проучването пациенти, анализ със субтеломерна FISH беше възможно да се проведе при 20 пациента от общо 85 селектирани лица, отговарящи на индикации за възможен диагностичен резултат от приложение на молекулярно-цитогенетичен анализ. Това бяха пациенти от групата с комбинирани репродуктивни нарушения (401), показали нормален кариотип от приложението на конвенционален цитогенетичен метод. Касае се за пациенти със съхранена клетъчна суспензия последните 3 години, или други, при които беше възможно осъществяване на контакт и отзив за провеждане на допълнителното изследване (след подписване на информирано съгласие). В тази група беше установено 1 субтеломерно хромозомно нарушение – 5% (1/20).

Касае се за двойка с родено дете с хромозомна болест – 46,XX,der(4). Чрез микрочипова сравнителна геномна хибридизация (array CGH) в детето е установено допълнителен материал от *хромозома 6* върху дълго рамо на *хромозома 4*. Този резултат препоръчва провеждането на допълнителен анализ при родителите чрез субтеломерна цитогенетика. Установи се субтеломерно преустройство при бащата между хромозоми 4 и 6 (фиг.40) и нормален резултат при майката.



Фигура 40. Локус-специфична FISH при пациент 1 с използване на сонда за субтеломерните хромозомни региони на: А) mix 04 - 4p (зелен сигнал), 4q (червен сигнал) Б) mix 6 – 6p (зелен сигнал), 6q- (червен сигнал).

Откритият в нашата извадка процент на субтеломерни хромозомни преустройства е по-висок (5%) от този съобщаван по литературни данни (средно 3,5%) в двойките с РН, главно при такива с комбинирана репродуктивна история (27,35,44,56,71,75,88,93,125,150,194,200). Причината за по-високият процент установен в нашето проучване най-вероятно е резултат от тясната селекция на пациентите отговарящи на критериите за включване в този вид анализ, целенасочено търсене на дианостицирано в индексен пациент субтеломерно преустройство, както и на малката извадка от анализирани пациенти (20 лица).

В по-голяма част от проведените проучвания се потвърждава необходимостта и значимостта от търсенето на субтеломерни преустройства в пациенти с неизяснена етиология на повтарящи се СПА, в комбинация с мъртвородено и/или с дете с МВА и/или УМИ (35,71,75,93,125,150,194,200). Липсата или ниският процент на субтеломерни преустройства открити при други проучвания, кара някои автори да считат, че тези преустройства са редки и нямат съществен принос от приложение сред пациенти с множествени спонтанни аборта (27,44,56,88). Повечето от тях обаче, отчитат ролята им в случаите, когато една двойка, освен аборти, има и родени деца с малформации и/или УМИ, репродуктивни проблеми от комбиниран тип (27,44,56,125). Причината за това е че, носителите на балансирани хромозомни преустройства (в частност реципрочни транслокации) са фенотипно нормални, но преживяват повтарящи се неблагоприятни бременности, резултат от формирането на небалансирани гамети по време на мейозата. В болшинството случаи, този хромозомен дисбаланс в зиготите е несъвместим с живота,

и води до неуспешна имплантация, спонтанен аборт, мъртвораждање или раждане на увредено дете в семейства, носители на такива. Малкият размер на хромозомните сегменти, участващи в субтеломерните транслокации, са малко вероятно да предизвикат само спонтанни аборти, но могат да бъдат отговорни за РН от комбиниран тип – ранни СПА и деца с МВА/УмИ и данни за хромозомна болест (35,71,75,93,125,150,194,200). На базата на това, авторите стигат до извода, че търсенето на субтеломерни балансирани преустройства чрез флуорисцентна ин ситу хибридизация в дадена двойка, трябва да се провежда само след зачеването на плод и/или раждането на дете с характеристика на хромозомна болест (194).

Молекулярно-цитогенетичният анализ чрез флуоресцентна ин ситу хибридизация има две основни предимства пред микрочиповия анализ, а именно: улавяне на балансирани преустройства и определяне механизма на възникване на прениареждането.

Субтеломерните хромозомни аберации са най-честата причина за изява на т. нар. „хромозомен фенотип” (интра-утеринно забавяне в развитието или изоставане в невропсихическото развитие, мускулна хипотония, лицево-челюстни аномалии, аномалии на крайниците, вътрешните органи и ЦНС), съчетан с фамилност, при която унаследяването не следва класическите Менделови характеристики и рутинното цитогенетично изследване не показва видими структурни или бройни аберации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушената репродукция е социално значим проблем, като относителния дял на двойките с РН в световен мащаб нараства непрекъснато. Използваните в настоящия дисертационен труд цитогенетични и молекулярно-цитогенетични методи дават възможност за изясняване на част от причините за РН в българската популация. Малкият брой пациенти изследвани със субтеломерна FISH, обаче, не позволява да се оценят и анализират детайлно факторите за РН в този аспект и изисква по-широкообхватно проучване за да се изведе статистическа значимост от приложението на този метод.

Установените от нас хромозомни нарушения в 111 от изследваните пациенти (110 от цитогенетичен анализ и 1 от субтеломерен анализ) разкриха причините за неуспешната репродукция при пациенти с репродуктивни проблеми.

Най-голям беше дялът на *структурните* хромозомни аберации, от които *транслокациите* бяха най-често откривани. Установи се и статистическа значимост по *пол* – доминиращи са жените носители на структурни преустройства - тези аберации са съвместими с фертилността при тях, докато при мъжете се асоциират основно с инфертилност и нисък потенциален шанс за развитие на жизнеспособен плод. Това обеснява и значително по-високия брой балансиран преустройство при жените от *група III* в нашето проучване спрямо мъжете и превеса на последните при инфертилитет. Шансът за наличие на хромозомно нарушение бе най-висок при двойки с родено дете с малформации и/или УмИ, самостоятелно или в комбинация с друга неудача. При разпределението на пациентите от *група II* (СПА) по подгрупи, беше установена статистически значима корелация между *броя на СПА* и носителството на балансирано преустройство, с което се потвърждава асоциирането им с по-високия риск за прекъсване на бременността.

Бройните хромозомни нарушения при пациенти с РН включват само половите хромозоми и са представени най-често под формата на мозаицизъм, статистически значимо по-висок в лицата от женски пол. Установеният по-висок процент на патологична клетъчна линия в групата с инфертилитет и на нискостепенен мозаицизъм в групата със СПА допринасят за защита на тезата, съгласно която високият процент мозаицизъм по половите хромозоми се отразява най-вече на възможността за забременяване (инфертилитета), а нискостепенният мозаицизъм се асоциира основно с повтарящи се СПА. Въпреки многото данни в тази посока обаче, все още наличието на

полово хромозомният мозаицизъм в различните тъкани и последиците от него не са напълно проучени.

В последните години все повече се разглежда и ролята на *хромозомния полиморфизъм* за репродукцията. Статистически значима по-висока честота на установения от нас ХП в сравнение с нормалната популация, позволява да се оцени значението му за неуспешната репродукция, а установеният най-висок процент ХП в *група I*, със сигнификантно по-висока честота в *подгрупа „мъжки фактор“*, определя влиянието му за инфертилитета при мъже в българската популация.

Инверсията на хетерохроматиновия регион в хромозома 9 (*inv(9)(qh)*), както и големият блок *9qh+* се асоциират основно с повтарящи се СПА, като намереният от нас най-висок процент и на двата полиморфни варианта в група II потвърждава тази връзка. Полиморфизмът по Y хромозомата е разпространен основно сред инфертилните мъже, като вариации в дължината на хетерохроматиновия регион са най-често срещаните варианти, от които основно *Yqh+* се асоциира с неуспешната репродукция. В настоящето проучване се потвърди статистически значимо доминиране на мъжете с Y полиморфизъм, основно *Yqh+* вариант, в групата с *инфертилитет*. Ниската честота на Y хромозомен полиморфизъм в подгрупа „мъжки фактор“ в нашето проучване обаче, не позволи да се отчете корелация с нарушена спермограма, докладвана от други проучвания. Беше потвърдено и наличието и ролята на *Yqh+* варианта за повишен риск от аборт, като с нарастване броя на СПА статистически значимо нараства и вероятността за наличие на *Yqh+* варианта. Не беше намерена *invY*, често съобщавана от други проучвания във връзка с повтарящи се СПА.

Резултатите от настоящата работа представят неоспоримата полза от провеждането на конвенционалният цитогенетичен анализ в двойки с РН, както за разкриването на хромозомни нарушения с доказано значение за РН, така и на хромозомни полиморфизми, чиято връзка с неуспешната репродукция е все по-често отразявана в последните години.

Класическият цитогенетичен анализ в комбинация със субтеломерна FISH като рутинна част от изследванията на двойките с репродуктивни проблеми би подобрило процеса на медико-генетичното консултиране, тъй като ще даде възможност за провеждане на по-задълбочен анализ на причините за неуспешната репродукция и ще даде възможност за съставяне на индивидуален план за репродуктивно поведение при тях.

ИЗВОДИ

Извод 1. Анализът на селектирана извадка от общо 1733 пациенти с репродуктивни нарушения, изследвани за 16 годишен период показва по трендов модел:

- ✓ увеличаване на лицата с репродуктивни проблеми с тенденция към *слабо* и *плавно* покачване и в бъдеще време;
- ✓ намаляване на общия брой на пациентите < 35г. и *увеличение на тези* > 35 г. с прогноза за двукратна разлика в следващите 5 години;
- ✓ по отношение групата на репродуктивно нарушение има тенденция към отчетливо *нарастване само при лица с инфертилитет* (група I); тенденция към слабо намаление за лица с повтарящи се аборти (група II).

Извод 2. Комплексната оценка на *клинично значимите хромозомни аберации* разкрити чрез конвенционален цитогенетичен анализ в извадка от българска популация пациенти с РН показва:

- ✓ Обща честота - 6,35%; статистически значимо преобладават *структурните* нарушения над бройните (63,6% към 33.6%) и дела на *жените* над този на мъжете;
- ✓ Най-висока честота на ХА се установяват при пациентите от *група III*, значимо по-висок от този в група I и група II което потвърждава ролята на ХА при лица с комбинирани репродуктивни неудачи;
- ✓ При разпределение на ХА по подгрупи се наблюдава, че при двойки от група II, процентът на хромозомните аберации статистически значимо нараства с увеличаване *броя на абортите*.

Извод 3. По отношение честотата, характеристиката и значението на хромозомните нарушения при пациенти с РН се извежда, че:

- за **бройните** хромозомни нарушения:
 - ✓ засягат единствено *половите* хромозоми; *мозаичната* форма е основната (91,9%); пълна форма на анеуплоидия е установена само при мъже с инфертилитет
 - ✓ в голямото си болшинство (81,1%) ангажират лица от *женски* пол;
 - ✓ при пациенти с *инфертилитет* (група I) се открива най-високостепенен мозаицизъм по половите хромозоми, което корелира с възможността за забременяване; при пациенти със *СПА* (група II) се наблюдава ниско-степенен мозаицизъм, като с повишаване броя на абортите намалява вероятността за неговото разкриване за сметка на структурни хромозомни нарушения.
- за **структурните** хромозомни нарушения:

- ✓ *пълната* форма е преобладаваща (88,6%), мозаичните форми имат неясен произход и отношение към репродуктивните проблеми;
- ✓ преобладаващ е делът на пациенти от *женски* пол (57,1%), при който ХА са съвместими с фертилността, при мъжете, те се асоциират с инфертилност поради възможна увреда в сперматогенезата;
- ✓ балансираната *транслокация* е най-често откриваната структурна хромозомна аберация, следвана от *инверсия*, и двете статистически значимо по-висока от нормалната популация;
- ✓ пациентите от група III (*комбинирано репродуктивно нарушение*) статистически значимо преобладават като носители на балансирани преустройства; при пациенти със СПА (група II) се установява пряка зависимост между броят на СПА и носителството на балансирано преустройство, което се асоциира и с по-висок риск за прекъсване на бременността.

Извод 4. По отношение честотата, характеристиката и значението на хромозомните полиморфизми при пациенти с РН статистически значими са изводите, че:

- ✓ Хромозомен полиморфизъм се установява *по-често при пациенти с РН* (9,98%) в сравнение с общата българска популация, поради което следва да се отчита като фактор с репродуктивно значение; мъжете показват двукратно по-висока полиморфност от жените;
- ✓ Полиморфизмът по *хромозома 9* е с най-висока честота предимно като *inv(9)(qh)*; *основно в група II* (СПА), който потвърждава асоциацията основно с повтарящи се загуби на бременност;
- ✓ Полиморфизмът по *Y хромозома* е втори по честота предимно като Yqh^+ вариант (90,3%) *основно в група I* (*инфертилитет*); потвърждава се ролята на Yqh^+ варианта и в група II (*повтарящи аборт*), като с нарастване броя на СПА статистически значимо нараства и вероятността за наличие на Yqh^+ варианта;
- ✓ Броят на полиморфизмите разпределен по вид репродуктивно нарушение установи статистически значимо преобладаване при лица от *група II и група I* над група III.

Извод 5. Субтеломерни хромозомни аномалии, установени в малък дял (5%) селектиран брой лица от група III (комбинирани репродуктивни нарушения) показват, че молекулярно-цитогенетичният анализ чрез флуоресцентна ин ситу хибридизация има своето място за субклетъчно ниво на диагностициране на балансирани преустройства, но е необходимо по-широкообхватно проучване за да се изведе статистическа значимост от приложението на този метод.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер:

1. За пръв път се докладват и анализират данни за динамика на развитие и ролята на клинично значими хромозомни нарушения и варианти на хромозомни полиморфизми в български пациенти с репродуктивни нарушения. Получените резултати са база за сравнителни популационни проучвания и планирани действия в областта на медицинското обслужване при пациенти с репродуктивни проблеми.
2. Сред български пациенти с РН се приложи молекулярно-цитогенетичен метод за търсене на субтеломерни условно балансирани преустройства, което позволява по-детайлен анализ и оценка на факторите за репродуктивни неблагоприятия.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдено е значението на хромозомните нарушения (бройни, структурни, комбинирани) като част от причините за неуспешната репродукция в българската популация.
2. Потвърдено е мястото и значението от приложението на конвенционален цитогенетичен анализ при двойки с РН като рутинен метод на изследване като база за надграждане от съвременни молекулярно-генетични диагностични диагностични подходи.

Приноси с приложен характер:

1. Насочването на пациенти с репродуктивни проблеми към Кабинет за медико-генетична консултация има съществено значение в подхода за обслужване на семейства с репродуктивни неудачи, както за назначаване и интерпретиране на допълнителни генетични изследвания, за подпомагане изясняването на причините, така и с цел подобряване на възможностите на съставяне на индивидуален план за репродуктивно поведение при тези двойки.
2. При пациентите с репродуктивни нарушения се препоръчва: провеждане на конвенционален цитогенетичен анализ; при нормален кариотип и комбинирана репродуктивна история - молекулярно-цитогенетичният анализ чрез FISH (субтеломерен скрининг) за търсене на субтеломерни балансирани преустройства.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

УМБАЛ "СВЕТА МАРИНА" ЕАД - ГР.ВАРНА
Лаборатория по Медицинска генетика

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ЦИТОГЕНЕТИЧНО И МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

Име: пол дата на раждане

1.

2.

Адрес: Телефон:

Повод за изследването (диагноза):

Давам съгласие да участвам в изследване на хромозомни изменения чрез използване на цитогенетичен и молекулярно-цитогенетичен анализ.

Получих генетична консултация с подробни разяснения относно моите въпроси и давам биологичен материал:

Давам съгласие да се вземат кръвни проби от моите непълнолетни деца за цитогенетичен анализ:

пол дата на раждане

1.

Наясно съм, че:

1. Върху взетия материал ще бъдат проведени изследвания за определяне дали аз или членовете на моето семейство сме носители на отклонения, обуславящи или предразполагащи към хромозомно заболяване (патология).
2. Предлаганото изследване води до откриване на хромозомни аномалии с точност над 99%. Анализът е сложен и има малка вероятност да се допусне някаква грешка (в около 1 на 1000 проби), която се среща във всички лаборатории.
3. В някои случаи клетките от взетите кръвни проби не се размножават (в около 1 от 50 случая) или взетият материал може да се окаже недостатъчен или некачествен, поради което се налага повторно вземане на материал.
4. Информирам съм за сроковете на получаване на резултата в конкретния случай.
5. Изследванията могат да са с научно-изследователска цел
6. Съгласен съм взетата от мен проба и резултатите от анализа да бъдат използвани за научни разработки и публикувани в научни списания, при условие че данните са анонимни и защитени.
7. Персоналът извършващ изследването носи професионална и етична отговорност.

Желяя резултатите от анализа да се съобщят само на мен от лекаря, назначил изследването и на който съм се доверил. Да ми бъдат предадени лично или чрез упълномощено от мен лице..... или по друг начин (ел.поща или др.)
.....

Дата:

Подпис:

Лекар:

Подпис:

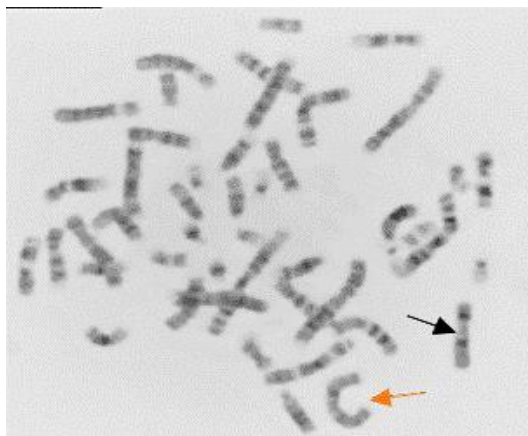
(име,фамилия)

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Представяне на някои от случаите с балансирани преустройства установени в настоящата дисертационен труд.

i(X)(q10)

Аберантен кариотип **46,X,i(X)(q10)** (фиг. 41), беше установен при жена от семейство, насочено поради раждането на дете с ХБ от трета патологична бременност - 46,i(X)(q10)У. Първите две бременности завършват с ранни спонтанни аборти.

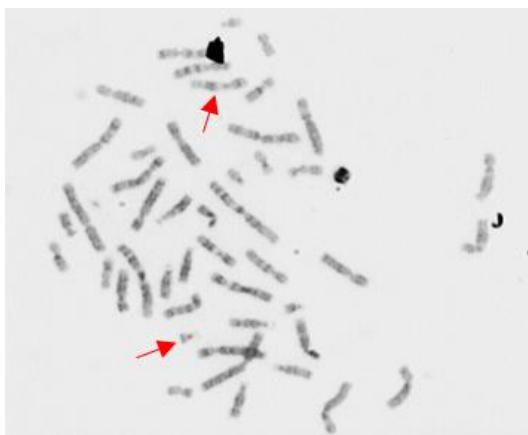


Фигура 41. Кариограма 46,X,i(X)(q10)

t(11;22)(q24;q12.3)

Балансираната реципрочна транслокация t(11;22)(q24;q12.3) е установена при три двойки: 2 жена и 1 мъже:

- ✓ **46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)** (фиг.42) - 4 спонтанни аборта и 1 родено дете с множествени аномалии, починало на 6 месечна възраст
- ✓ **46,XY,t(11;22)(q24;q12.3)** - родено дете със синдром на Даун
- ✓ **46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)** - родено дете с ХБ



Фигура 42. Кариограма t(11;22)(q24;q12.3)

t(2;9)(q36;q21)

БРТ t(2;9)(q36;q21) е намерена в две двойки (фиг.43):

- ✓ 46,XX,t(2;9)(q36;q21) - родено дете с ХБ (47,XX,+der(9)t(2;9)(q36;q21))
- ✓ 45,X,t(2;9)(q36;q21)[6]46,XX,t(2;9)(q36;q21)[24] – родено дете със синдром на Даун (47,XY,t(2;9)(q36;q21)+21[47]/46,XY,t(2;9)(q36;q21)[3])



Фигура 43. Кариограма на t(2;9)(q36;q21)

t(5;19)(q12;p13.1)

46,XX,t(5;19)(q12;p13.1) (фиг.44) е намерен при жена, насочена поради родено дете със смесени разстройства на емоциите и поведението (синдром на Чуплива X-хромозома)

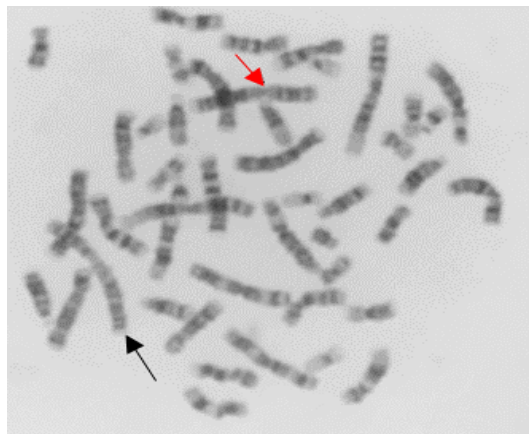


Фигура 44. Кариограма на t(5;19)(q12;p13.1)

inv(2)(p11.2;q12)

Балансираното преустройство inv(2)(p11.2;q13) е намерено в три двойки:

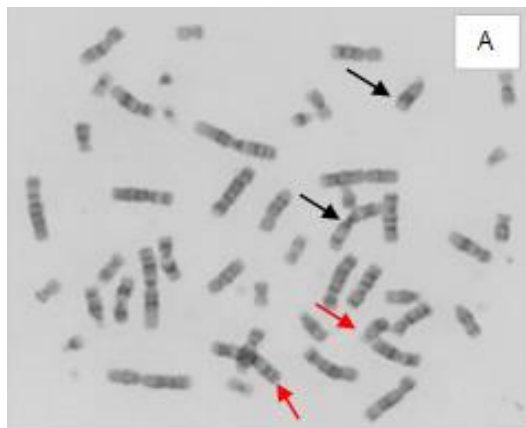
- ✓ 46,XY,inv(2)(p11.2-q13) - с 2 СПА
- ✓ 46,XY,inv(2)(p11.2;q13) - 3 ранни СПА
- ✓ 46,XY,inv(2)(p11.2;q13) - дългогодишен стерилитет



Фигура 45. Кариограма на inv(2)(p11.2;q12)

t(3;13)(p25;q31)

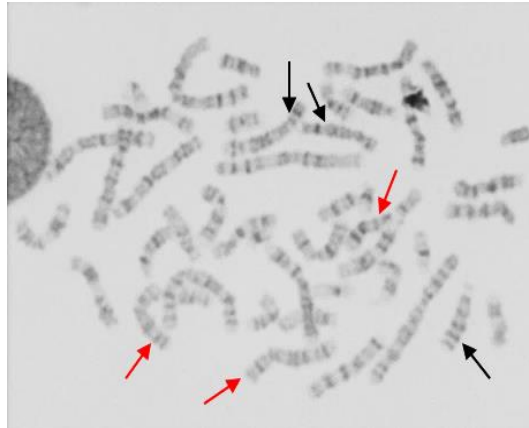
Транслокация t(3;13)(p25;q31) е установена във фамилия, с най-много обхванати и изследвани от нас членове – пробанда (фиг.46) е мъж от двойка, насочена за изследване поради РН - 2 родени деца с ВА и 1 аборт по медицински показания на плод с ВА.



Фигура 46. Кариограма на t(3;13)(p25;q31)

t(5;13;8)(p14;q31;q23)

46, XY,t(5;13;8)(p14;q31;q23) (фиг.47) - рядко срещана тройна транслокация е установена при мъж от двойка изследвана по повод родено дете (2 мес.) в тежко общо състояние, с малформативни стигми, чийто хромозомен анализ установява ХБ, кариотип с наличие на две дериватни хромозоми – дериватни хромозома 5 и 8.

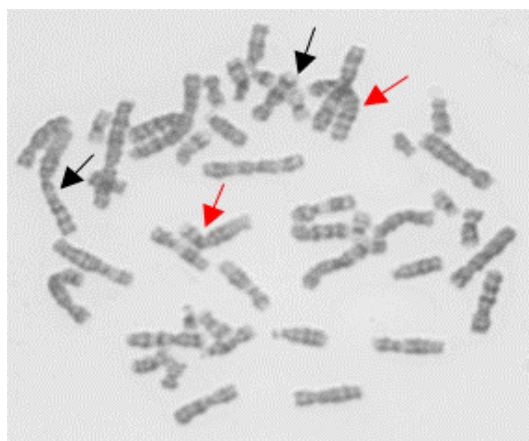


Фигура 47. Кариограма на t(5;13;8)(p14;q31;q23)

t(1;9)(q21;q32)

Фамилно хромозомно преустройство t(1;9)(q21;q32) (фиг.48) беше намерено в семейство, чийто пробанд е мъж изследван по повод съмнение за синдром на Клайнфелтър

- ✓ 46,XY,t(1;9)(q21;q32) - брат на пробанда
- ✓ 46,XX,t(1;9)(q21;q32) - майка на пробанда



Фигура 48. Кариограма на t(1;9)(q21;q32)

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА

Научни публикации в пълен текст по темата на дисертационния труд:

1. **Цветкова М.**, Ангелова Л., Кисьов Ст. ”Субтеломерни хромозомни преустройства като причина за хабитуални (повтарящи) спонтанни аборти”; Репродуктивно здраве. брой 30/2019 ISSN 1312-6180.
2. **Tsvetkova M.**, M. Levkova, L. Angelova, „Cytogenetic findings of couples with reproductive failure - retrospective analysis from Bulgarian Population“, Варненски медицински форум, т. 10, 2021.
3. **Цветкова М.**, Л.Ангелова, М. Левкова, К. Цветков „Честота и значение на хромозомния полиморфизъм в български пациенти с инфертилитет и спонтанни аборти“ списание Репродуктивно здраве (март 2021 - под печат).

Научни съобщения по темата на дисертационния труд

1. Angelova L, M. Hachmeriyan, D. Konstantinova, M. Stoyanova, **M. Cvetkova**, M. Georgieva, V. Iotova. Balanced chromosomal rearrangements and their clinical significance. European Human Genetics Conference, June 06 - June 09, 2015, Glasgow, Scotland, United Kingdom, European Journal of Human Genetics, Nature Publishing Group, vol 23, suppl.1, June 2015, 450. **(IF 4.349)**
2. **Tsvetkova M.**, M. Stoyanova, M. Levkova, Ts. Ruseva, V.Miteva, Angelova L. Cytogenetic abnormalities in amniocytes and fibroblasts of abortion material diagnosed in the Laboratory of Medical Genetics – Varna for a 10 year period. European Human Genetics Conference, June 16–19, 2018, Milan, Italy, Session E-P01- Reproductive Genetics/Prenatal genetics E-P01.03, Poster area, June 17,2018,9:00 AM-5:45 PM.
3. **Tsvetkova M.**, M. Levkova, M. Hachmeryan, L. Angelova, „Chromosomal polymorphism and reproductive failure in the Bulgarian population (a 15-years experience)“, 30-th Jubilee Annual Assembly of IMAB and 7-th Annual Meeting of Alumni Club at Medical University Varna; under the patronage of the Rector of Varna Medical University; 18 - 21 October 2020.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Калайджиева Л, Симеонов Е, Вълков В ЖН. Система за индивидуална регистрация на вродените аномалии - едногодишен опит на НИАГ. Педиатрия. 1986;(6):44–52.
2. Наредба №19 от 22 декември 2014г. за утвърждаване на Медицински стандарт "Акушерство и гинекология". ДВ. 2017 Маг 14.
3. Симеонов Е, Бояджиев С, Ниньо А, Аладжем Е, Славова М, Иванова Т ИГ. Регистрация на вродени аномалии при новородени. Педиатрия. 1991;(4):13–20.
4. Симеонова М, Ковачева К., Ангелова Л. Регистрация на вродени аномалии при новородени – 2-годишен опит на медико-генетичния център в Плевен. Педиатрия. 1993;(1):13–6.
5. Стоева Р. “Субмикроскопски хромозомни аберации при пациенти с идиопатично изоставане в умственото развитие и вродени аномалии – клинични, молекулярни и молекулярно- цитогенетични проучвания” Дисертация. Пловдив, 2012. 200 л.
6. Хараламбова С. Инфертилитет и качество на живот при жени в процедури по асистирана репродукция. Население. 2018;36(2):173–192.
7. Янев С. Между 300 и 400 000 са младите хора с репродуктивни проблеми. News.bg. 2018 Jun 6.
8. Цветкова М, Левкова М, Кадийска Т, Ангелова Л, ”Семейство с първичен инфертилитет и съчетани цитогенетични и молекулярно -генетични находки” Брой 2 / 2019 г., Supplement ISSN 1314-3581.
9. Бочков, Н. П., Захаров, А. Ф., & Иванов, В. И. (1984). Медицинская генетика. Издателство “Медицина”. Москва.
10. A.V. J. Recurrent Spontaneous Abortions (RSA). NIRMANN. 2006.
11. Aase JM. Diagnostic dysmorphology. Springer; 1990.
12. Akgul M, Ozkinay F, Ercal D, Cogulu O, Dogan O, Altay B, et al. Cytogenetic abnormalities in 179 cases with male infertility in Western Region of Turkey: report and review. J Assist Reprod Genet. 2009; 26(2–3):119–22.
13. Al Hussain M, Al-Nuaim L, Talib ZA, Zaki OK. Cytogenetic study in cases with recurrent abortion in Saudi Arabia. Ann Saudi Med. 2000;20(3–4):233–6.
14. AL-Hassanee AJ, Abdulameer SJ, Kashmoola MA. Chromosomal abnormality in couple with repeated abortion. Med J Tikrit. 2012;1(181):48–53.
15. An C, Tang D, Wu M, Ding X, Jiang X. Major chromosomal abnormalities and chromosome polymorphism in 1543 couples with recurrent miscarriages in Hubei province of China. Biomed Res. 2016;27(4).
16. Anahory, T., Hamamah, S., Andreo, B., Hedon, B., Claustres, M., Sarda, P., & Pellestor, F. (2005). Sperm segregation analysis of a (13; 22) Robertsonian translocation carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting. Human Reproduction, 20(7), 1850-1854.
17. Anderson, J. E., Farr, S. L., Jamieson, D. J., Warner, L., & Macaluso, M. (2009). Infertility services reported by men in the United States: national survey data. Fertility and sterility, 91(6), 2466-2470.

18. Anton, E., Blanco, J., & Vidal, F. (2010). Meiotic behavior of three D; G Robertsonian translocations: segregation and interchromosomal effect. *Journal of human genetics*, 55(8), 541-545.
19. Arora M, Mukhopadhaya N. Recurrent pregnancy loss. Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited; 2018.
20. ASRM. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* [Internet]. 2013 Jan 1;99(1):63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.023>
21. Ayed W, Messaoudi I, Belghith Z, Hammami W, Chemkhi I, Abidli N, et al. Chromosomal abnormalities in 163 Tunisian couples with recurrent miscarriages. *Pan Afr Med J*. 2017;28(1):158.
22. Azim M, Khan AH, Khilji ZL, Pal JA, Khurshid M. Chromosomal abnormalities as a cause of recurrent abortions: a hospital experience. *J Pakistan Med Assoc*. 2003;53:117.
23. Bablok L, Dziadecki W, Szymusik I, Wolczynski S, Kurzawa R, Pawelczyk L, et al. Patterns of infertility in Poland - Multicenter study. *Neuroendocrinol Lett*. 2011;32(6):799–804.
24. Bak, M., Fonseca, A., Mehrjouy, M., Rasmussen, M., Halgren, C., Bache, I., Kroisel, P., Midyan, S., Vermeesch, J., Vienna-Morgante, A., Abe, K., Moretti-Ferreira, D., Angelova, L., Rajcan-Separovic, E., Sismani, C., Aristidou, C., Sedlacek, Z., Fagerberg, C., Brondum-Nielsen, K., Consortium, I. B. M. (2019). Morbidity risk of chromosomal breakpoints in topological domains enriched in non-exonic conserved elements. *European Journal of Human Genetics*, 26, 59-60. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0249-5>
25. Balkan M, Tekes S, Gedik A. Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *J Assist Reprod Genet*. 2008;25(11–12):559–65.
26. Battaglia A, Carey JC. Diagnostic evaluation of developmental delay/mental retardation: An overview. *Am J Med Genet*. 2003;117C(1):3–14.
27. Benzacken B, Carbillon L, Dupont C, Siffroi JP, Monier-Gavelle F, Bucourt M, et al. Lack of submicroscopic rearrangements involving telomeres in reproductive failures. *Hum Reprod*. 2002;17(5):1154–7.
28. Bhasin MK. Human population cytogenetics: a review. *Int J Hum Genet*. 2005;5(2):83–152.
29. Bhasin S, De Kretser DM, Baker HWG. Clinical review 64: Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(6):1525–9.
30. Bick RL, Madden J, Heller KB, Toofanian A. Recurrent miscarriage: causes, evaluation, and treatment. *Medscape Womens Health* [Internet]. 1998;3(3):2. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/9732087>
31. Blumberg BD, Shulkin JD, Rotter JI, Mohandas T, Kaback MM. Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. *Am J Hum Genet*. 1982;34(6):948.
32. Boronova I, Bernasovska J, Cakanova G, Ferenc P, Petrejckikova E, Szabadosova V. Heterochromatin variants in Slovak women with reproductive failure. *Int J Hum Genet*. 2015;15(1):1–5.

33. Boue A, Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn.* 1984;4(7):45–67.
34. Braekeleer MD, Dao T-N. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* [Internet]. 1990 Jul 1;5(5):519–28. Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137135>
35. Bruyere H, Rajcan-Separovic E, Doyle J, Pantzar T, Langlois S. Familial cryptic translocation (2;17) ascertained through recurrent spontaneous abortions. *Am J Med Genet Part A.* 2003;123(3):285–9.
36. Bui T-H, Blennow E, Nordenskjöld M. Prenatal diagnosis: molecular genetics and cytogenetics. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002;16(5):629–43.
37. Campana M, Serra A, Neri G, Reynolds JF. Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: a study of 269 balanced translocations. *Am J Med Genet.* 1986;24(2):341–56.
38. Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma.* 1970; 30(2):215–27.
39. Celep F, Karagüzel A, Özeren M, Bozkaya H. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;127(1):106–9.
40. Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, et al. Cytogenetics and infertility in man* I. Karyotype and seminal analysis: Results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet.* 1975;39(2):231–54.
41. Chelly J. MRX review. *Am J Med Genet.* 2000;94(5):364–6.
42. Çirakoğlu A, Yilmaz Ş, Kuru D, Tarkan-Argüden Y, Güven GS, Deviren A, et al. Structural chromosomal abnormalities in couples with recurrent pregnancy loss. *Turkiye Klin J Med Sci.* 2010;30(4):1185–8.
43. Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2005;20(2):437–42.
44. Cockwell AE, Jacobs PA, Beal SJ, Crolla JA. A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities. *Hum Genet.* 2003;112(3):298–302.
45. Cooper JP. Telomere transitions in yeast: the end of the chromosome as we know it. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(2):169–77.
46. Coulam CB. Unexplained recurrent pregnancy loss: epilogue. *Clin Obstet Gynecol.* 1986;29(4):999–1004.
47. Cousens S, Blencowe H, Stanton C, Chou D, Ahmed S, Steinhardt L, et al. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2009 with trends since 1995: a systematic analysis. *Lancet.* 2011;377(9774):1319–30.
48. Crosignani PG, Fraccaro M, Rubin BL. Genetic control of gamete production and function. Vol. 3. Academic Press; 1982.
49. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet.* 1997;72(4):468–77.

50. Cyrus A, Malihea K, Farideh F. Cytogenetic studies among Iranian infertile men: The first 20-year long-term report. *African J Biotechnol.* 2012;11(37):8973–8.
51. de Kretser DM. Male infertility. *Lancet* [Internet]. 1997 Mar 15;349(9054):787–90. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)08341-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)08341-9)
52. Değirmenci B, Solak M, Yildiz SH, Erdogan MO, Elmas M, Fistik T. Evaluation of cytogenetic and y chromosome microdeletion analyzes in infertile cases. *Meta Gene.* 2019;19:78–81.
53. Demirhan O, Pazarbaşı A, Suleymanova-Karahan D, Tanriverdi N, Kılınç Y. Correlation of clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 and genetic counseling. 2008;
54. Dutta UR, Rajitha P, Pidugu VK, Dalal AB. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in Southern region of India: Report and review. *J Assist Reprod Genet.* 2011;
55. Düzcan F, Atmaca M, Cetin GO, Bağcı H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82(1):53–6.
56. Fan Y, Zhang Y. Subtelomeric translocations are not a frequent cause of recurrent miscarriages. *Am J Med Genet.* 2002;109(2):154.
57. Farcas S, Belengeanu V, Popa C, Stoicanescu D, Stoian M, Veliscu M, et al. Role of chromosomal translocations in recurrent spontaneous abortion. *Timisoara Med J.* 2007;2:117–21.
58. Feuerbach F, Galy V, Trelles-Sticken E, Fromont-Racine M, Jacquier A, Gilson E, et al. Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat Cell Biol.* 2002;4(3):214.
59. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* [Internet]. 2009; 2(2):76–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19609401>.
60. Franssen MTM, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PMM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KBJ, et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *bmj.* 2005;331(7509):137–41.
61. Frenster JH, Herstein PR. Gene de-repression. *N Engl J Med.* 1973;288(23):1224–9.
62. Fryns J, Van Buggenhout G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998;81(2):171–6.
63. Gaboon NEA, Mohamed AR, Elsayed SM, Zaki OK, Elsayed MA. Structural chromosomal abnormalities in couples with recurrent abortion in Egypt. *Turkish J Med Sci.* 2015;45(1):208–13.
64. Gadow EC, Lippold S, Otano L, Serafin E, Scarpati R, Matayoshi T. Chromosome rearrangements among couples with pregnancy losses and other adverse reproductive outcomes. *Am J Med Genet.* 1991;41(3):279–81.
65. García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, et al. Sperm DNA Integrity and Meiotic Behavior Assessment in an Infertile Male Carrier of a 9qh. *Biomed Res Int.* 2010;2011.
66. Gardner RJ. M, Sutherland GR, Shaffer LG. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York, Oxford University Press; 2004.

67. Gazvani, M. Rafet, et al. "Evaluation of the role of mitotic instability in karyotypically normal men with oligozoospermia." *Fertility and sterility* 73.1 (2000): 51-55.
68. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, et al. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod.* 2001;16(1):82–90.
69. Gersen SL, Keagle MB, Gersen S, Keagle M. *The principles of clinical cytogenetics.* Springer; 2013.
70. Ghazaey S, Keify F, Mirzaei F, Maleki M, Tootian S, Ahadian M, et al. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions in northeastern iran. *Int J Fertil Steril.* 2015;9(1):47.
71. Giardino D, Finelli P, Gottardi G, Clerici D, Mosca F, Briscioli V, et al. Cryptic subtelomeric translocation t (2;16)(q37;q24) segregating in a family with unexplained stillbirths and a dysmorphic, slightly retarded child. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(12):881–6.
72. Gonçalves RO, Santos WVB, Sarno M, Cerqueira BAV, Gonçalves MS, Costa OLN. Chromosomal abnormalities in couples with recurrent first trimester abortions. *Rev Bras Ginecol e Obs.* 2014;36(3):113–7.
73. Guo T, Qin Y, Gao X, Chen H, Li G, Ma J, et al. The role of male chromosomal polymorphism played in spermatogenesis and the outcome of IVF/ICSI-ET treatment. *Int J Androl.* 2012;35(6):802–9.
74. Hachmeriyan M., M.Zeleva, M.Tzvetkova, H.Duba. M.Maurer, V.Jotova, L.Angelova. Combination of Cri du Chat and partial trisomy 13 syndrome due to paternal balanced three way translocation – case report. 10th Balkan Congress of Human Genetics. 2nd Alpe Adria meeting of human genetics, Bled, Slovenia, 10-12 October 2013, Book of Abstracts, 101.
75. Hajlaoui A, Slimani W, Kammoun M, Sallem A, El Amri F, Chaieb A, et al. Subtelomeric rearrangements in patients with recurrent miscarriage. *Int J Fertil Steril.* 2018;12(3):218.
76. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia . Vol. 68, *Clinics . scielo* ; 2013. p. 39–60.
77. Hanif MI, Khan A, Arif A, Shoeb E. Cytogenetic investigation of couples with recurrent spontaneous miscarriages. *Pakistan J Med Sci.* 2019;35(5):1422.
78. Hassold TJ, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet.* 1984;18(1):69–97.
79. Hernández Uribe L, Hernández Marín I, Cervera-Aguilar R, Ayala AR. [Frequency and etiology of azoospermia in the study of infertile couples]. *Ginecol Obstet Mex [Internet].* 2001;69:322-326. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/11599318>.
80. Hocquet D, Roux C, Collonge-Rame M-A, Fellmann F, Bresson JL. Bilan des examens chromosomiques de 277 couples candidats à l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde. *Andrologie.* 1999;9(4):505–10.
81. Houmaid H, El Bekkay C, Nassereddine S, Talbi H, Amehdare L, Hilali A. Chromosomal Abnormalities in 238 Couples with Recurrent Miscarriages in Morocco. *Open J Genet.* 2018;8(02):15.

82. Hussen DF, Hammad SA, Refaat KM, Ashaat EA, Aglan MS, Otaify GA, et al. Chromosomal aberrations and chromosomal heteromorphisms among young couples with recurrent spontaneous abortion. *Middle East J Med Genet.* 2019;8(1):48.
83. Hussen DF, Hammad SA, Refaat KM, Ashaat EA, Gaber KR, Aglan MS, et al. Screening for parental mitotic nondisjunction as a cause of fetal aneuploidy. *Middle East J Med Genet.* 2018;7(1):26.
84. Husslein P, Huber J, Wagenbichler P, Schnedl W. Chromosome abnormalities in 150 couples with multiple spontaneous abortions. *Fertil Steril.* 1982;37(3):379–83.
85. Hyde KJ, Schust DJ. Genetic Considerations in Recurrent Pregnancy Loss. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015 Mar 1;5(3). Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/3/a023119.abstract>
86. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):411–26.
87. Jacobs PA, Klinger D. Paris conference (1971): Standardization in human cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 1972;11:313–62.
88. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Lorentz CP, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, et al. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med.* 2003;5(1):28–34.
89. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *J Urol.* 2002;167(5):2138–44.
90. Jarvi K, Lo K, Fischer A, Grantmyre J, Zini A, Chow V, et al. CUA Guideline: The workup of azoospermic males. *Can Urol Assoc J [Internet].* 2010 Jun;4(3):163–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20514278>
91. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N, (SIGEP). O behalf of ESIG for EP. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod [Internet].* 2006 May 17;21(9):2216–22. Available from: <https://doi.org/10.1093/humrep/del150>
92. Jiang J, Fu M, Wang D. Cytogenetic analysis in 61 couples with spontaneous abortions. *Chin Med J (Engl).* 2001;114(2):200–1.
93. Joyce CA, Dennis NR, Howard F, Davis LM, Thomas NS. An 11p; 17p telomeric translocation in two families associated with recurrent miscarriages and Miller-Dieker syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(11):707–14.
94. Kalter H, Warkany J. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention. *N Engl J Med.* 1983;308(8):424–31.
95. Karakus N, Kara N, Tural S, Kocak I, Elbistan M. A retrospective study of balanced chromosomal translocations in a Turkish population. *Int J Hum Genet.* 2012;12(4):319–23.
96. Keymolen, K., Van Berkel, K., Vosselmans, A., Staessen, C., & Liebaers, I. (2011). Pregnancy outcome in carriers of Robertsonian translocations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(10), 2381-2385.
97. Khanna J, van Look PFA, Griffin PD, Activities UNF for P. Challenges in reproductive health research: biennial report: 1992-1993. World Health Organization; 1994.

98. Khudr G. Cytogenetics of habitual abortion: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 1974;29(5):299–310.
99. Knight SJL, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet.* 2000;37(6):401–9.
100. Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DLN, et al. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet.* 1997;5:1–8.
101. Knight SJL, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, et al. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):320–32.
102. Kosyakova N, Grigorian A, Liehr T, Manvelyan M, Simonyan I, Mkrtchyan H, et al. Heteromorphic variants of chromosome 9. *Mol Cytogenet.* 2013;6(1):14.
103. Kovacheva K, Kotsev R, Konova E, Rilcheva V, Kamburova Z, Simeonova M. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Bulgarian male with azoospermia or severe oligospermia. *J IMAB—Annual Proceeding Sci Pap.* 2018;24(4):2217–22.
104. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):271–85.
105. Kumar, R., Tanwar, M., Ammini, A. C., Kumar, R., Gupta, N. P., Sharma, R. K., & Dada, R. (2008). Robertsonian translocation and their role in pathogenesis of recurrent in vitro fertilization failure. *Medical Science Monitor*, 14(12), CR617-CR620.
106. Lee JY, Dada R, Sabanegh E, Carpi A, Agarwal A. Role of genetics in azoospermia. *Urology.* 2011;77(3):598–601.
107. Lee SY, Lee BY, Park JY, Choi EY, Lee YW, Oh AR, et al. Paracentric inversions found in prenatal diagnosis. *J Genet Med.* 2013;10(2):104–8.
108. Lindsten JE, Klinger HP, Hamerton JL, Gefener ES. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978) ISCN (1978). *Cytogenet Cell Genet.* 1978;21:309–409
109. Lippman-Hand A, Vekemans M. Balanced translocations among couples with two or more spontaneous abortions: are males and females equally likely to be carriers? *Hum Genet.* 1983;63(3):252–7.
110. Lissitsina J. Cytogenetic causes of male infertility. 2011.
111. Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM (Pat), Reeve A, et al. *Mental retardation: Definition, classification, and systems of supports, 10th ed.* Washington, DC, US: American Association on Mental Retardation; 2002. xiii, 238–xiii, 238.
112. Mackic-Djurovic M, Hasic S, Kiseljakovic E, Rukavina D, Ibrulj S. Cytogenetic Abnormalities Found in Patients with Reproductive Problems. *Med Arch.* 2017;71(6):396.
113. Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(6):726–32.

114. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med* [Internet]. 2012/12/18. 2012;9(12):e1001356–e1001356. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23271957>
115. Mau UA, Bäckert IT, Kaiser P, Kiesel L. Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1997;12(5):930–7.
116. McGowan-Jordan, J. (Ed.). (2016). *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016); Recommendations of the International Standing Human Committee on Human Cytogenomic Nomenclature Including New Sequence-based Cytogenomic*. Karger.
117. McKinlay Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. *Oxford Monogr Med Genet*. 1996;29.
118. Medicine PC of the AS for R. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2008;89(6):1603.
119. Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: an overview of genetic and non-genetic backgrounds. *Int J Hum Genet*. 2006;6(2):109–17.
120. Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, et al. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. *Hum Reprod*. 1998;13(3):576–82.
121. Mierla D, Stoian V. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. *Maedica (Buchar)*. 2012;7(1):25.
122. Mierla D, Stoian V. Chromosomal polymorphisms involved in reproductive failure in the romanian population. *Balk J Med Genet*. 2012;15(2):23–8.
123. Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertil Steril*. 2009;92(1):88–95.
124. Mitelman F. *ISCN 1995: an international system for human cytogenetic nomenclature (1995): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*, Memphis, Tennessee, USA, October 9-13, 1994. Karger Medical and Scientific Publishers; 1995.
125. Monfort S, Martínez F, Roselló M, Badia L, Prieto F, Orellana C. A subtelomeric translocation apparently implied in multiple abortions. *J Assist Reprod Genet*. 2006;23(2):97–101.
126. Morales R, Lledó B, Ortiz JA, Ten J, Llácer J, Bernabeu R. Chromosomal polymorphic variants increase aneuploidies in male gametes and embryos. *Syst Biol Reprod Med*. 2016;62(5):317–24.
127. More R, Borate S, Gangane SD. Cytogenetic Study in Couples with Primary Infertility. *J Med Sci Clin Res*. 2016;4(1):8941–4.
128. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris M, Amice V, Le Martelot MT, Roche S, et al. Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature. *Int J Androl*. 2004;27(3):178–82.

129. Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H. Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9)(p11q12)] on infertility. *Indian J Hum Genet.* 2007;13(1):26.
130. Mozdarani H, Meybodi AM, Zari-Moradi S. A cytogenetic study of couples with recurrent spontaneous abortions and infertile patients with recurrent IVF/ICSI failure. *Indian J Hum Genet.* 2008;14(1):1.
131. Naasse Y, Charoute H, El Houate B, Elbekkay C, Razoki L, Malki A, et al. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. *BMC Urol.* 2015;15(1):95.
132. Nagvenkar P, Desai K, Hinduja I, Zaveri K. Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia & non-obstructive azoospermia. *Indian J Med Res.* 2005;122(1):34.
133. Najafi K, Gholami S, Moshtagh A, Bazrgar M, Sadatian N, Abbasi G, et al. Chromosomal aberrations in pregnancy and fetal loss: Insight on the effect of consanguinity, review of 1625 cases. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. 2019 Aug 1;7(8):e820. Available from: <https://doi.org/10.1002/mgg3.820>
134. Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M, et al. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol.* 2001;8(2):49–52.
135. Nakatsu SL, Masek MA, Landrum S, Frenster JH. Activity of DNA templates during cell division and cell differentiation. *Nature.* 1974;248(5446):334–5.
136. Nazmy, Nahla A. Cytogenetic studies of couples with reproductive failure in Alexandria, Egypt. *J Egypt Public Health Assoc,* 2008, 83.3-4: 255-271.
137. Neri G. Pericentric inversion of chromosome 9 and Down's syndrome: a retrospective and prospective family survey. *Clin Genet.* 1981;19:526–7.
138. Nguyen RHN, Wilcox AJ. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J Epidemiol Community Heal.* 2005;59(12):1019–21.
139. Niroumanesh S, Mehdipour P, Farajpour A, Darvish S. A cytogenetic study of couples with repeated spontaneous abortions. *Ann Saudi Med.* 2011;31(1):77–9.
140. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine e-book.* Elsevier Health Sciences; 2015.
141. Ogur, G., Van Assche, E., Vegetti, W., Verheyen, G., Tournaye, H., Bonduelle, M., ... & Liebaers, I. (2006). Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Molecular human reproduction,* 12(3), 209-215.
142. Osztovcics MK, Toth SP, Wessely JA. Cytogenetic investigations in 418 couples with recurrent fetal wastage. In: *Annales de genetique.* 1982. p. 232–6.
143. Panasiuk B, Danik J, Lurie I, Stasiewicz-Jarocka B, Lesniewicz R, Sawicka A, et al. Reciprocal chromosome translocations involving short arm of chromosome 9 as a risk factor of unfavorable pregnancy outcomes after meiotic malsegregation 2: 2. *Adv Med Sci.* 2009;54(2):203.
144. Penna SV, Araujo H, Ballesta F, Ballesta JL, Vanrell JA. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch Androl.* 2001;46(3):205–10.
145. Peschka B, Leygraaf J, Van der Ven K, Montag M, Schartmann B, Schubert R, et al. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999;14(9):2257–63.
146. Pokale Y, Khadke P. Cytogenetic studies of recurrent miscarriage-A review. *Int STD Res Rev.* 2016;1–18.

147. Pokale YS, Khade P. Evaluation and Contribution of Major Chromosomal Abnormalities in Couples with Recurrent Miscarriage. 2016;15(1):84–8.
148. Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B, et al. Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet.* 2002;111(1):31–9.
149. Prager P. States mandating insurance coverage for infertility and pregnancy loss: The international council on infertility information dissemination. Retrieved Novemb. 2003;28:2015.
150. Primerano A, Colao E, Vilella C, Nocera MD, Ciambrone A, Luciano E, et al. A cryptic balanced translocation (5; 17), a puzzle revealed through a critical evaluation of the pedigree and a FISH focused on candidate loci suggested by the phenotype. *Mol Cytogenet.* 2015;8(1):70.
151. Radoslava Emilova, Mihaela Mladenova AT and IB. Results from cytogenetic studies in patients with reproductive failure (a 20-year experience). In: 12th Balkan Congress of Human Genetics. Plovdiv, Bulgaria; 2017.
152. Rao B V, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K. Pericentric inversion of chromosome 9 [inv (9)(p12q13)]: Its association with genetic diseases. *Indian J Hum Genet.* 2006;12(3):129–32.
153. Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002;78(3):515–9.
154. Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R, Fox MF, Kotze GM, Brusnický J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet.* 1984;66(2–3):162–4.
155. Rosenbusch B. Somatic chromosomal abnormalities in couples undergoing infertility treatment by intracytoplasmic sperm injection. *J Genet.* 2010;89(1):105.
156. RPL EGG on, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod open.* 2018;2018(2):hoy004.
157. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol.* 2005;53(4):159–65.
158. Sant-Cassia LJ, Cooke P. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1981;88(1):52–8.
159. Schaefer GB, Bodensteiner JB. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. *Pediatr Clin North Am.* 1992;39(4):929–43.
160. Scholtes MCW, Behrend C, Dietzel-Dahmen J, van Hoogstraten DG, Marx K, Wohlers S, et al. Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril.* 1998;70(5):933–7.
161. Schreurs A, Legius E, Meuleman C, Fryns J-P, D’Hooghe TM. Increased frequency of chromosomal abnormalities in female partners of couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2000;74(1):94–6.

162. Serra A, Bova R, Neri G, Brahe C, Tedeschi B. Potential effects of pericentric inversion of the heterochromatic region of chromosome 9 on reproductive fitness. *Clin Genet.* 1980;17:87.
163. Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri G, Tedeschi B, Tassone F, et al. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet.* 1990;37(S7):162–8.
164. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction-Cambridge-.* 2003;126(1):13–25.
165. Sheth FJ, Liehr T, Kumari P, et al. Chromosomal abnormalities in couples with repeated fetal loss: An Indian retrospective study. *Indian Journal of Human Genetics.* 2013 Oct;19(4):415-422. DOI: 10.4103/0971-6866.124369.
166. Sheth FJ, Shah UJ, Desai MJ, Sheth JJ. Clinical profile of inversion Y in people of Gujarat, West India. *Int J Hum Genet.* 2011;11(4):245–8.
167. Sider D, Wilson WG, Sudduth K, Atkin JF, Kelly TE. Cytogenetic studies in couples with recurrent pregnancy loss. *South Med J.* 1988;81(12):1521–4.
168. Simeonov E DB. Registration of congenital anomalies in genetic/environmental interactions studies. In: *Euroworkshop on reproductive and developmental toxicity of pesticides.* Sofia; 2000.
169. Simpson JL, Elias S, Martin AO. Parental chromosomal rearrangements associated with repetitive spontaneous abortions. *Fertil Steril.* 1981;36(5):584–90.
170. Singhal, P., Malik, A., Naredi, N., Pranaya, G., & Agrawal, A. (2019). The robertsonian translocation of '21/22' in nonobstructive azoospermia: A rare case report from India. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 12(3), 255.
171. Solari AJ. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma.* 1980;81(3):315–37.
172. Soler A, Morales C, Mademont-Soler I, Margarit E, Borrell A, Borobio V, et al. Overview of chromosome abnormalities in first trimester miscarriages: a series of 1,011 consecutive chorionic villi sample karyotypes. *Cytogenet Genome Res.* 2017;152(2):81–9.
173. Speicher M, Antonarakis SE, Motulsky AG. *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches.* Springer Science & Business Media; 2009.
174. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *TRENDS Genet.* 2002;18(2):74–82.
175. Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, et al. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(12):790–800.
176. Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HWG. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod.* 1999;14(8):2097–101.
177. Stouffs K, Seneca S, Lissens W. Genetic causes of male infertility. In: *Annales d'endocrinologie.* Elsevier; 2014. p. 109–11.
178. Sudhir N, Kaur T, Beri A, Kaur A. Cytogenetic analysis in couples with recurrent miscarriages: a retrospective study from Punjab, north India. *J Genet.* 2016;95(4):887–94.

179. Suganthi R, Vijesh VV, Vandana N, Benazir JFA. Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *Int J Fertil Steril*. 2014;7(4):253.
180. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N, Suzumori K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril*. 2004;81(2):367–73.
181. Tempest HG, Simpson JL. Why are we still talking about chromosomal heteromorphisms? *Reprod Biomed Online*. 2017;35(1):1–2.
182. ten Hoop-Bender P, Stenberg K, Sweeny K. Reductions in stillbirths—more than a triple return on investment. *Lancet*. 2016;387(10018):e14–6.
183. Tharapel At, Tharapel Sa, Bannerman Rm. Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: a review. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1985;92(9):899–914.
184. Tho PT, Byrd JR, McDonough PG. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. *Fertil Steril*. 1979;32(4):389–95.
185. Tommerup, N., Mehrjouy, M., Rasmussen, M., Bache, I., Halgren, C., Kroisel, P., ... Midyan, S. (2017). Interpretation of NGS-mapped chromosomal breakpoints: The importance of healthy controls . 50th European-Society-of-Human-Genetics (ESHG) Conference (pp.616-617). Copenhagen, Denmark.
186. Toncheva D, Ilieva P, Mavrudieva M. Detection of low level sex-chromosomal mosaicism. *Genet Couns*. 1994;5(4):363–7.
187. Tsenghi C, Metaxotou-Stavridaki C, Strataki-Benetou M, Kalpini-Mavrou A, Matsaniotis N. Chromosome studies in couples with repeated spontaneous abortions. *Obstet Gynecol*. 1976;47(4):463–8.
188. Tsui KM, Yu WL, Lo FM, Lam TS. A cytogenetic study of 514 Chinese couples with recurrent spontaneous abortion. *Chin Med J (Engl)*. 1996;109(8):635–8.
189. Tunç, E., Tanrıverdi, N., Demirhan, O., Süleymanova, D., & Çetinel, N. (2016). Chromosomal analyses of 1510 couples who have experienced recurrent spontaneous abortions. *Reproductive biomedicine online*, 32(4), 414-419.
190. Turan GA, Kaya I, Genç M, Kasap E, Eskicioglu F, Gur EB, et al. Chromosomal abnormalities and polymorphisms among couples with recurrent in vitro fertilization (IVF) failure. *Sifa Med J*. 2015;2(3):49.
191. Turnepenny P & Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 12th ed. Elsevier; 2007.
192. van den Berg MMJ, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis Dis*. 2012;1822(12):1951–9.
193. VBabu R, Ghosh K. Chromosomal variants and genetic diseases. *Indian J Hum Genet*. 2005;11(2):59–60.
194. Wakui K, Tanemura M, Suzumori K, Hidaka E, Ishikawa M, Kubota T, et al. Clinical applications of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis: identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J Hum Genet*. 1999;44(2):85–90.

195. Wang HS, Hamerton JL. C-band polymorphisms of chromosomes 1, 9, and 16 in four subgroups of mentally retarded patients and a normal control population. *Hum Genet.* 1979;51(3):269–75.
196. Ward BE, Henry GP, Robinson A. Cytogenetic studies in 100 couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Hum Genet.* 1980;32(4):549.
197. Who: Recommended Definitions, Terminology and Format for Statistical Tables Related to The Perinatal Period And Use of A New Certificate For Cause of Perinatal Deaths. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977;
198. Wilson R, Ling H, MacLean MA, Mooney J, Kinnane D, McKillop JH, et al. Thyroid antibody titer and avidity in patients with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 1999;71(3):558–61.
199. Xu X, Zhang R, Wang W, Liu H, Liu L, Mao B, et al. The effect of chromosomal polymorphisms on the outcomes of fresh IVF/ICSI–ET cycles in a Chinese population. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(11):1481–6.
200. Yakut S, Berker-Karaüzüm S, Şimşek M, Zorlu G, Trak B, Lüleci G. Telomere-specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet.* 2002;61(1):26–31.
201. Yu MY, Chen YL, Qiu J. Cytogenetic analysis on patients with a history of spontaneous abortion. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban= J Zhejiang Univ Med Sci.* 2002;31(5):375–8.
202. Yuce H, Tekedereli I, Elyas H. Cytogenetic results of recurrent spontaneous abortions in Turkey. *Med Sci Monit.* 2007;13(6):CR286–9.
203. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril.* 2009;
204. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod* [Internet]. 2017 Jul 28;32(9):1786–801. Available from: <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>.