



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА**

д-р Мария Костадинова Левкова

**Молекулярно-генетични и
имунологични биомаркери при медико-
генетичното консултиране на семейства
с инфертилитет**

**АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

за присъждане на научна и образователна степен „доктор“

Докторска програма: „Генетика“

Варна

2021г.



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

д-р Мария Костадинова Левкова

**Молекулярно-генетични и имунологични
биомаркери при медико-генетичното
консултиране на семейства
с инфертилитет**

АВТОРЕФЕРАТ
НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
за присъждане на научна и
образователна степен „доктор“

Област на висше образование:
4. „Природни науки, математика и информатика”

Професионално направление: „Биологически науки” Шифър 4.3.
Докторска програма: „Генетика”

Научен ръководител:
Проф. д-р Людмила Бончева Ангелова, д.м.
Доц. д-р Трифон Георгиев Червенков, д.б.

Научни рецензенти:
Чл.-кор. проф. д-р Драга Иванова Тончева, д.б.н.
Проф. Алексей Славков Савов, д.б.

Варна
2021г.

Дисертационният труд е представен на 126 страници и съдържа 24 фигури и 18 таблици. Библиографията обхваща 272 литературни източника, от които 7 на кирилица и 265 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна.

Всички включени в дисертацията изследвания са извършени в:

- * Катедра по Медицинска генетика, Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна
- * Лаборатория по Медицинска генетика, УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна

Настоящите изследвания са субсидирани частично по проект № 18011 „Проучване на молекулярно-генетични фактори в CFTR гена при мъже с първичен инфертилитет“, финансиран от фонд „Наука“ (конкурсна сесия 2018) към Медицински университет Варна.

Дисертационният труд е представен на заседание на катедрен съвет на Катедра „Медицинска генетика“, Медицински Университет – Варна, на 11.01.2021 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на2021г. в Катедра „Медицинска генетика“, Медицински Университет Варна, бул. Христо Смирненски 1, гр.Варна.

Материалите по защитата са на разположение в Катедра „Медицинска генетика“, Медицински Университет – Варна.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на кирилица

- ДНК** – Дезоксирибонуклеинова Киселина
ЕС – Европейски съюз
НСИ – Национален статистически институт
СПА – спонтанен аборт

Съкращения на латиница

- A** – Adenine
ASRM – American Society for Reproductive Medicine
AZF – Azoospermia Factor
bp – base pairs
C – Cytosine
CBAVD – Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens
CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DAZ – Deleted In Azoospermia
delF508 – Deletion Of The Codon For Phenylalanine At Position 508
EDTA – Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
G – Guanine
HLA – Human Leukocyte Antigen
ICSI – Intracytoplasmic sperm injection
IVS8 5T – 5T Allele In Intron 8

- PCR** – Polymerase Chain Reaction
- SRY** – Sex-Determining Region Y
- T** – Thymine
- TESE** – Testicular Sperm Extraction
- TG** – Thymine-Guanine
- TNF** – Tumor Necrosis Factor
- UV** – Ultraviolet

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение	8
2. Цел и задачи.....	10
2.1. Цел	10
2.2. Задачи	10
3. Материал и методи.....	11
3.1 Материал	11
3.1.1 Клиничен материал.....	11
3.1.2. Биологичен материал (проби)	13
3.2 Методи.....	14
3.2.1 Клинични методи.....	14
3.2.2 Лабораторни методи.....	14
3.2.3. Методи за медико-статистическа обработка на данните ..	20
4. Резултати.....	21
4.1. Характеристика на индивидите от изследваните групи	21
4.2 Резултати от проведените молекулярно-генетични изследвания.....	22
4.2.1 Молекулярно-генетични изследвания при участниците от мъжки пол.....	22
4.2.2 Молекулярно-генетични изследвания при участниците от женски пол.....	28
5. Обсъждане	32

5.1. Обсъждане на характеристиката на индивидите от изследваните групи.....	32
5.2.1.Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за Y микроделеции.....	33
5.2.2.Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за мутации и полиморфни варианти в CFTR гена.....	36
5.2.2.1. Полиморфни варианти в CFTR гена	36
5.2.2.2. Мутации в CFTR гена, самостоятелно или в комбинация с полиморфни варианти в него	39
5.3. Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания при участниците от женски пол.....	41
5.3.1.Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за 14 bp инсерция/делеция варианта в HLA-G.....	41
5.3.2.Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за – 308 GA варианта в TNF- алфа гена.....	44
6. Заключение	48
7. Изводи	50
8. Приноси на дисертационния труд	52
9. Справки за публикации към дисертационния труд и участия в конференции	53
10. Благодарности	54

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Инфертилитетът засяга около 15% от двойките, които се опитват да заченат (Sharlip, Jarow et al. 2002) и това прави репродуктивните неуспехи един от най-значимите социални проблеми в съвременната медицина. В световен мащаб общият брой на двойките, страдащи от инфертилитет, към 2010 г. се изчислява на 48,5 милиона (Mascarenhas, Flaxman et al. 2012). Тенденциите в България са сходни на световните и у нас се наблюдава трайно спадане на раждаемостта. Коефициентът на обща раждаемост за България през 2019г. е 8, 8‰, а през предходната 2018г. - 8, 9‰ (НСИ 2020). По данни на Евростат общо за Европейския съюз (ЕС) през 2018г. той е бил 9,7‰ (Eurostat 2020).

България е страна с отрицателен демографски прираст и тази тенденция е трайна, като води своето начало от 1980 г. Характеризира се чрез тоталния коефициент на плодовитост, който показва средния брой деца, които би родила една жена през целия си фертилен период (Албена Керековска 2014). През 1960 г. той е бил 2,31 (Eurostat 2020), докато през 2019 г. средният брой живородени деца от една жена в България е 1,58. Тази стойност е далеч под необходимата от 2,1, за да се осигури прираст на нацията (НСИ 2020).

В този смисъл инфертилитетът може да се разглежда като заболяване със социално значим характер. Съставна част от неговата етиология са спонтанните аборти – 15% от всички клинично доказани бременности завършват с неуспех поради загуба на плода (Ford and Schust 2009). Освен това около 12% от всички мъже страдат от инфертилитет, което прави този проблем често срещан и при двата пола (Lotti and Maggi 2018).

Различни фактори като хромозомни аберации, антифосфолипиден синдром, инфекции на половия тракт, вродени анатомични отклонения, както и ендокринни нарушения са сред основните причини за повтарящи се спонтанни аборти. Въпреки това около 50% от случаите на ранна загуба на бременността остават неизяснени в етиологично отношение (Lee and Silver 2000).

През последните години нараства интересът към проучване ролята на молекулярно-генетичните и имунологичните биомаркери за оплождането, протичането на бременността и нейното успешно завършване. Това води до въвеждане в практиката на нови имуно-генетични маркери при жени с повтарящи се спонтанни аборти – HLA-G и TNF – алфа, а при мъжете – молекулярно-генетично изследване за наличие на Y микроделеции, мутации и полиморфни варианти в CFTR гена, асоцииращи се с нарушена сперматогенеза.

Настоящият труд обобщава опита на Лабораторията по Медицинска генетика в УМБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна в областта на молекулярно-генетичните и имунологични биомаркери с цел проучване ефекта от тяхното влияние.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

Проучване на молекулярно-генетични и имунологични биомаркери за установяване тяхната роля в етиологията на инфертилитета за нуждите на медико-генетичното консултиране при семейства с репродуктивни проблеми.

2.2. Задачи

За да изпълнение на поставената цел си поставихме следните задачи:

1. Да се оптимизира и въведе в Лабораторията по Медицинска генетика молекулярно-генетичен подход за идентификация на потенциално рискови генни варианти и мутации, свързани с изясняване на причините за женски и мъжки инфертилитет.
2. Да се селектират групи български пациенти с клинична диагноза инфертилитет (мъже и жени) и потърси фамилна обремененост за репродуктивни нарушения и ролята ѝ като индикация за провеждане на молекулярно-генетичен анализ.
3. Да се определи генетичният статус по отношение някои значими гени при мъже с инфертилитет (Y микроделеции, патогенни и полиморфни варианти в CFTR гена), самостоятелно или в комбинация, и потърси сигнификантна връзка чрез сравнителен анализ с контролна група лица.
4. Да се определи генетичният статус по отношение някои потенциално значими имуногенетични гени/маркери при жени с инфертилитет (варианти в TNF – алфа гена и HLA-G гена), самостоятелно и в комбинация, и потърси сигнификантна връзка чрез сравнителен анализ с контролна група лица.
5. Да се обобщи ролята на изследваните имунологични и генетични биомаркери и изградят препоръки при използване на молекулярната диагностика в помощ на медико-генетичното консултиране на семейства с неизяснен инфертилитет.

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1 Материал

3.1.1 Клиничен материал

Проучването е проспективно и е проведено в Лаборатория по медицинска генетика на УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД – Варна в периода месец ноември 2018 г. до месец юни 2020 г.

В проучването са включени общо 170 лица (100 пациенти и 70 контролни лица), разделени в следните прицелни групи:

Изследване на генетични маркери във връзка с женски инфертилитет

- * 50 жени с два и повече спонтанни аборта;
- * 50 жени здрави контролни индивиди без анамнеза за спонтанни аборти и с поне две успешно завършили бременности (родено на термин дете);

Изследване на генетични маркери във връзка с мъжки инфертилитет

- * 50 мъже с концентрация на сперматозоидите в еякулата под 5×10^6 на милилитър;
- * 20 мъже здрави контролни индивиди с поне едно родено дете.

Пациентите са били насочени от акушер-гинеколог, андролог, личен лекар или са посетили Кабинета за генетично консултиране към Лабораторията по Медицинска генетика по повод репродуктивни проблеми.

Лицата, включени в проучването, са преобладаващо жители на област Варна. Част от пациентите са и от други области – Бургас, Шумен, Търговище, Разград, Добрич, Силистра.

3.1.1.1 Критерии за включване на лицата:

Всички включени в проучването участници са с неизяснен инфертилитет, като имат нормален мъжки или женски кариотип, без светлинномикроскопски доловими структурни или бройни аберации.

- * За мъжете участници
 - Възраст над 18 години
 - Липса на потомство
 - Предварително направена спермограма в лаборатория по избор на участника и брой на сперматозоидите в еякулата под $5 \times 10^6/\text{mL}$.
 - Липса на анатомични, ендокринологични и др. състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми
- * За жените участници с репродуктивни проблеми:
 - Възраст над 18 години
 - Липса на живородено дете
 - Наличие на поне два ранни спонтанни аборта преди 24 та гестационна седмица
 - Липса на анатомични, ендокринологични и др. състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми
- * За жените участници, които са здрави контролни индивиди:
 - Възраст над 18 години
 - Липса на анамнестични данни за преживени спонтанни аборти
 - Наличие на поне две успешни бременности и родено в термин дете

* За мъжете участници, които са здрави контролни индивиди:

- Възраст над 18 години
- Наличие на поне едно здраво родено дете

3.1.1.2 Критерии за изключване (за трите групи):

- Възраст под 18 години
- Наличие на анатомични, ендокринологични и др. състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми
- Участници, които откажат да подпишат информирано съгласие

Част от изследванията са проведени по проект № 18011 „Проучване на молекулярно-генетични фактори в CFTR гена при мъже с първичен инфертилитет“, финансиран от фонд „Наука“ (конкурсна сесия 2018) към Медицински университет Варна.

Проучването е одобрено от Комисията по етика на научните изследвания към Медицински университет Варна с протокол № 78/25.10.2018г. и протокол № 83/16.05.2019.

3.1.2. Биологичен материал (проби)

За целите на молекулярно генетичните изследвания беше изолирана ДНК от левкоцити от венозна кръв. За всеки участник в изследването е използвана затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. За изолирането на ДНК са използвани вакутейнери с EDTA, като количеството на взетата кръв е било между 3 и 10 ml. Изолирането на ДНК е извършвано не по-късно от 24 часа след вземане на пробата, а след това получената ДНК е съхранявана в разтворено състояние в TE буфер при -20 °C до изработване на пробите.

3.2 Методи

3.2.1 Клинични методи

При всички пациенти е проведена медико-генетично консултация, при което са снети анамнестични данни, фокусирани върху репродуктивни проблеми в семейството.

Снета е фамилна анамнеза, придружена с изграждане на родословно дърво, илюстриращо наличието или липсата в рода на първичен инфертилитет, спонтанни аборти, мъртвораждания, близкородствени бракове в рамките на три поколения назад.

Също така е разгледана медицинската документация от предишни хоспитализации, лабораторни и други изследвания.

3.2.2 Лабораторни методи

Следните лабораторни методи са използвани в настоящето проучване:

3.2.2.1. Пред-аналитична обработка на материала

1.1. Изолиране на ДНК

- * Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв чрез използване на колонки със силикатна мембрана
- * Изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв по солеви метод

За изолиране по метода на колонки със силициева мембрана е използван търговският кит Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. Изборът на метод е в зависимост от наличното количество кръв.

След приключване на изолирането на ДНК се пристъпва към измерване на неговата концентрация. Това се извършва чрез спектрофотометрично измерване на абсорбцията на светлина с дължина на вълната 260 nm чрез използване на абсорбционен спектрофотометър BioDrop®.

3.2.2.2 Аналитична обработка на материала

1. Real – time PCR молекулярно-генетичен анализ за наличие на микроделеции в Y хромозомата

За диагностиката на микроделеции в Y хромозомата е използван готов търговски кит AZF System Y-chromosome на Sacace Biotechnologies, Como, Italy, REF 01200-50 според протокола, описан от производителя.

В него са включени реактиви за провеждане на молекулярно-генетичен анализ за търсене на следните маркери върху дългото рамо на Y хромозомата: ZFX/Y, sY86(AZFa), sY127(AZFb), sY254(AZFc), SRY, sY84(AZFa), sY134(AZFb) и sY255(AZFc).

Методиката е полимеразна верижна реакция в реално време (RealTime PCR) с флуоресцентна детекция, проведена на апарат QuantStudio Dx (Applied Biosystems). Резултатите се интерпретират в зависимост от това дали генерираната по време на реакцията флуоресценция преминава определена прагова стойност (Ct метод). Анализът се счита за невалиден, ако се получат атипични криви или хоризонтална крива на амплификация, като тогава се налага повторение на реакцията. Даден резултат може да бъде приет за валиден само, ако няма отклонения в резултатите от контролните позитивни и негативни проби.

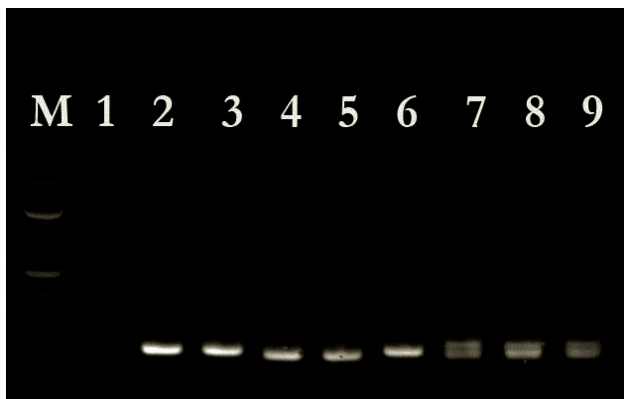
2. PCR метод за определяне наличието на 14 bp инсерция/делеция полиморфизъм в HLA-G гена

За диагностиката на 14 bp инсерция/делеция полиморфизъм в HLA-G са използвани следните **реактиви**:

- * олигонуклеотидни праймери (прав праймер: 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGCACC-3' и обратен праймер: 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3')
- * 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonia)
- * вода без нуклеази

Секвенциите на олигонуклеотидни праймери са избрани въз основа на описаните в литературата от Arjmand и сътрудници (Arjmand and Samadi 2016).

Приложен е конвенционален PCR метод за определяне наличието на 14 bp инсерция/делеция полиморфизъм в HLA-G гена. След оценка на получените амплификационни криви се пристъпва към хоризонтална гел-електрофореза за определяне генотипа на включените пациентски проби. Получените ДНК фрагменти се визуализират с UV светлина при 302 nm дължина на вълната чрез устройство BioDoc-It™ Imaging System Benchtop Variable Transilluminator (Фигура 4).



Фигура 4. Гел електрофореза за детекция на 14 bp инсерция/делеция полиморфизма. Бенд 1 – no template control, бендове 2,3,6 – хомозигот по 14 bp инсерция варианта, бендове 4,5 – хомозигот по 14 bp делеция варианта, бендове 7-9 – хетерозиготи по 14 bp инсерция/делеция варианта. М – 1kb DNA маркер

3. PCR метод за определяне наличието на – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена

За диагностиката на – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена са използвани следните **реактиви**:

- * олигонуклеотидни праймери (прави праймери:
5'-TAGGTTTTGAGGGGCAAGG- 3' и

TAGGTTTTGAGGGGCAAGA и обратен праймер:
5'-GTCTCGGTTTCTTCTCCATCG-3')

- * 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonia)
- * Вода без нуклеази

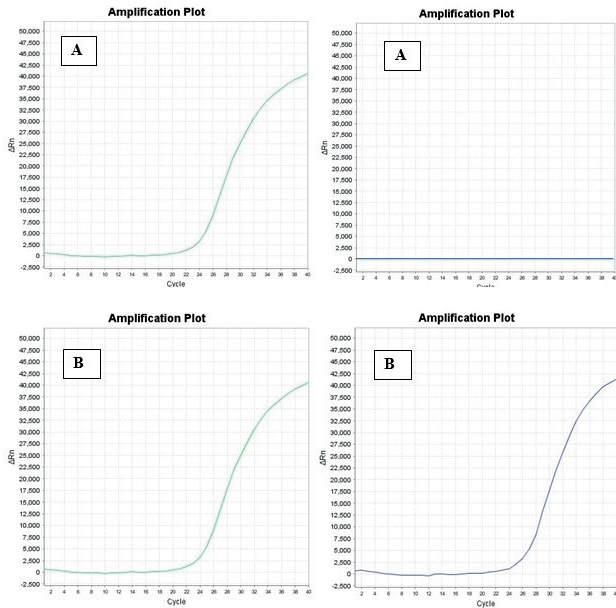
Секвенциите на олигонуклеотидни праймери са избрани въз основа на описаните в литературата от Zhu и сътрудници (Zhu, Chen et al. 2013).

Приложен е алел-специфичен PCR метод с намаляване температурата на хибридизация (Touchdown PCR). За анализ на получените амплификационни криви е използван софтуерът на апарата QuantStudio™ Dx, Applied Biosystems.

Пациентската проба се счита за хомозиготна по – 308 GG варианта в TNF – алфа гена, ако се наблюдава амплификационна линия само за алел G. В противен случай тя се приема за негативна за присъствие G варианта (Фигура 5).

Пациентската проба се счита за хомозиготна по – 308 AA варианта в TNF – алфа гена, ако се наблюдава амплификационна линия само за алел A. В противен случай тя се приема за негативна за присъствие A варианта (Фигура 5).

Пациентската проба се счита за хетерозиготна по – 308 GA варианта в TNF – алфа гена, ако се наблюдават две амплификационни криви, съответно за алели G и A (Фигура 5).



Фигура 5. Амплификационни криви за алели G (зелен цвят) и A (син цвят). A – хомозигот за вариант – 308 GG в TNF – алфа гена. B – хетерозигот по – 308 GA варианта в TNF – алфа гена

4. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди за търсене на мутации или полиморфни варианти в CFTR гена

При всички участници от групата на мъжете с нарушена сперматогенеза беше проведен молекулярно-генетичен анализ за търсене на следните мутации и варианти в CFTR гена: delF508, вариант 5T в интрон 8, TG повтори и R117H. При здравите контроли предварително беше проведен анализ за търсене на вариант 5T в интрон 8 на CFTR гена, като анализът беше продължен с търсене на мутациите delF508 и R117H в случаите на открито носителство на 5T варианта. Първата стъпка на анализа е провеждане на PCR реакция и амплифициране на желаните нуклеотидни последователности.

Беше приложен следният протокол:

- * Амплифициране на интересуващите ни нуклеотидни последователности чрез конвенционална PCR реакция

За провеждане на реакцията са използвани следните реактиви:

- 5× HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estonia)
- Олигонуклеотидни праймери
(5'-ATACAGTGTAAATGGATCATGGGC -3' и
5'-TGAAGAAGAGGCTGTCATCACC -3';
5'-AGGCAAGTGAATCCTGAGCG -3'
и 5'-TTGGGTAGTGTGAAGGGTTCAT -3';
5'-CCAAAGCAGTACAGCCTCTCTT -3'
и 5'-AAGGCCAAAAATGGCTGGGT -3')
- Вода без нуклеази

Секвенциите на олигонуклеотидни праймери са избрани въз основа на описаните в литературата от Jiang и сътрудници (Jiang, Jin et al. 2017). Олигонуклеотидните праймери са синтезирани от Sigma-Aldrich.

- * Пречистване на PCR продуктите с ExS-Pure™ Enzymatic PCR, NimaGen, Nijmegen, Netherlands purification kit според протокола, описан от производителя
- * Sanger реакция чрез използване на GenomeLab DTCS – Quick Start Master mix, SCIEX, USA според протокола, описан от производителя
- * Етанолова преципитация според протокола, описан от производителя
- * Автоматично секвениране чрез използване на GenomeLab GeXP™ Genetic Analysis System, Beckman Coulter, USA
- * Анализ на получените секвенции

3.2.3. Методи за медико-статистическа обработка на данните

Бяха приложени следните методи:

- * Графичен анализ
- * Обработка на количествени показатели
- * Непараметрични анализи
- * Оценка на риска

За статистическа обработка на получените от дисертационната работа данни са използвани софтуерните GraphPad Prism, версия 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) и SPSS, версия 23.00 (IBM Statistics, USA).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Характеристика на индивидите от изследваните групи

4.1.1 Наличие на фамилно предразположение към първичен инфертилитет, спонтанни аборти, мъртвораждания и близкородствени бракове

Наличие на фамилно предразположение към репродуктивни проблеми сред участниците мъже, изследвани за Y микроделеции, мутации и полиморфни варианти в CFTR гена

Не бяха съобщени случаи на фамилно предразположение към първичен инфертилитет, спонтанни аборти, мъртвораждания и близкородствени бракове в семействата на включените в изследването мъже с нарушена сперматогенеза.

Наличие на фамилно предразположение към репродуктивни проблеми сред жените с повтарящи се спонтанни аборти, изследвани за варианти в HLA-G и TNF-алфа гените

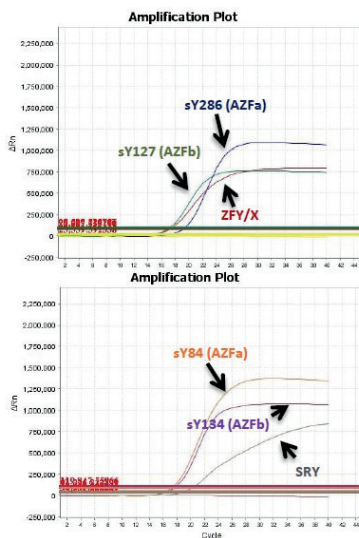
При оценката за наличие на фамилна обремененост за спонтанни аборти в рамките на три поколения назад беше установено, че при 4 (8,00%) от жените с репродуктивни проблеми има анамнеза за преживян един спонтанен аборт при техните майките. Не се съобщават случаи на първичен инфертилитет, мъртвораждания или близкородствени бракове в семействата на включените в изследването.

4.2 Резултати от проведените молекулярно-генетични изследвания

4.2.1 Молекулярно-генетични изследвания при участниците от мъжки пол

4.2.1.1 Молекулярно-генетичен анализ за наличие на микроделеции в Y хромозомата

След провеждане на молекулярно-генетичния анализ за търсене на микроделеции в Y хромозомата, беше установено, че 2 мъже (4,00%) са носители на делеция в AZFc региона на дългото рамо на Y хромозомата (Фигура 6). Единият от тях беше с азооспермия, а другият с тежка олигозооспермия и концентрация на сперматозоидите в еякулата $0,7 \times 10^6/\text{ml}$. Намерените делеции бяха нововъзникнали и не се установиха в мъжки родственици на индексните пациенти от първа степен. Останалите 48 мъже (96,00%) имаха нормален генотип.



Фигура 6. Амплификационни криви за оказаните локуси в Y хромозомата на пациент, диагностициран с AZFc делеция поради липсата на локусите sY254(AZFc) и sY255(AZFc).

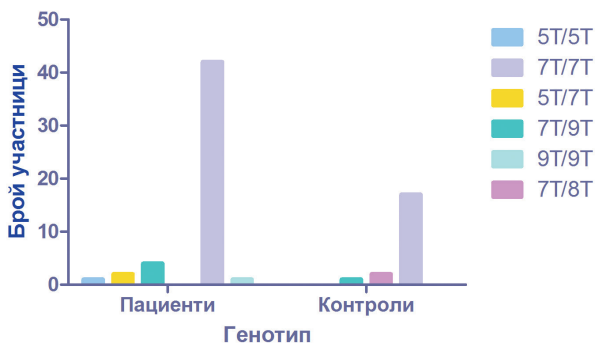
4.2.1.2 Молекулярно-генетичен анализ за търсене на мутации в CFTR гена

Разпределение според установения генотип на участниците, изследвани за 5T варианта в CFTR гена

След провеждане на молекулярно-генетичния анализ за търсене на полиморфни варианти в CFTR гена, беше установено, че един участник (2,00%) беше хомозигот за 5T/5T варианта, двама участници (4,00%) бяха хетерозиготи за 5T/7T варианта (Фигура 7). Пациентът, който беше хомозигот за 5T варианта, беше с тежка олигозооспермия. От другите двама, който бяха хетерозиготи по 5T варианта, единият участник беше с азооспермия, а другият – с тежка олигозооспермия.

От останалите – беше установено, че 42 мъже (84,00%) от групата на тези с нарушена сперматогенеза са хомозиготи за дивия вариант 7T, четирима (8,00%) – хетерозиготи за 7T/9T варианта и един (2,00%) – хомозигот за 9T/9T варианта (Фигура 7).

Разпределението за контролната група мъже е следното: 17 (85,00%) мъже са хомозиготи за за дивия вариант 7T, един (5,00%) е хетерозигот за 7T/9T варианта и двама (10,00%) – 7T/8T варианта. Не бяха установени носители на 5T варианта в хомо – или хетерозиготно състояние сред мъжете с доказана фертилност (Фигура 7).



Фигура 7. Разпределение на участниците, изследвани за 5T варианта в CFTR гена според установения генотип. 7T/7T – Хомозиготи по 7T полиморфизъм в CFTR гена; 5T/5T – Хомозиготи по 5T полиморфизъм в CFTR гена; 9T/9T – Хомозиготи по 9T полиморфизъм в CFTR гена; 5T/7T, 7T/9T, 7T/8T – хетерозиготи по за съответните алели на изследвания полиморфизъм в CFTR гена;

Разпределение според установения генотип на участниците, изследвани за delF 508 маркера в CFTR гена

При един мъж от пациентската група (2,00%) беше установено носителство на delF508 мутацията в хетерозиготно състояние в CFTR гена. Тя беше в комбинация със 7T варианта в CFTR гена.

Тъй като при нито един от участниците в контролната група не беше установено носителство на 5T варианта в CFTR гена, при тях не беше проведен молекулярно-генетичен анализ за търсене на delF508 мутацията, съгласно предварително приетия алгоритъм на работа.

Разпределение според установения генотип на участниците, изследвани за R117H маркера в CFTR гена

При нито един от участниците с нарушена сперматогенеза не беше установено носителство в хомо – или хетерозиготно състояние на мутацията R117H.

Тъй като при нито един от участниците в контролната група не беше установено носителство на 5T варианта в CFTR гена, при тях не беше проведен молекулярно-генетичен анализ за търсене на R117H мутацията, съгласно предварително приетия алгоритъм на работа.

Разпределение според установения генотип на участниците, изследвани за TG повтори в CFTR гена

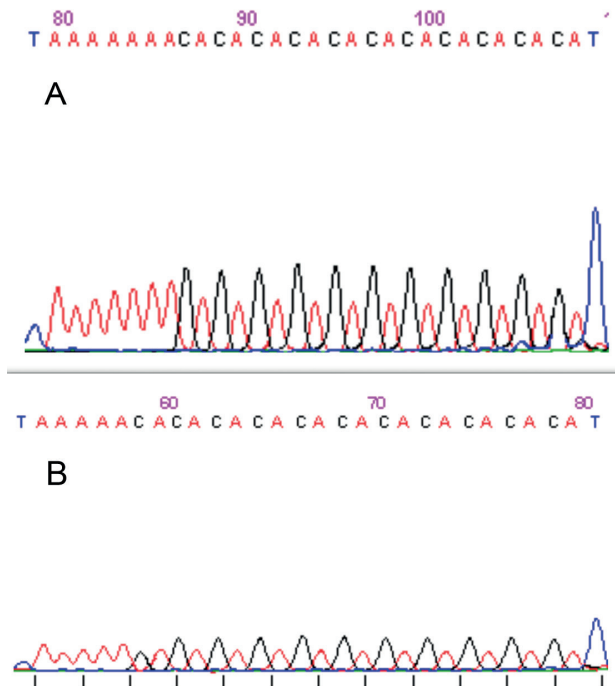
Като част от настоящия труд беше анализиран броят на TG повтори в CFTR гена. В групата на пациентите с нарушена сперматогенеза се наблюдаваше следното разпределение: 47 (94,0%) демонстрираха 11 TG повтора и трима (6,00%) – 10 TG повтора.

Всички мъже в контролната група бяха носители на 11 TG повтора в CFTR гена (Фигура 8).



Фигура 8. Разпределение на участниците, изследвани за TG повтори в CFTR гена според установения генотип.

На Фигура 9 са показани секвенциите с обратния праймер на индивиди, които са били изследвани за наличие на 5T варианта в CFTR гена, както и за TG повтори.



Фигура 9. А) Нуклеотидна секвенция с обратния праймер на индивид, който е хомозигот по 7T варианта и носител на 11 TG повтора; В) Нуклеотидна секвенция с обратния праймер на индивид, който е хомозигот по 5T варианта носител на 11 TG повтора.

Резултати от непараметрични методи при изследвания за полиморфни варианти в CFTR гена, приложени за сравняване на разпределението на установените генотипове между експерименталната и контролната група

За да се провери дали съществува разлика в разпределението на генотиповете между контролната и експерименталната група по отношение на установения генотип за IVS8(n)T варианта в CFTR гена беше приложен непараметричният тест One -Way ANOVA. Нулевата хипотеза е, че няма такава разлика. Изследваният полиморфизъм в CFTR гена показва статистически значима разлика ($p = 0,04$) и нулевата хипотеза е отхвърлена (Таблица 1).

Таблица 1. Сравнение между разпределението на установените генотипи за IVS8T варианта в CFTR гена в пациентската и контролната група чрез прилагане на теста One – Way ANOVA. * – статистически значима разлика

Изследвана група	Генотип 5T/5T	Генотип 5T/7T	Генотип 7T/7T	Генотип 7T/9T	Генотип 9T/9T	Генотип 7T/8T	Стойност на p
Мъже с нарушена сперматогенеза	1	2	42	4	1	0	p = 0,04*
Контролна група мъже	0	0	17	1	0	2	

Резултати от непараметрични методи, приложени за сравняване на разпределението на установените генотипове между експерименталната и контролната група, изследвани за броя на TG повторите в CFTR гена

С цел да се установи наличието на разлика в разпределението на броя TG повтори в CFTR гена между контролната и експерименталната група, беше приложен непараметричният тест на Fisher. Нулевата хипотеза е, че няма такава разлика. Не бе установена статистически значима разлика между двете групи – $p = 0,55$ и нулевата хипотеза се потвърди (Таблица 2).

Таблица 2. Сравнение между разпределението на TG повторите в CFTR гена в пациентската и контролната група чрез прилагане на теста на Fisher

Изследвана група	Брой мъже с 11 TG повтора	Брой мъже с 10 TG повтора	Стойност на p
Мъже с нарушена сперматогенеза	47	3	p = 0,55
Контролна група мъже	20	0	

Резултати от оценка на риска за възникване на нарушение в сперматогенезата при носители на 5T варианта в CFTR гена, сравнено с контролната група

Отношението на шансовете е равно на 3,73, изчислен чрез използване на алелните честоти за 5T и 7T алелите за двете изследвани групи. Този резултат обаче не е статистически значим – $p = 0,38$ ($p < 0,05$).

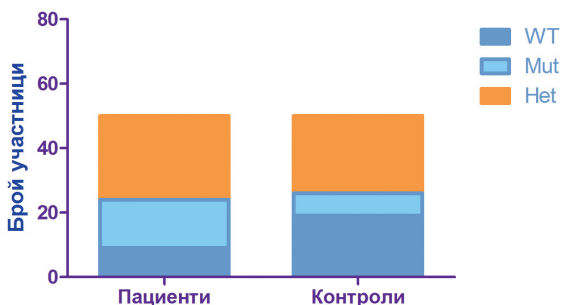
4.2.2 Молекулярно-генетични изследвания при участниците от женски пол

4.2.2.1 Молекулярно-генетичен анализ за определяне наличието на 14 bp инсерция/делеция полиморфизъм в HLA-G гена

Разпределение според установения генотип на участниците, изследвани за варианти в HLA-G гена

След провеждане на молекулярно-генетичния анализ за търсене на 14 bp инсерция/делеция полиморфизъм в HLA-G гена, беше установено, че 9 жени (18,00%) от групата на тези с репродуктивни проблеми са хомозиготи за дивия вариант (Del/Del), 15 (30,00%) участнички от тази група са хомозиготи за мутантния тип (Ins/Ins) и 26 (52,00%) са хетерозиготи (Del/Ins) (Фигура 10).

Разпределението за контролната група жени беше следното: 19 (38,00%) жени са хомозиготи за дивия вариант (Del/Del), 7 (14,00%) са хомозиготи за мутантния тип (Ins/Ins) и 24 (48,00%) участнички са хетерозиготи (Del/Ins) (Фигура 10).



Фигура 10. Разпределение на участниците, изследвани за 14 bp инсерция/делеция варианта в HLA-G гена според установения генотип. WT – Див тип, хомозиготи по 14 bp делеция полиморфизма; Mut – хомозиготи по 14 bp инсерция полиморфизма; Het – хетерозиготи по 14 bp инсерция/делеция полиморфизма.

Резултати от непараметрични методи при изследване за варианти в HLA-G гена за сравняване на разпределението на установените генотипове между експерименталната и контролната група жени

Беше приложен непараметричен тест – Хи-квадрат, за да се сравни разпределението на генотиповете между контролната и експерименталната група. Според нулевата хипотеза не съществуваша различия между двете групи. Изследваният полиморфизъм в HLA-G гена обаче показва статистически значима разлика ($p = 0,04$), Хи квадрат, степени на свобода: 6,56 между двете групи и нулевата хипотеза беше отхвърлена (Таблица 3).

*Таблица 3. Сравнение между разпределението на установените генотипи за 14 bp делеция/инсерция HLA-G полиморфизма в пациентската и контролната група чрез прилагане на Хи-квадрат тест, * – статистически значима разлика*

Изследвана група	Генотип Del/ Del	Генотип Ins/ Ins	Хетерозиготи Del/Ins	Стойност на p
Жени с репродуктивни проблеми	9	15	26	p = 0,04*
Контролна група жени	19	7	24	

Резултати от оценка на риска за възникване на спонтанен аборт при носителки на полиморфизми в HLA-G гена, сравнено с контролната група

Отношението на шансовете е равно на 4,52, $p = 0,02$ ($p < 0,05$). Освен това относителният риск за спонтанен аборт при носителки на инсерция варианта е 2,12 пъти по-висок, сравнено с носителки на делеция варианта.

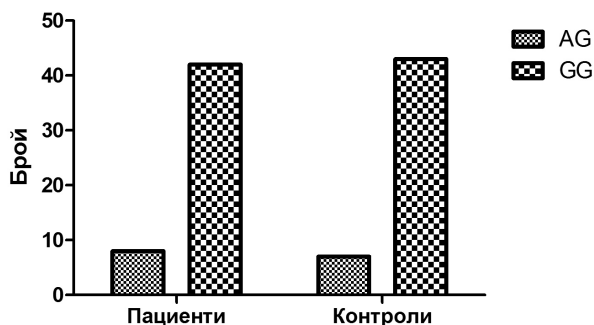
4.2.2.2. Молекулярно-генетичен анализ за определяне наличието на – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена

Разпределение според установения генотип на участниците, изследвани за варианти в TNF – алфа гена

След провеждане на молекулярно-генетичния анализ за търсене на – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена, беше установено, че 42 жени (84,00%) от групата на тези с репродуктивни проблеми са хомозиготи за дивия вариант GG, а останалите 8 (16,00%) участнички от тази група са хетерозиготи AG (Фигура 11).

Разпределението за контролната група жени е следното: 43 (86,00%) жени са хомозиготи за дивия вариант GG, а останалите 7 (14,00%) са хетерозиготи AG (Фигура 11).

И в двете групи не бяха установени хомозиготи по мутантния алел AA (Фигура 11).



Фигура 11. Разпределение на участниците, изследвани за – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена според установения генотип. GG – Див тип, хомозиготи по GG – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена; AG – хетерозиготи по – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена.

Резултати от непараметрични методи при изследване за варианти в TNF – алфа гена, приложени за сравняване на разпределението на установените генотипове между експерименталната и контролната група жени

За да се провери дали съществува разлика в разпределението на генотиповете между контролната и експерименталната група по отноше-

ние на установения генотип за – 308 GA полиморфизъм в TNF – алфа гена беше приложен непараметричният тест Хи – квадрат. Нулевата хипотеза е, че няма такава разлика. Изследваният полиморфизъм в TNF – alpha гена не показва статистически значима разлика ($p= 0,78$), Хи квадрат, степени на свобода: 0,08 между двете групи и нулевата хипотеза е потвърдена (Таблица 4).

Таблица 4. Сравнение между разпределението на установените генотипи за – 308 GA полиморфизма в TNF – алфа гена в пациентската и контролната група чрез прилагане на Хи-квадрат тест

Изследвана група	Генотип GG	Хетерозиготи AG	Стойност на p
Жени с репродуктивни проблеми	42	8	p = 0,78
Контролна група жени	43	7	

5. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Обсъждане на характеристиката на индивидите от изследваните групи

Съществуват голям брой фактори, които може да са отговорни за репродуктивните проблеми при мъжете и при жените, като сред най-честите са анатомични нарушения, ендокринологични заболявания, анамнестични данни за прекарани полово-предавани инфекции, като рисков фактор е и напредналата възраст (Deyhoul, Mohamaddoost et al. 2017). В настоящата работа всички включени пациенти бяха с неизяснен инфертилитет.

Други причини за репродуктивни проблеми са хромозомните аберации, като те имат водеща роля в етиологията на повтарящите се спонтанни аборти (ASRM 2012). По отношение на нарушената сперматогенеза, синдромът на Клайнфелтър може да доведе до азооспермия (Krausz, Hoefsloot et al. 2014). Всички включени в проучването участници имат нормален мъжки или женски кариотип, без светлинномикроскопски доловими структурни или бройни аберации и този вид етиология може да бъде изключен като причина за наблюдаваните репродуктивни проблеми при участниците.

В рамките на настоящия труд бяха събрани данни и за наличието на фамилно предразположение към първичен инфертилитет, спонтанни аборти, мъртвораждания и близкородствени бракове в семействата на включените в изследването участници. При пациентите с нарушена сперматогенеза не бяха съобщени такива данни. При жените, изследвани за варианти в HLA-G и TNF- α гените, беше установено, че при 4 (8,00%) от жените с репродуктивни проблеми има анамнеза за преживян един спонтанен аборт при техните майките. Ролята на фамилната обремененост за репродуктивни неуспехи е спорна, като има проучвания, които отричат този фактор (Adel, Farajallah et al. 2015), но и такива, които намират връзка между фамилната обремененост и риска за нарушен фертилитет (Woolner, Nagdeve et al. 2020). В настоящия труд фамилното предразположение към репродуктивна недостатъчност беше незначим фактор като индикация за насочване към молекулярно-генетичен анализ.

5.2.1. Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за Y микроделеции

Микроделециите в дългото рамо Y хромозомата, засягащи AZF региона, са втората най-честа причина за инфертилитет при мъжете след синдрома на Клайнфелтър (Krausz, Hoefsloot et al. 2014). Според препоръките на Европейската асоциация по андрология от 2014г. е уместно провеждането на молекулярно-генетичен анализ за липсващи участъци в Y хромозомата при мъже с азооспермия или тежка олигозооспермия и концентрация на сперматозоидите в еякулата под $5 \times 10^6/\text{ml}$ (Krausz, Hoefsloot et al. 2014). Участниците в настоящия труд бяха подбрани въз основа на тези критерии, като 46,00% от включените мъже бяха с азооспермия, а другите 54,00% бяха с тежка форма на олигозооспермия.

Съществуват разнопосочни данни за честота на Y микроделециите. В световен мащаб тя варира от 2% до 10%, като е възможно тази разлика да е причинена от различния дял на включените участници с азооспермия – колкото по-висок е той, толкова по-голям се очаква да е процентът на намерените мъже с делеция в AZF региона (Krausz, Rajpert-De Meys et al. 2001).

За българската популация Ковачева и съавтори изчисляват честотата на Y микроделециите на 5,5% след проведен молекулярно-генетичен анализ за търсене на тази мутация сред 109 мъже с инфертилитет. 63 от участниците са били с азооспермия, а останалите 46 – с тежка олигозооспермия (Kovacheva, Kotsev et al. 2018). Тази установена честота е близка и до намерената в настоящия труд – 4,00% от изследваните мъже са носители на Y микроделеции. Другите 96,00% от участниците имаха нормален генотип.

Друго българско проучване обаче открива значително по-висока честота на Y микроделециите. Линев и съавтори провеждат молекулярно-генетичен анализ за търсене на делеции в Y хромозомата сред 73 пациента с количествени и качествени отклонения на спермалните показатели. Те доказват наличието на микроделеция при 16 (21,92%) от участниците, като при 14 (87,5%) от мъжете е открита делеция в AZFc

региона (Александър Линев 2017). Трябва да се отбележи обаче, че е бил по-висок делът на включените пациенти с азооспермия – 39 (53,42%). За сравнение, в настоящето проучване 23 (46,00%) са с необструктивна азооспермия.

Честота на Y микроделециите варира в различните страни. При изследване на 125 мъже с азооспермия в Сърбия се установява носителство на Y микроделеции при 5 (4,00%) участника (Momcilo Ristanovic 2011). Тази честота съвпада с намерената в настоящия труд. За сравнение обаче при проучване разпределението на тази мутация сред 1226 инфертилни мъже с необструктивна азооспермия и тежка олигозооспермия от Южна Корея, е докладвана честота 10,93% (Kim, Kim et al. 2017). Друг авторски колектив от Китай съобщава за 10,80% засегнати мъже с Y микроделеция от общо 1333 изследвани мъже също с необструктивна азооспермия и тежка олигозооспермия (Fu, Xiong et al. 2012).

Този различен процент на установените микроделеции в Y хромозомата може да се дължи на популационно – генетичните особености на включените участници и по-точно на различните Y хаплогрупи. Възможно е определени хаплогрупи да са по-склонни към настъпване на Y микроделеции, отколкото други (Yang, Ma et al. 2008).

От трите региона в дългото рамо на Y хромозомата, AZFc е най-често делетираният. Обикновено са засегнати участъците b2/b4, b1/b3, b2/b3 и gr/gr, което води до липсата на DAZ гена, отговорен за нормалната сперматогенеза (Kuroda-Kawaguchi, Skaletsky et al. 2001, Skaletsky, Kuroda-Kawaguchi et al. 2003). В настоящия труд и при двамата пациенти, диагностицирани с Y микроделеция, беше установена липсата точно на маркерите за AZFc региона. Това се наблюдава и в други проучвания – 50% от намерените Y микроделеции са засягали AZFc участъка (Kovacheva, Kotsev et al. 2018).

Преобладаването на делециите в този регион може да се обясни с неговата специфична палиндромна организация. Предполага се, че именно тя е причина и за високата честота на наблюдаваните делеции в

дългото рамо на Y хромозомата (Kuroda-Kawaguchi, Skaletsky et al. 2001, Skaletsky, Kuroda-Kawaguchi et al. 2003).

Интерес представлява и произходът на Y микроделециите. И при двамата пациенти с установена микроделеция в дългото рамо на Y хромозомата беше проведен молекулярно-генетичен анализ на бащите им, но такава не беше открита. В нашия случай и двете открити микроделеции бяха с де ново произход.

Въпреки че за носителите на AZFc делеция е характерна азооспермията, са описани случаи и на носители на такава делеция с лека степен на олигозооспермия. Например, Ноорс и съавтори анализират връзката между различните видове Y микроделеции и степента на нарушение на сперматогенезата (Hopps, Mielnik et al. 2003). При 62% (26/42) от мъжете с изолирана AZFc делеция не са били открити сперматозоиди в еякулата. При останалите 38% (16/42) обаче такива са били намерени, като най-високата докладвана средна концентрация на сперматозоиди в еякулата е била $5,3 \times 10^6/\text{ml}$. Тя е била установена при 38 годишен участник след провеждане на три спермограми, като съответните резултатите са били 3, 5 и $8 \times 10^6/\text{ml}$. При единия от пациентите, диагностицирани с AZFc делеция в настоящето проучване, беше установена концентрация на сперматозоидите в еякулата $0,7 \times 10^6/\text{ml}$, общ брой сперматозоиди – 1,75 милиона. Другият установен пациент беше с азооспермия.

Въпреки описаните нарушения в сперматогенезата при мъже с AZFc делеции, се смята, че може да се приложи микрохирургично TESE, за да се добият сперматозоиди, които в следствие да се използват при ICSI процедура по оплождане (Krausz, Quintana-Murci et al. 2000). Независимо от това обаче, Yamaguchi и съавтори установяват, че процентът на оплождане е по-нисък при ICSI процедура, ако сперматозоидите са добити чрез микро TESE, в сравнение с добив директно от еякулата – $p < 0,001$ (Yamaguchi, Ishikawa et al. 2020). При единия от нашите пациенти с AZFc делеция беше извършено микро TESE с последващо ICSI оплождане два пъти, като единият път беше установена клинично бременност. Тя обаче завърши неуспешно в 8 гестационна седмица.

В такива случаи трябва да се има предвид и възможността за предаване на Y микроделециите в следващото поколение, като тук е особено важна ролята на медико-генетичното консултиране (Mau Kai, Juul et al. 2008).

В настоящето изследване и двамата открити пациенти бяха със значително по-ниска концентрация на сперматозоидите в еякулата, отколкото тази, препоръчана от Европейската асоциация по андрология – изследването да се провежда при пациенти с азооспермия и такива с концентрация на сперматозоидите по-малка от 5×10^6 (Krausz, Hoefsloot et al. 2014). Средната концентрация на сперматозоидите в еякулата за изследваната група също беше значително по-ниска от $5 \times 10^6/\text{ml}$ – $1,56 \times 10^6/\text{ml}$. Това се е наблюдавало и в други подобни проучвания от Англия и Турция и повдига въпроса дали прагът от $5 \times 10^6/\text{ml}$ сперматозоиди не трябва да се понижи (Johnson, Raheem et al. 2019, Gumus, Kati et al. 2020).

5.2.2. Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за мутации и полиморфни варианти в CFTR гена

5.2.2.1. Полиморфни варианти в CFTR гена

В последните години се увеличава броят на научните публикации за определени варианти в CFTR гена, които могат да доведат до нарушена фертилност при мъжете поради необструктивна азооспермия или тежка олигозооспермия (Schulz, Jakubiczka et al. 2006, Tamburino, Guglielmino et al. 2008, Gallati, Hess et al. 2009, Fesai, Kravchenko et al. 2010, Sharma, Mavuduru et al. 2014, Jiang, Jin et al. 2017). Резултатите от нашето проучване също подкрепят това схващане и илюстрират възможната връзка между наличието на определени варианти в CFTR гена и мъжкия инфертилитет поради намалена до липсваща концентрация на сперматозоидите в еякулата.

Обяснението за тази връзка може да се дължи на потенциалната ключова роля на CFTR гена за протичането на нормалната сперматогенеза. Преполога се, че той участва в изграждането на подходяща среда за ди-

ференциацията и матурацията на герминативните клетки. Затова както патогенни, така и полиморфни варианти в този ген могат да доведат до нарушена сперматогенеза и мъжки инфертилитет по принцип, а не само при пациенти с вродена двустранна липса на vas deferens (Yefimova, Bourmeyster et al. 2018).

Една такава промяна в CFTR гена е изследваният в настоящия труд 5T вариант, който се асоциира с нарушен сплайсинг и намалено количество на нормалния CFTR протеин (Chu, Trapnell et al. 1993). Поради това се предполага, че този полиморфизъм може да доведе до нарушена сперматогенеза, изрязваща се с необструктивна азооспермия или тежка олигозооспермия, докато 7T и 9T вариантите се считат за нормална находка (Yang, Ren et al. 2020). Резултатите от настоящия труд подкрепят възможната роля на 5T алелите в CFTR гена като фактор за нарушена сперматогенеза. 5T алелите бяха установени само при участници с нарушена сперматогенеза. След провеждане на молекулярно-генетичния анализ беше намерено, че един участник от тази група (2,00%) беше хомозигот за 5T/5T варианта, а двама мъже с нарушен фертилитет (4,00%) бяха хетерозиготи за 5T/7T варианта. Нито един от мъжете в контролната група не беше носител на 5T варианта в хомо- или хетерозиготно състояние. Приложените непараметрични методи при статистическата обработка на резултатите, показаха, че между разпределението на установените генотипове на експерименталната и контролната група съществува статистически значима разлика ($p = 0,04$).

5T вариантът е причина за наблюдаваните по-високи нива на иРНК, при които липсва екзон 9, сравнено с индивиди, при които се наблюдават 7T или 9T вариантите. Последните се считат за нормална находка. Поради наличието на 5T варианта и нарушеният сплайсинг се наблюдават по – ниски нива на CFTR протеина (Du, Li et al. 2014). 5T вариантът в CFTR гена може да се разглежда като причина за нарушената сперматогенеза при носителите му, като в тези случаи е възможно мъжкият инфертилитет да е единственият симптом и да липсват други белези, характерни за кистична фиброза (Ghorbel, Baklouti-Gargouri et al. 2012). В настоящия труд носителите на 5T варианта в хомо – или хетерози-

готно състояние нямаха клинични симптоми, характерни за кистичната фиброза. Като единствен признак на носителството на този 5T вариант може да се разглежда нарушеният фертилитет.

Проведените проучвания в различните страни показват различна честота на 5T полиморфизма, което е възможно да се дължи на различния етнически произход на включените участници. Yang и съавтори публикуват мета – анализ, основаващ се на информацията от дванадесет проучвания, свързани с 5T варианта в CFTR гена, проведени сред общо 1727 мъже с нарушен фертилитет и 2129 контроли (Yang, Ren et al. 2020). Авторите стигат до извода, че съществува връзка между необструктивната азооспермия и наличието на този полиморфизъм в CFTR гена, като това е по-силно изразено за участниците с европейски произход (отношение на шансовете – 2,81, 95%, интервал на доверителност 1,39–5,66), отколкото за тези от Азия и Африка (отношение на шансовете – 2,38, 95% интервал на доверителност 0,75–7,58).

В настоящия труд в пациентската група беше установено, че един участник (2,00%) беше хомозигот за 5T/5T варианта, а двама участници (4,00%) бяха хетерозиготи за 5T/7T. Честота на 5T варианта в България е 0,39% според проф. А.Савов (Савов 2011). Тя обаче е изчислена на база на изследвана селектирана група български пациенти с кистична фиброза, докато в настоящия труд популацията се състои от мъже с репродуктивни проблеми, което може да обясни установения по-висок процент.

Трябва да се има предвид, че фенотипният ефект на 5T варианта може да бъде повлиян и от дължината на разположените в близост TG повтори. Смята се, че когато техният брой е 12 или повече и са комбинирани с 5T вариант, се образуват по-големи количества иРНК, при които липсва екзон 9 (Currens, Lin et al. 1998). Това допълнително ще наруши функционирането на CFTR протеина и може да доведе до по-тежка клинична картина, сравнено със самостоятелно носителство на 5T варианта.

Сред пациентите с нарушена сперматогенеза и сред здравите контроли, включени в настоящия труд, обаче не беше установено носителство на 12 или повече TG динуклеотидни повтори и не беше намерена статис-

тически значима разлика между двете изследвани групи. Сред мнозинството от мъже с нарушен инфертилитет бяха открити 11 TG повтора, които се считат за нормална находка. Това отличава нашето проучване от друго, сходно, при което 5T вариантът винаги е бил в комбинация с 12 TG повтора и тази комбинация (от 5T вариант и 12 TG повтора) е била разглеждана като причина за нарушената сперматогенеза (Jiang, Jin et al. 2017). В подкрепа на данните от настоящата работа за изолирания ефект на 5T варианта е проучването на Yu и съавтори, които твърдят, че 5T вариантът самостоятелно също може да доведе до необструктивна азооспермия (Yu, Chen et al. 2011).

5.2.2.2 Мутации в CFTR гена, самостоятелно или в комбинация с полиморфни варианти в него

Съществуват и мутации в CFTR гена, които самостоятелно или в комбинация с 5T варианта могат да доведат до нарушен фертилитет – например delF508 и R117H (Jiang, Jin et al. 2017). При петдесетте участници от пациентската група в настоящето проучване беше проведен молекулярно-генетичен анализ за търсене на тези две мутации и беше установено, че един (2,00%) от мъжете с нарушена сперматогенеза беше хетерозиготен носител на delF508. Като се има предвид популационната честота на носителство на delF508 в нашата страна – 1/33 или 3,03% (Савов 2011), установената честота на хетерозиготния генотип в настоящата дисертация е близка до тази за българската популация. Интерес представляват данните от молекулярно-генетичен анализ за търсене на мутации в CFTR гена в прицелна група на клиничен контингент от 60 мъже с необструктивна азооспермия в Индия. Sharma и сътрудници установяват хетерозиготно състояние на delF508 в 5,8% от пациентите с необструктивна азооспермия, което е по-високо от установеното в настоящето проучване (Sharma, Mavuduru et al. 2014). Установеният от нас хетерозиготен генотип по delF508 не би могъл да се обвърже с етиологията на инфертилитета при конкретния пациент, още повече, че се съчетаваше със 7T нормален вариант.

По отношение на мутацията R117H ние не открихме нито един носител в хомо- или хетерозиготно състояние. Според Jiang и съавтори тази мутация не е характерна за мъжете с необструктивна азооспермия и се характеризира с ниска честота (между 0 и 2%) (Jiang, Jin et al. 2017). Въпреки че в настоящия дисертационен труд приблизително половината участници са с необструктивна азооспермия, а другите са с тежка форма на олигозооспермия, честота на R117H мутацията също беше равна на 0.

Възможно обяснение за липсата на носители на тази мутация, както и на по-ниския процент носителство на delF508, е, че е малка вероятността мутациите delF508 и R117H да са свързани с необструктивна азооспермия, по-вероятно е при носителите да се наблюдава двустранна липса на vas deferens (Heidari, Hojati et al. 2017, Jiang, Jin et al. 2017). Въпреки тези публикации, поради липсата на данни за българската популация относно сигнификатно значима връзка на delF508 и R117H с необструктивна азооспермия и тежка олигозооспермия, тези маркери бяха включени в настоящия труд. Такава асоциация не беше открита и в нашето проучване.

Всички участници бяха изследвани едновременно за наличие на Y микроделеции и на трите маркера в CFTR гена – delF508, R117H и 5T варианта. Не беше открито едновременно носителство на Y микроделеции и молекулярно-генетична промяна в нуклеотидната последователност на CFTR гена. Вероятността за такова обаче не е висока, тъй като ако се имат предвид индивидуалните честоти на носителство на мутации в CFTR гена и на микроделециите в Y хромозомата, Karpman и сътрудници изчисляват честотата на компаунд хетерозиготите и за двете нарушения едновременно на 0,12% за мъже с тежка олигозооспермия и 0,22% за мъжете с азооспермия (Karpman, Williams IV et al. 2007).

Едно ограничение на настоящето проучване е, че са изследвани само 3 възможни промени в CFTR гена при мъжете с нарушен фертилитет и при здравите контроли. Броят на възможните мутации в този ген обаче е повече от 2000 (Harutyunyan, Huang et al. 2018) и не е изключено да има и други мутации и полиморфни варианти в CFTR гена, които да водят нарушена сперматогенеза.

Именно поради тази причина би било удачно да се предлага изследване на нуклеотидната последователност на CFTR чрез таргетно секвениране на гена при пациентите с необструктивна азооспермия или тежка олигозооспермия.

Независимо от типа на проведения молекулярно-генетичен анализ, ролята на промените в CFTR гена като фактор за мъжки инфертилитет е безспорна. В настоящия дисертационен труд беше установена статистически значима разлика между разпределението на 5T варианта в пациентската и контролната група, което прави този полиморфизъм вероятна причина за нарушената сперматогенеза. Необходими са обаче още проучвания, които да потвърдят ролята на 5T варианта в CFTR гена като изолирана причина за нарушена сперматогенеза и мъжки инфертилитет.

5.3. Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания при участниците от женски пол

5.3.1. Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за 14 bp инсерция/делеция варианта в HLA-G

HLA-G молекулите участват в модулирането на имунния отговор на границата между майчиния организъм и плацентата и имат потенциална роля за успешния завършек на бременността (Ferreira, Meissner et al. 2017). Натрупват се все повече данни не само за имunosупресивните функции на HLA-G молекулите, но и за ролята им в осигуряването на достатъчен кръвоток към плода, което е ключово за нормалното протичане на бременността (Rajagopalan 2014).

Във връзка с това нараства научният интерес към наличието на варианти в HLA-G гена и начина по който те се отразят на неговите функции. Носителството на 14 bp инсерция варианта в HLA-G гена може да доведе до алтернативен сплайсинг и по-ниска концентрация на крайния продукт на гена в плазмата (Rizzo, Bortolotti et al. 2012, de Almeida, Muniz et al. 2018). Смята се, че занижените стойности на HLA-G са лош

прогностичен маркер и корелират с повишен риск за спонтанен аборт (Fuzzi, Rizzo et al. 2002, Ferreira, Meissner et al. 2017).

Според резултатите от настоящето проучване 14 bp инсерция варианта се наблюдава с по-висока честота в групата на жените с повтарящи се спонтанни аборти – 15 (30,00%) участнички от тази група са хомозиготи за мутантния алел (Ins/Ins), докато в контролната група жени техният брой е 7 (14,00%). Разпределението според открития генотип за варианта в HLA-G гена на участничките в двете групи показва статистически значима разлика ($p=0,04$), Хи квадрат, степени на свобода: 6,56, което потвърждава потенциалната роля на инсерция варианта в хомозиготно състояние като рисков фактор за неуспешния завършек на бременността.

Наблюдавано беше, че хомозиготните носителки на 14 bp инсерция варианта имат приблизително два пъти по-висок относителен риск за спонтанен аборт, сравнено с тези в контролната група. Тъй като стойността на този параметър е по-голяма от едно, изследваният инсерция полиморфизъм в HLA-G гена има потенциално значение за репродуктивно събитие или в конкретния случай може да увеличи риска от настъпване на спонтанен аборт. Това се подкрепя и от установената стойност на отношението на шансовете, което се изчислява на 4,52 и определя проучвания фактор като рисков за неуспешен завършек на бременността при хомозиготни носителки на инсерция вариант в HLA-G гена.

Тези резултати се потвърждават и от други научни групи, чиито проучвания показват по-висок процент на инсерция варианта в HLA-G гена сред изследвана група жени с повтарящи се спонтанни аборти, както в единична, така и в двойна доза (Amodio, Canti et al. 2016). Според друга статия общият брой на инсерция алелите е бил по-голям сред участничките с нарушена репродукция, но най-чести са били хетерозиготите в изследваната популация, а не хомозиготите по този полиморфизъм (Arjmand and Samadi 2016). В настоящия дисертационен труд сред жените с репродуктивни проблеми бяха открити 26 (52,00%) хетерозиготи (Del/Ins), а в контролната група жени – 24 (48,00%) участнички бяха хетерозиготи. Тези стойности са близки помежду си и затова според нас

хомозиготното състояние по инсерция варианта би могло да се обвърже с етиологията на повтарящите се спонтанни аборти, а не хетеризиготното такова.

Получените резултати от настоящето проучване бяха анализирани с помощта на непараметричния тест на Kruskal – Wallis с цел да се установи дали хомо- или хетеризиготното носителство на инсерция алела в HLA-G гена ще има ефект върху броя на спонтанните аборти. Стойността на p показателя обаче, изчислена на 0,13, отхвърля такава корелация. Не се наблюдава също така статистически значима разлика и при съпоставяне между две подгрупи пациенти с равни на два спонтанни аборта и повече от два. Беше приложен непараметричният тест Хи – квадрат за проверка на нулевата хипотеза, но стойността на p показателя беше равна на 0,05. Това потвърди нулевата хипотеза, че носителството на инсерция алела в хомо- или хетерозиготно състояние не води до увеличаване броя на спонтанните аборти. Ограничение на настоящето изследване е, че експерименталната група е сравнително малка и ако в извадката се включат повече участници, това може да доведе до установяване на статистически значима разлика, тъй като стойността на p е близка до сигнификантната.

Независимо от това, въз основа на резултатите от непараметричните статистически анализи може да се заключи, че носителството на 14 bp инсерция варианта в хомозиготно състояние, е потенциален рисков фактор за спонтанна загуба на бременността. В подкрепа на това твърдение са и резултатите в нашето проучване от приложения тест Хи-квадрат за търсене на статистически значима разлика между разпределението на генотиповете между пациентската и контролната група. Получената стойност на p показателя беше равна на 0,04, което потвърждава съществуването на сигнификантна разлика в разпределението на 14 bp инсерция/ делеция полиморфизма в HLA-G гена между двете групи участници – жени с повтарящи се спонтанни аборти и здрави контроли.

Публикуваните данни от няколко мета – анализи потвърждават възможната роля на 14 bp инсерция полиморфизма като фактор за настъпване на спонтанен аборт (Wang, Jiang et al. 2013, Fan, Li et al. 2014, de

Almeida, Muniz et al. 2018, Monti, Lupoli et al. 2019). И четирите статии осигуряват задълбочен анализ на ролята на 14 bp инсерция/делеция варианта в HLA-G гена, като потвърждават повишения риск от неуспешен завършек на бременността при носителство на инсерция алела. Интерес представляват и данните от мета-анализа на Monti и сътрудници, които установяват, че тази зависимост е особено силно изразена при жени от европейски произход, каквито са и изследваните в настоящето проучване (Monti, Lupoli et al. 2019).

Потенциалните ограничения за по-задълбочени изводи и на настоящия труд са свързани с броя на обхванатите жени с репродуктивни неудачи. Необходими са още проучвания сред по-голяма популация пациенти с повтарящи се спонтанни аборти, които да потвърдят възможния протективен ефект на делеция/делеция варианта в HLA-G гена.

5.3.2. Обсъждане на резултатите от молекулярно – генетичните изследвания за – 308 GA варианта в TNF-алфа гена

TNF- алфа генът и кодиращият от него туморнекротизиращ фактор имат ключова роля за функционирането на имунната система, за патогенезата на възпалителния отговор (Parameswaran and Patial 2010). Тъй като TNF – алфа е проинфламаторен цитокин, увеличените му нива по време на бременност биха могли да участват в патогенезата на настъпване на спонтанен аборт поради липса на толеранс от страна на майчината имунна система към плода (Sudhir, Badaruddoza et al. 2016). Това дава основание да се търсят различни полиморфни маркери при пациентките, страдащи от репродуктивни неуспехи, за да се обяснят повишените стойности на TNF – алфа в плазмата. Един от тези варианти е изследваният – 308 GA вариант в TNF- алфа гена.

Вариантът -308 AA в TNF- алфа гена, смятан за патологичен, има спорно значение за успешното износване на бременността. Потенциалната му роля се изразява в това, че хомозиготите по AA полиморфизма се очаква да имат по-висока транскрипционна активност и съответно увеличени нива на TNF – алфа (Dalziel, Gosby et al. 2002). Същото се

отнася и за хетерозиготите с генотип GA за -308 GA варианта (Jiménez-Morales, Velázquez-Cruz et al. 2009). Увеличени нива на TNF- алфа в серума са наблюдавани по-често при жени с повтарящи се спонтанни аборти, отколкото в здрави контроли (Li, Wang et al. 2017).

Резултатите от настоящето проучване показват, че ролята на -308 GA варианта в TNF – алфа гена като рисков фактор за спонтанен аборт е не-сигнификантна. Разпределението за двете групи изследвани участници е сходно. В пациентската група 84,00% са хомозиготи за дивия вариант GG, а 16,00% са хетерозиготи AG. В контролната група 86,00% от жените са хомозиготи за дивия вариант GG и 14,00% са хетерозиготи AG. Не бяха намерени хомозиготи по мутантния алел AA и в двете групи.

Не беше установена статистически значима разлика в разпределението на генотиповете между контролната и експерименталната група – $p = 0,78$, което отхвърля потенциалната роля на този полиморфизъм като рисков фактор за предразположение към СПА. Също така проведенят тест на Фишер за сравняване разпределението на дивите и мутантните алели в двете популации не показва сигнификантно различие между двете групи – $p = 1,00$.

Сходни на нашите резултати са публикувани и от други научни групи, които отричат ролята на – 308 GA варианта в TNF- алфа гена.

Проведено е проучване относно ролята на – 308 GA варианта в TNF-алфа гена сред 132 пациента от китайски произход и 152 здрави контроли – алелната честота на G алела в пациентската група е била 0,84, а в контролната – 0,89. За A алела те са били съответно 0,16 и 0,11. Авторите отхвърлят ролята на този полиморфизъм в етиологията на спонтанните аборти, $p > 0,05$ (Liu, Wang et al. 2010). Друга работна група на Ма и съавтори провеждат молекулярно-генетично изследване сред 775 пациентки с идиопатичен инфертилитет и 805 фертилни контроли (Ma, Zhang et al. 2017). Те не наблюдават статистически значима разлика в разпределението на полиморфизма между двете групи – $p = 0,30$ и също отричат ролята на – 308 GA варианта в TNF- алфа гена.

Влиянието на изследвания маркер е обобщавано и в мета – анализи на пациентки от различни държави. В един от тях са анализирани данните от 12 проучвания, включващи общо 1807 жени с репродуктивни проблеми и 2012 здрави контроли (Dong, Li et al. 2016). Не е открита връзка между този полиморфизъм и по-висок риск за настъпване на спонтанен аборт. Според авторите сигнификантна зависимост между -308 GA варианта в TNF – алфа гена и репродуктивните неуспехи е възможна единствено в някои азиатски популации, но са необходими още данни от по-големи проучвания. Всички участнички в настоящата работа са от български произход, което изключва такава възможност.

В настоящето проучване отношението на шансовете беше равно на 0,85 при 95% интервал на доверителност, а относителният риск беше изчислен, че е 0,93. Тъй като последната стойност е много близка до единица, може да се приеме, че рискът в двете групи е еднакъв и носителството на мутантен алел А в TNF- алфа гена няма връзка с предразположението към спонтанни аборти.

Необходимо е да се отбележи, че съществуват научни публикации, според които – 308 GA вариантът в TNF- алфа гена има възможна роля като предразполагащ фактор за настъпване на спонтанен аборт. Alkhouriji и съавтори установяват такава потенциална зависимост след изследване на 65 жени с неизяснен инфертилитет и 65 здрави доброволки, като проучването е проведено в Саудитска Арабия (Alkhouriji, Alhimaiddi et al. 2013). Статистически значима разлика за разпределението на генотиповете между двете групи е установена само за хомозиготите по дивия тип GG, $p = 0,01$ и според авторите -380 GA вариантът оказва влияние върху риска от спонтанен аборт. Сред жените хомозиготи по мутантния тип AA и за хетерозиготите GA, сравнени със здравите контроли, статистическа значима разлика не е открита. Възможно ограничение на проучването е разнородната възрастова структура на експерименталната група, тъй като са участвали жени на възраст от 15 до 45 години (Alkhouriji, Alhimaiddi et al. 2013). За сравнение, в настоящата дисертация възрастовото разпределение на участниците е по-хомогенно: средната възраст на пациентската група е 35,00 години, а на контролна група здрави лица –

33,00 години. Минималните и максималните възрасти на участничките в двете изследвани от нас групи са близки – за жените с репродуктивни проблеми минималната възраст е 23 години, а максималната – 44 години. При здравите контроли минимална и максимална възраст са съответно 25 и 41 години.

В настоящето проучване потърсихме възможен кумулативен ефект от едновременното носителство на мутатни алели по двата разглеждани полиморфни маркера – 14 bp инсерция/делеция варианта в HLA-G гена и – 308 GA варианта в TNF- алфа гена. Не се установи статистически значима разлика, $p = 1,00$ и не беше намерен допълнителен риск, ако една жена е носителка едновременно на два мутантни алела за изследваните полиморфни маркери. Вероятно ограничение е малкият брой на участниците, които бяха носители на полиморфни варианти и в двата разглеждани гена.

Въпреки че настоящето проучване не откри наличие на статистически значима зависимост между – 308 GA варианта в TNF- алфа гена и риска от спонтанни аборти, имунологичните и имуногенетични фактори имат ключова роля за нормалния завършек на бременността. Възможно е да съществуват други полиморфизми в TNF- алфа гена, които да влияят на нивата на TNF – алфа в плазмата и да предразполагат към настъпване на спонтанни аборти.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфертилитетът е универсален, социално значим проблем с огромна клинична и генетична хетерогенност. Често пъти е невъзможно да бъде установена причината за липсата на бременност или за настъпването на повтарящи се спонтанни загуби на плода. Използваните в настоящия дисертационен труд молекулярно-генетични и имунологични биомаркери дават възможност за по-пълноценна оценка на причините за инфертилитет.

Мъжкият инфертилитет може да има разнообразна етиология, но генетичните причини са сред водещите етиологични фактори при случаите с нарушена сперматогенеза, особено при азооспермия и тежка олигозооспермия. Установените делеции в AZFc региона на Y хромозомата при двама от пациентите разкриха причините за ненастъпването на бременност при тези двойки. Постигната генетична диагноза на нарушената сперматогенеза даде възможност за съставяне на индивидуален план за репродуктивно поведение. Това поставя въпроса за необходимостта от скринингово изследване за наличие на делеции в дългото рамо на Y хромозомата при всички мъже с нарушена сперматогенеза, главно тези с азооспермия и тежка олигозооспермия, особено под $1 \times 10^6/\text{ml}$. По този начин на семействата може да се спести дългият процес на търсене на вярната диагноза, ако още в началото бъде установена такава делеция.

Отдавна е известна ролята на мутациите в CFTR гена като причина за мъжки инфертилитет. Те обаче се свързват основно с вродена двустранна липса на vas deferens. Това схващане се променя в последните години, като все повече изследователски групи доказват ролята на различни мутации и полиморфни варианти в CFTR гена и при мъже с необструктивна азооспермия или тежка олигозооспермия. Ние открихме само един пациент в хетерозиготно състояние с мутация del F508, което не можем да обвържем с клиничната диагноза – олигозооспермия. По отношение на полиморфни варианти в този ген, резултатите от настоящето проучване подкрепят ролята на 5T варианта в CFTR гена като фактор за нарушена сперматогенеза и намалена концентрация на спер-

матозоидите в еякулата. Необходимо е обаче тези изводи да бъдат потвърдени и след определяне на честотата на този полиморфизъм в по-голяма група от участници и здрави контроли. Въпреки че се предполага, че дължината на разположените в близост TG повтори също може да оказва влияние, в представения дисертационен труд не беше установена такава зависимост. Резултатите от настоящата работа представят неоспоримата полза от провеждането на молекулярно-генетичен анализ за търсене на промени в CFTR гена при всички мъже с необструктивна азооспермия и тежка олигозооспермия.

Повтарящите се спонтанни аборти може да са резултат от различни етиологични фактори. Резултатите от настоящето проучване показват, че 14 bp инсерция вариантът в HLA-G гена в хомозиготен генотип се асоциира с по-висок риск за прекъсване на бременността при жени. Тъй като съществуват и други причини, които увеличават вероятността за неуспешен изход от бременността, е необходимо тези резултати по отношение ролята на 14 bp инсерция варианта да бъдат верифицирани при изследване на по-голяма група пациенти и контролни лица. Това би могло да изясни защитната роля на хомозиготното носителството на делеция варианта в HLA-G гена.

Не беше установена статистически значима зависимост между носителството на – 308 GA полиморфизма в TNF – алфа гена и риска за настъпване на спонтанен аборт в изследваната популация жени, което подлага на съмнение използването на този молекулярно-генетичен маркер в лабораторния алгоритъм на клиничната практика.

Включването на изследваните молекулярно-генетични и имунологични маркери 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-обстоятелствен анализ на причините за повтарящи се спонтанни аборти и нарушена сперматогенеза.

7. ИЗВОДИ

1. Успешно бяха въведени молекулярно-генетични методи за идентификация на потенциално рискови генни варианти и мутации в Y хромозомата и CFTR гена със сигнификантно значение за мъжкия инфертилитет и на полиморфни варианти в HLA-G и TNF-алфа гените при женски инфертилитет. .

2. Селектирани бяха групи пациенти с нарушен инфертилитет при мъже и при жени; сам по себе си факторът фамилно предразположение към репродуктивна недостатъчност беше незначим като индикация за насочване към молекулярно-генетичен анализ.

3. Въз основа на установените генотипи при мъже с инфертилитет по отношение на Y микроделеции, патогенни и полиморфни варианти в CFTR гена:

- * Потвърди се ролята на микроделециите в AZFc региона на дългото рамо на Y хромозомата като причина за намалена концентрация на сперматозоиди в еякулата при носителите им.
- * Потвърди се потенциалната роля на 5T варианта в CFTR гена като причина за нарушената сперматогенеза при носителите му.
- * Не се установи статистически значима зависимост между носителството на определен брой TG повтори в CFTR гена и нарушената сперматогенеза при носителите им.
- * Беше намерена сигнификантна разлика в разпределението на генотиповете между контролната и експерименталната група по отношение на установения генотип за IVS8(n)T варианта в CFTR гена. Не бяха открити хомо-или хетерозиготни носители на мутацията R117H.

4. Въз основа на определения генетичен статус по отношение варианти в TNF – алфа гена и HLA-G гена при жени с инфертилитет се:

- * установи, че 14bp инсерция вариантът в HLA-G гена се асоциира с повишен риск за настъпване на спонтанен аборт със статистически значима разлика в разпределението на генотиповете между пациентската и контролната и група жени.
- * установи липса на зависимост между –308 GA полиморфизма в TNF – алфа гена и риска за настъпване на спонтанен аборт.

5. Комплексната оценка, изградена на базата на избраните молекулярно-генетични биомаркери при пациентите с инфертилитет от мъжки пол, осигурява по-добра възможност за оценка на причините за нарушената сперматогенеза и подпомага избора на по-адекватен репродуктивен подход в семейството. 14bp инсерция/делеция вариантът в HLA-G гена, който беше избран и анализиран при участничките от женски пол с повтарящи се спонтанни аборти, би могъл да се приложи рутинно в клиничната практика поради намереното му сигнификантно значение. -308 GA вариантът в TNF – алфа гена би могъл да се изключи като рисков фактор за предразположение към спонтанни аборти поради несигнификантна значимост в нашето проучване.

8. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер:

1. За пръв път сред български пациенти с мъжки инфертилитет беше изследван 5T вариантът в CFTR гена, който има потенциална роля като етиологичен фактор за нарушената сперматогенеза при носителите му.

2. За пръв път в български пациенти жени с инфертилитет бяха изследвани полиморфни варианти в гени, участващи в регулацията на имунната система с потенциална роля в репродуктивния изход от бременността; в частност 14 bp инсерция вариантът в HLA-G гена се асоциира с по-висок риск за настъпване на спонтанен аборт при носителките; – 308 GA полиморфизмът в TNF – алфа гена не се свързва с по-голям риск за настъпване на прекъсване на бременността.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдено е значението на Y микроделециите като причина за намалена концентрация на сперматозоиди в еякулата при носителите им.

2. Потвърдена е необходимостта от оценка на молекулярно – генетичните мутации и полиморфни варианти в CFTR гена при мъже с нарушена сперматогенеза.

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. На специалисти в областта на инфертилитета се препоръчва: при мъже с нарушена сперматогенеза (необструктивна азооспермия и тежка олигозооспермия под $1 \times 10^6/ml$) молекулярно-генетично изследване за Y микроделеция и за полиморфни варианти (5T варианта) и мутации в CFTR гена; при жени с повтарящи се спонтанни аборти – изследване на 14bp инсерция/делеция варианта в HLA-G гена като имунологичен биомаркер със сигнификантно значение за повтарящи се спонтанни аборти.

9. СПРАВКИ ЗА ПУБЛИКАЦИИ КЪМ ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД И УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ

1. Публикации в научни списания, свързани с темата на дисертационния труд:

- * Mariya Levkova, Trifon Chervenkov, Lyudmila Angelova , Y chromosome microdeletions as a cause for male infertility. Biomedical Reviews. 29 (2018): 57-63.
- * Mariya Levkova, Trifon Chervenkov, Mari Hachmeriyan, Lyudmila Angelova, Association between polymorphic markers human leucocyte antigen-G and tumour necrosis factor alpha and susceptibility to recurrent miscarriages among Bulgarian women. Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology. 17.1 (2020): 34-39.
- * Мария Левкова, Трифон Червенков, Мари Хачмериян, Людмила Ангелова, IVS8(n)-Т варианта в CFTR гена като фактор за нарушена сперматогенеза. Варненски медицински форум (Varna Medical Forum) Vol. 9. No. 2. (2020): 47- 51.

2. Научни прояви, свързани с темата на дисертационния труд:

- * Мария Левкова, Трифон Червенков, Мари Хачмериян, Людмила Ангелова, Y микроделециите като причина за нарушена сперматогенеза, XI Национална конференция за редки болести и лекарства сираци, Редки болести и лекарства сираци, бр.2/2020, Supplement, стр.6
- * Mariya Levkova, Trifon Chervenkov, Mari Hachmeriyan, Lyudmila Angelova, IVS8-(n)T variant in the CFTR gene as a reason for a low sperm count, Online sessions of the Jubilee 30-th Annual Assembly of IMAB, Section: Medicine, 19 October 2020, Abstract book, p.8

10. БЛАГОДАРНОСТИ

Във връзка с разработването на настоящия дисертационен труд, авторът изказва благодарности:

- * на своите научни ръководители – проф. д-р Людмила Ангелова и доц. д-р Трифон Червенков за насоките в практическата работа и помощта при написването на дисертационния труд;
- * на членовете на Катедрата по Медицинска генетика и на персонала на Лабораторията по Медицинска генетика за оказаната подкрепа и съдействие;
- * на всички пациенти, които се съгласиха да участват в проведените молекулярно-генетични изследвания.