

РЕЦЕНЗИЯ

от Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм
Ръководител на Лаборатория по Геномна диагностика, ЦММ, МУ-София
Професор към Катедра по Медицинска генетика, МФ, МУ-София

на Дисертационния труд на Мария Кирякова Цветкова на тема
**ЦИТОГЕНЕТИЧНИ НАХОДКИ ПРИ ПАЦИЕНТИ С РЕПРОДУКТИВНА
НЕДОСТАТЪЧНОСТ**

представен за присъждане на Образователната и Научна степен „Доктор“

Докторска програма: Генетика

Катедра: „Медицинска генетика“, Медицински университет - Варна

Област на висшето образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научен ръководител: Проф. д-р Людмила Ангелова, дм

Изборът за рецензент е съгласно Заповед №Р-109-84 от 11.03.2021 г. на Проф. д-р Валентин Игнатов, дм - Ректор на Медицински Университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна. Рецензията е съобразена с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за неговото приложение, както и с Правилника за развитие на академичния състав в Медицински Университет - Варна.

1. Кратко представяне на докторанта

Мария Кирякова Цветкова е родена през 1975 г. в гр. Варна. Завършва магистратура по Генетика към СУ „Св. Климент Охридски“ – София през 2006 г. През 2004 г. е назначена като биолог-специалист към Лаборатория по Медицинска генетика на УМБАЛ „Св. Марина“-Варна и към Катедра „Медицинска генетика“-МУ Варна с ръководител Проф. д-р Людмила Ангелова, д.м. Член е на Българското дружество по генетика и геномика на човека и на Европейското дружество по Човешка генетика.

2. Структура на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа общо 139 страници, онагледен е с 48 фигури и 24 таблици. Библиографията включва 204 заглавия, от които 9 на български език и 195 на латиница. Има и 2 приложения – Приложение 1 (Информирано съгласие за цитогенетично и молекулярно-цитогенетично изследване) и Приложение 2 (Представяне

на някои от случаите с балансиран преустройство установени в настоящия дисертационен труд). Дисертационният труд е структуриран в рамките на общоприетите стандарти и включва следните основни раздели: Въведение – 2 стр.; Литературен обзор – 33 стр.; Работна хипотеза (Цел и Задачи) – 2 стр.; Материали и методи – 16 стр.; Резултати и обсъждане – 57 стр.; Заключение – 2 стр.; Изводи – 2 стр. и Приноси – 1 стр. В началото е представено Съдържание и Списък на използваните съкращения.

3. Актуалност на избраната тема

Репродуктивната генетика се превърна в неделима част от модерната медицина и днес играе ключова роля за репродуктивното здраве и семейното планиране. Според СЗО между 10 и 15% от двойките в глобален план имат проблеми с репродукцията. У нас няма ясна статистика, но над 300 хиляди двойки имат затруднения по неофициални данни. В много страни, вкл. и България, непрекъснато нараства пропорцията на раждания след асистиран репродуктивни техники, като вече надхвърля 5% от общия брой. Голямото значение на репродуктивната медицина за обществото и решаването на демографските проблеми превърна тази област на медицината в една от най-силно развиващите се научни области с непрестанно усъвършенстване на технологиите и нови достижения. Ключова роля за решаване на репродуктивните проблеми има точната диагностика на тяхната причина. Известни са редица причини за инфертилитета, като етиологичната роля на генетичните дефекти се оценява на около 50% - това включва хромозомни аберации, моногенни дефекти и полигенна обусловеност. Голяма част от тях са все още ненапълно изяснени.

Цитогенетичните изследвания имат голямо значение в областта на репродуктивната медицина, като дават представа за честотата на хромозомните аномалии, които се появяват по време на гаметогенезата, ембрионалното развитие и бременността. Установяването на хромозомните нарушения позволява поставянето на генетична диагноза за инфертилитета, определянето на риска и прогнозата при семейството, както и вземането на най-подходящото решение за клинично поведение и терапия.

В този смисъл темата, посветена на **цитогенетични находки при пациенти с репродуктивна недостатъчност** продължава да бъде актуална, важна и с голямо научно-приложно значение.

4. Представяне на дисертационния труд

Литературният обзор показва много добро познаване на проблемите с фертилността – дефинирани са основните понятия според водещите международни научни и здравни организации, разгледана е епидемиологията и честотата на фертилните нарушения

според изявата на специфични фенотипове. Значително внимание е отделено за етиологията на репродуктивните нарушения. Задълбочено и фокусирано се разглеждат конвенционалните цитогенетични изследвания при пациенти, засегнати от инфертилитет и рисковете, свързани с наличието на аберации. Направен е обзор на установените клиничко-генетични корелации при различните фенотипни форми на репродуктивни нарушения – инфертилитет или липса на забременяване, повтарящи се спонтанни аборти, семейства с комбинирани нарушения. Голяма част от литературния обзор е посветена на хромозомния полиморфизъм и неговото клинично значение, като поотделно подробно са разгледани основните групи хромозомен полиморфизъм – по хромозома 9, по У-хромозомата, по акроцентричните хромозоми и по хромозоми 1 и 16. Намирам тази част от дисертацията за особено актуална, тъй като дълги години се считаше, че хромозомният полиморфизъм е вариант на нормата без съществено клинично значение, но в последните години се появяват все повече проучвания, които акцентуират потенциалния ефект на хромозомните полиморфизми върху репродуктивния капацитет. В последната част на обзора са разгледани субтеломерните преустройства, методите за тяхната детекция и потенциалното им значение при пациенти с репродуктивни нарушения. Работната хипотеза предполага, че 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.

Общото ми впечатление е, че обзорът е написан задълбочено и показва много добро познаване на ролята на хромозомните нарушения в репродукцията, методите за тяхното установяване и клиничното им приложение.

На фона на добре представения обзор, логично е формулирана **ЦЕЛТА** на дисертационния труд, а именно - 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 ННР).

Задачите са 5 на брой и правилно отразяват постигането на целта в няколко посоки – селектиране на репродуктивни групи, комплексна оценка на аберациите по групи, характеристика на клинично значимите бройни и структурни аберации по групи, оценка на хромозомния полиморфизъм и разкриване на субтеломерни хромозомни аберации.

В главата **Материали и Методи** са описани броя на изследваните пациенти, критериите за подбор и използваните методи. В проучването са включени 1733 пациенти с репродуктивни проблеми за период от 16 години, което прави средно по 108 пациенти на година. Пациентите са разпределени в 3 основни групи: Двойки с инфертилитет (стерилитет) с/ без неуспешни АРТ процедури; Двойки с два и повече спонтанни аборти; Двойки с комбинирана репродуктивна история и фамилна обремененост (СПА в комбинация с мъртво раждане, прекъсната бременност по медицински показания, родено дете с аномалии и/ или УМИ). Извършен е анализ на медицинските досиета на пациентите, родословен анализ и конвенционален цитогенетичен анализ при всички пациенти. Флуоресцентна *in situ* хибридизация за субтеломерни хромозомни участъци е била приложена при 20 пациенти без патологични отклонения от конвенционалния цитогенетичен анализ.

Методите са описани подробно и разбираемо, така че да бъдат възпроизведени. Описани са проблемите, свързани с тъканно култивиране и подхода за действие при незадоволителни резултати, което показва задълбочено познаване на техниките. Субтеломерният анализ е направен с кит Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit (CE), който включва 41 субтеломерни сонди, специфични за р- 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.

В раздел **Резултати и Обсъждане** докторантката прави подробно описание на всички установени находки при изследваните пациенти, както и успоредно обсъждане на резултатите във връзка с литературните данни. Разделът е съставен от три подраздели, като вторият е най-голям.

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

В този подраздел е направен анализ на пациентите по посочените демографски характеристики и разпределение в отделните групи. Направен е опит за установяване на трендови модел в годините, което по-скоро има спекулативен характер, тъй като броят на посещенията в една цитогенетична лаборатория не е пряко свързан с броя на пациентите, засегнати от репродуктивни проблеми, а е по-скоро функция на осведоменост и насочване от клиницистите. От разпределението по групи се вижда, че най-много са пациентите (както общо, така и по пол) от група II (с 2 и повече спонтанни аборти) – 743, следвани от тези в група I (липса на бременности) – 589 и група III (комбинирана репродуктивна история) – 401. Втората група е разделена на подгрупи,

като най-много в нея са пациентите с 2 СА, следвани от тези с 3, 4 и 5 и повече СА. Общо при всички пациенти са разкрити 37 бройни хромозомни нарушения (2.1%), 70 структурни хромозомни аберации (4%), 3 комбинирани нарушения (0.1%) и 173 хромозомни полиморфизми (10%).

2) Конвенционални цитогенетични изследвания

При всички 1733 пациенти е проведен цитогенетичен анализ на лимфоцити от периферна 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%). От 110-те пациенти с патологичен резултат, 45 са от група III (41%), 33 са от група I (30%) и 32 са от група II (29%). Според докладваните резултати жените имат сигнификантно по-висок процент на аберации във всички групи. Допускам, че роля за този резултат има отново клиничното насочване, тъй като в настоящата дисертация не се коментират детайлно параметрите на спермограмата при мъжете от двойките, и в извадката не са попаднали много мъже с нарушения в спермограмата и това дава по-ниския процент на аберации при тях.

Хромозомен полиморфизъм е установен в 10% от анализираниите пациенти, като при мъжете е статистически значимо два пъти по-често срещан (6.52%) в сравнение с този при жените (3.46%).

Бройни хромозомни нарушения са открити само по половите хромозоми в 37 пациента, като при 3 пациенти (само мъже от група I) са в пълна форма, а при 34 пациенти са в мозаична форма – статистически значимо по-често при жени. 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 са намерени само патологични клетъчни линии. Не се е установила статистически значима зависимост между груповата принадлежност на пациентите и откритите бройни нарушения, както общо, така и по пол. Бройните хромозомни нарушения са почти два пъти по-рядко срещани от структурните според резултатите на докторантката.

Структурни хромозомни преустройства са открити в 70 пациенти от изследваната извадка - балансирани преустройства в пълна форма при 62 лица (51 транслокации, 10 инверсии и 1 изохромозома) и в мозаична форма при 8 лица. Делът на транслокациите

от общия брой намерени аберации е 46.3%, като има статистически значимо по-висока честота на транслокациите спрямо общата популация – 2.9% спрямо 0.08-0.3%. От представените Таблицы на реципрочните транслокации прави впечатление, че 4 са установявани в повече от 1 член на едно и също семейство – общо в 11 индивиди. Една от най-известните рекурентни транслокации $t(11;22)(q24;q12.3)$ се среща при 4 индивиди, за които не става ясно имат ли родствена връзка и, ако не, това означава, че тази транслокация е най-честата и при български пациенти с РН. При жените реципрочните транслокации се срещат само в групи II и III, докато при мъжете засягат и такива от група I. Половината от намерените Робертсонови транслокации обхващат хромозомите 13 и 14. Отново женският пол е с по-голям брой намерени реципрочни и Робертсонови транслокации. Дискутирано е, че такива транслокации засягат силно фертилността при мъжете и водят до стерилитет.

Втората по честота структурна аберация намерена в пациенти с РН в проучването е инверсията, установена в 0.6% от всички изследвани пациенти. Бих искала докторантката да обясни има ли статистически значимо по-висока честота спрямо общата популация. Най-често намираната инверсия е перичентрична инверсия в хромозома 2 - $inv(2)(p11.2-q13)$. Намерен е само 1 пациент с изохромозома и 8 пациенти с мозаични форми на структурни аберации (повечето в нискостепенен мозаицизъм), както и 3 жени с комбинирани бройни и структурни хромозомни нарушения.

Разпределение на структурните хромозомни аномалии според вида на репродуктивното нарушение (група)

Структурните хромозомни нарушения в болшинство си ангажират лица от женски пол и са представени в пълна форма. Най-голям е дялът на балансираните преустройства в група III (фамилно хромозомно преустройство или комбинирана репродуктивна история).

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

Обобщено, най-висок процент хромозомни нарушения е намерен сред пациентите от група III -11.2%. Разпределението на хромозомните нарушения спрямо общия брой изследвани пациенти (n=1733) и спрямо броя на пациентите с намерена патология (n=110), по групи, не показва статистически свързана зависимост между установената патология и група репродуктивно нарушение.

Хромозомен полиморфизъм

Намереният процент на полиморфизъм (10%) е статистически значимо по-висок от установения в нормалната популация. Мъжете показват почти два пъти повече полиморфизми (113/173) отколкото жените (60/173) (отношението мъже/жени е 1,9). Сред лицата е установен хромозомен полиморфизъм най-голям е делът 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). Бих искала докторантката да обясни има ли статистическа зависимост между груповата принадлежност и установения ХП и по-специално Фигура 31. Анализът на хипотези показва сигнификантно по-висока честота на намерените хромозомни полиморфизми в подгрупата на мъжкия фактор (състояща се от 57 пациенти) спрямо останалите подгрупи от група I.

Полиморфизмът по хромозома 9 се среща в най-голям процент - 3,9%, като най-често е застъпена инверсията на хетерохроматиновия блок в хромозома 9 - inv(9)(qh) – 2,4%, без статистическа зависимост с определена група, но значимо по-често при мъже. Интересно би било да се представят снимки от двата случая с хомозиготна инверсия на хромозома 9.

Y хромозомен полиморфизъм е установен в 3,6% от изследваните мъже с RH и представлява 28% от всички полиморфизми, открити при мъжете, като в 90% от случаите се касае за Yqh+. Установено е статистически значимо преваляване на Y-хромозомния полиморфизъм в репродуктивна група I.

Полиморфизмът по акроцентричните хромозоми е намерен в 2,1% от изследваните пациенти, което изглежда леко подценено, вероятно поради неотчитането му в миналите години. Хромозомен полиморфизъм по хромозома 16 е намерен при 1,3% от пациентите и не показва разлика с честотата в общата популация. Най-ниска е честотата на полиморфизма по хромозома 1 – 0,7%.

3) Молекулярно-цитогенетични изследвания за субтеломерни хромозомни преустройства

От включените в проучването пациенти, анализ със субтеломерна FISH е проведен при 20 пациента от общо 85 селектирани лица, отговарящи на индикации за възможен диагностичен резултат от приложение на молекулярно-цитогенетичен анализ. В тази група е установено 1 субтеломерно хромозомно нарушение – 5% (1/20), което аз бих коригирала като реципрочна транслокация на субмикроскопско ниво. Установена е при бащата на дете, изследвано с микрочипов анализ, за което не е представен резултата според ISCA номенклатурата. Представената в дисертацията Фигура 40 не е много ясна,

тъй като има припокриващи се хромозоми. Добре би било сигналите да се покажат със стрелки. Все пак приветствам това пилотно проучване със субтеломерни сонди при пациенти с РН, което очевидно е трудоемко и финансовоемко, но се явява незаменим помощник при установяване на субмикроскопски пренареждания.

Представянето на резултатите и обсъждането в подходяща форма дава възможност на докторантката да обобщи 5 основни **изводи**. Първият извод показва трендовият модел за ръста на пациентите с РН. Вторият извод обобщава общата честота на клинично значимите хромозомни аберации и разпределението им по групи. Третият извод касае честотата, характеристиката и значението на хромозомните нарушения (бройни и структурни) при пациенти с РН – по пол, вид на нарушението и групи. Четвъртият извод обобщава честотата, характеристиката и значението на хромозомните полиморфизми при пациенти с РН. Петият извод подчертава значението на молекулярно-цитогенетичният анализ чрез флуоресцентна ин ситу хибридизация за диагностициране на балансиран преустройство на субклетъчно ниво.

Докторантката извежда 6 **приноси** – 2 с оригинален характер, 2 с потвърдителен характер и 2 с научно-приложен характер. Според мен това е едно важно проучване, което е добра база за сравнителни популационни проучвания и планирани действия в областта на медицинското обслужване при пациенти с репродуктивни проблеми. Пожелавам на докторантката и целия екип да продължат с научните изследвания и клиничното приложение на тези и други нови методи при тази все още ненапълно изяснена патология.

Библиографията включва 204 заглавия, от които 78 заглавия (38%) са от последните 10 години.

Авторефератът обхваща 76 страници, като по-голямата част представя собствените резултати и обсъждането. Съдържанието отговаря напълно на представеното в дисертацията и дава ясна представа за основните достижения на докторантката.

5. Публикации и принос на докторанта

Резултатите от дисертационния труд са представени в 3 публикации в български списания, едната от които е под печат. Представени са и 3 участия в научни форуми. Във всички публикации и в 2 от участията докторантката е водещ автор, което подчертава нейния основен принос в направеното проучване.

В заключение, дисертационният труд на Мария Цветкова е задълбочено и важно изследване, което допринася за изясняване на спектъра и честотата на цитогенетичните нарушения при български пациенти с репродуктивни неудачи. Резултатите са

представени надлежно и са обсъдени критично. Показани са сериозни теоретични и практически познания в областта и възможност за самостоятелни научни търсения. Всичко това ми дава основание да препоръчам на членовете на Научното жури да присъдят на Мария Кирякова Цветкова научно-образователната степен „Доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки.

20.04.2021 г.

София

Рецензент:



Проф.д-р Иванка Димова, дм