



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

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

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

**Цитогенетични находки при пациенти с
репродуктивна недостатъчност**

АВТОРЕФЕРАТ

Мария Кирякова Цветкова

Биолог

Област на висше образование:

4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма „Генетика”

Научен ръководител:

Проф. д-р Людмила Ангелова, дм

Варна
2021

СЪДЪРЖАНИЕ

1. ВЪВЕДЕНИЕ	3
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	4
2.1. Цел	4
2.2. Задачи	5
3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	5
3.1. Материал	5
<i>За провеждане на конвенционален цитогенетичен анализ</i>	7
<i>За провеждане на субтеломерен анализ</i>	8
3.2. Методи	8
3.2.1. Документален метод - анализ на медицински досиета на пациентите	8
3.2.2. Лабораторни методи	9
3.2.2.1. <i>Конвенционален цитогенетичен метод</i>	9
3.2.2.2. <i>Молекулярно-цитогенетичен метод - флуорисцентна ин ситу хибридизация за субтеломерни участъци</i>	10
3.2.3. Статистически методи	10
3.2.4. Софтуерни програми	11
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	12
4.1. Обща характеристика на пациентите - брой, възраст, пол, вид на репродуктивните неудачи и диагностичен метод	12
4.2. Конвенционални цитогенетични изследвания	18
4.2.1. Обща характеристика	18
4.2.2. Хромозомни аномалии по вид и група репродуктивно нарушение	19
4.2.2.1. <i>Бройни хромозомни нарушения</i>	20
4.2.2.2. <i>Структурни хромозомни нарушения</i>	25
4.2.2.3. <i>Комбинирани хромозомни нарушения</i>	32
4.2.3. Разпределение на структурните хромозомни аномалии според вида на репродуктивното нарушение (група)	33
4.2.4. Разпределение на всички хромозомни нарушения (бройни, структурни, комбинирани) по вид репродуктивно нарушение (група)	36
4.2.5. Хромозомен полиморфизъм	39
4.3. Молекулярно-цитогенетични изследвания за субтеломерни хромозомни преустройства	56
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	58
ИЗВОДИ	60
ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	62
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА	63
БИБЛИОГРАФИЯ	64

1. ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

Репродуктивните нарушения (РН) включват разнообразни, широко разпространени проблеми като: инфертилитет (липса на бременост – стерилитет), повтарящи се спонтанни аборти, мъртви раждания, раждане на деца с множество вродени аномалии (МВА) и/или сумствено изоставане (УМИ).

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

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

Клинични данни за двойки с регистрирани спонтанно прекъснати бременности показват, че загубата на бременност (аборт) е доста често срещано явление. Около 15-20% от разпознатите бременности завършват с неуспех (21, 54, 59, 81, 112, 122, 133, 146, 165, 172). Повечето от тях се случват спонтанно в ранна гестационна седмица (55-70%), въпреки че загубите във втори и трети триместър не са редки (172). Приблизително 50% от разпознатите ранни аборти се асоциират с цитогенетични промени, като вероятността за цитогенетичните промени варира с гестационната възраст и морфология на абортите (172). При абортите в по-ранна гестационна възраст има по-голяма вероятност за откриване на абнормни кариотипи: такива се откриват при 2/3 от абортите преди 8 г.с. (70-80%) и близо 1/4 при тези между 8-12 г.с. При аборти от втори триместър хромозомни нарушения се срещат в 30%, и едва 5% при тези в трети триместър и в живо родени деца (81,146).

Рутинното високорезолютивно цитогенетично изследване дава възможност за намиране на балансиран хромозомни преустройства в приблизително 5,5% от двойките с

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

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

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

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. Цел

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

2.2. Задачи

Отговорът на така поставената цел изисква решаването на следните задачи:

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

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

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

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

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

3. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материал

Клиничен материал

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

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

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

осъществява на базата на включващи и изключващи критерии. Изследваните пациенти са от Североизточна България.

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

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

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

- Двойки с инфертилитет с/ без неуспешни АРТ процедури;
- Двойки с два и повече СПА (Препоръки за диагностично и лечебно поведение при репродуктивни неудачи - Европейска Асоциация по Репродуктивна Медицина, 2018);
- Двойки с комбинирана репродуктивна история (СПА в комбинация с мъртво раждане, прекъсната бременност по медицински показания, родено дете с аномалии и/ или УМИ) и фамилна обремененост.

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

Биологичен материал (проби)

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

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

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

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

В случаите на мозаични варианти по половите хромозоми, намерени в някои пациенти в резултат на стандартно проведен цитогенетичен анализ, се препоръчва изследването на кожни фибробласти.

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

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

Критерии за подбор на пациенти, участващи в проучването

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

За провеждане на конвенционален цитогенетичен анализ

Критерии за включване:

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

Критерии за изключване:

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

За провеждане на субтеломерен анализ

Критерии за включване:

- Възраст над 16 години;
- Двойки с репродуктивни проблеми – минимум 2 спонтанни аборти в комбинация с родено дете с увреждания и/ или умствено изоставане с неясна етиология;
- Липса на анатомични, ендокринологични и други състояния, които биха обяснили репродуктивните проблеми;
- Нормален кариотип от конвенционална цитогенетика;
- Съгласие за участие в проучването.

Критерии за изключване:

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

3.2. Методи

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

3.2.1. Документален метод - анализ на медицински досиета на пациентите

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

Етапът на обективизиране на данните и идентификация на причината се фокусира върху РН в семейството, ход на бременността, раждане и неонатален период (където има). Фамилната анамнеза включва родословен анализ на поне две поколения с насочено търсене на репродуктивни неудачи, като спонтанни аборти и мъртви раждания, наличие на роднини с вродени малформации и/или изоставане в невро-психичното развитие, както и близкородствени бракове. Анамнезата за инфертилитет, спонтанни

аборти, вродени аномалии, умствено изоставане или перинатална смърт в някои случаи определя наличие на фамилно хромозомно преустройство. Изучаването на родословното дърво е необходимо, особено когато се касае за двойка със спонтанни аборти и мъртво раждане. Хромозомният анализ и при двамата партньори се провежда, за да се установи/изключи наличие на системна балансирана транслокация или други хромозомни аберации, включително и мозаицизъм (наличие на минимум две клетки от една и съща патологична клетъчна линия в съчетание с нормална клетъчна линия).

3.2.2. Лабораторни методи

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

Основни: за търсене на микроскопски и субмикроскопски хромозомни аберации:

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

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

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

3.2.2.1. Конвенционален цитогенетичен метод

Основен метод за култивиране и обработка на лимфоцитни култури прилаган в цитогенетичните лаборатории. Следва се протокола на Лабораторията по Медицинска генетика - Варна.

Тъкнно култивиране на лимфоцити

Алгоритъм на действие: Проверява се за наличие на стерилна посуда и материали за посевка в бокса; темпериране на хранителни среди и реактиви 1 час преди посевка; взетият материал се посевя стерилно в бокса, съгласно методиката; култивиране на посетият материал в термостат за 72 часа; синхронизиране на културите с FudR - 24 часа преди обработка; засичане на културите с колхицин на 69-72-ия час; обработка на културите по методика; изготвяне на препарати; оцветяване чрез GTG и анализ (по 10-12 метафазни пластинки на пациент; при съмнение за мозаичен вариант - до 30 метафази при открита една аберантна клетка, или до 50 метафази при намиране на втора).

Тъканно култивиране на амниоцити

Алгоритъм на действие: След пристигане на амниотичната течност в лабораторията, тя се посява съгласно протокола на лабораторията; култивиране в термостат до образуване на достатъчен брой колонии (обикновено до към десетия ден от посявката); засичане с колцемид (2 часа и 15 мин.); трипсинизиране (критичен момент); обработка на културите по методика; изготвяне на препарати; оцветяване чрез GTG и анализ (по 15 метафазни пластинки на пациент).

Тъканно култивиране на фибробласти

Алгоритъм на действие: След пристигане на материала (парченце кожа или абортивен материал), той се поставя в петри с малко физиологичен разтвор или с малко среда (RPMI 1640 и телешки серум) и антибиотик, нарязва се на ситно и се прехвърля във флашка; култивиране в термостат до получаване на необходимата колония (обикновено тя се образува около всяко парченце); обработка на културите по методика; изготвяне на препарати; оцветяване чрез GTG и анализ (по 15 метафазни пластинки на проба).

При необходимост, за допълнително характеризиране на намерени полиморфни варианти са прилага допълнителна техника на оцветяване – **CBG**, по протокол върху 14 - дневни препарати.

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

За скриниране на субтеломерните участъци при пациенти без патологични отклонения от конвенционален цитогенетичен анализ е използван кит Vysis ToTelVysion Multi-Color FISH Probe Kit (CE). Сондите за късите рамене са белязани със Spectrun Green, а за дългите – със Spectrum Orange.

Алгоритъм на действие: изготвяне на микроскопските препарати съобразно протокола на лабораторията; предварителна обработка на стъклата; денатурация; подготвяне на сондите; хибридизация; промиване; оцветяване с DAPI; микроскопски анализ (анализират поотделно всички 15 участъка).

3.2.3. Статистически методи

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

- **Вариационен анализ:** използван при обработката и анализа на количествено измерими признаци. За сравняване на средни величини бе приложен t- критерия на Стюдънт. Всяка от стойностите на изследваните величини е представена като

средна аритметична \pm грешка на средната аритметична. Констатираните различия са приети за статистически значими и потвърждаващи алтернативната хипотеза (H_1) при $p < 0,05$.

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

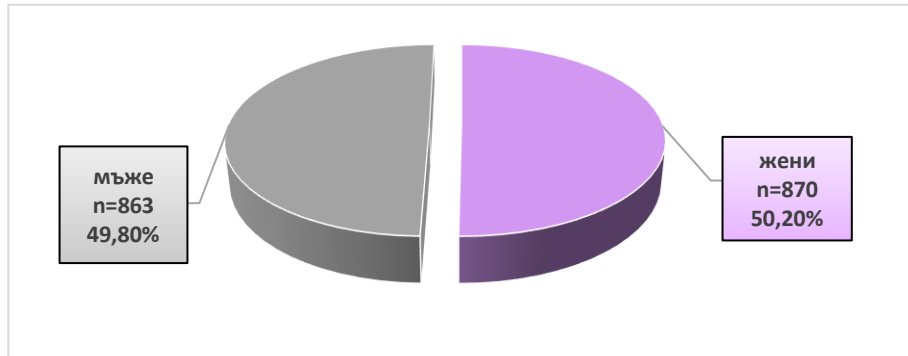
3.2.4. Софтуерни програми

- **Axio Vision (Axio Imager Z2):** микроскопска софтуерна система за дигитално документиране и обработка на молекулярно-цитогенетични резултати (субтеломерна FISH);
- **AmScope 3.7:** микроскопска софтуерна програма за документиране на цитогенетични резултати (рутинен кариотип);
- **Microsoft Excel 2016:** софтуерна програма за обработка, анализ и визуализация на цифрови данни. Тук програмата е използвана основно за анализ на първичните данни и получаване на количествен и графичен резултат, а също така и при статистическата обработка на данните от цялостното проучване;
- **Graph Pad Prism 9:** софтуерна програма, използвана за статистическа обработка на данни;

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

В периода на изследване от 16 години (2004-2019) бяха включени общо 1733 пациенти с репродуктивни неудачи - 870 жени и 863 мъже (съотношение 1.01) (фиг.1)



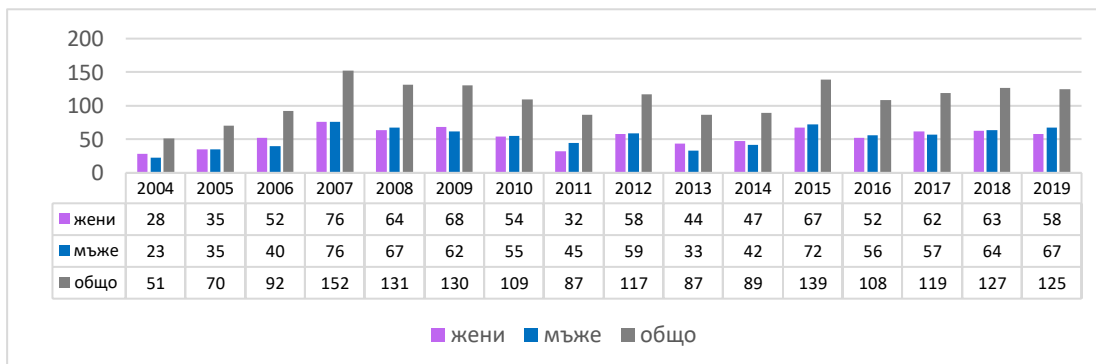
Фигура 1. Разпределение на пациентите по пол

Минималната възраст на включените пациенти е 16 г., а максималната 60 г. Средната възраст на изследваната група лица - 38 г. (таблица 1).

Таблица 1. Разпределение на пациентите по възраст и пол

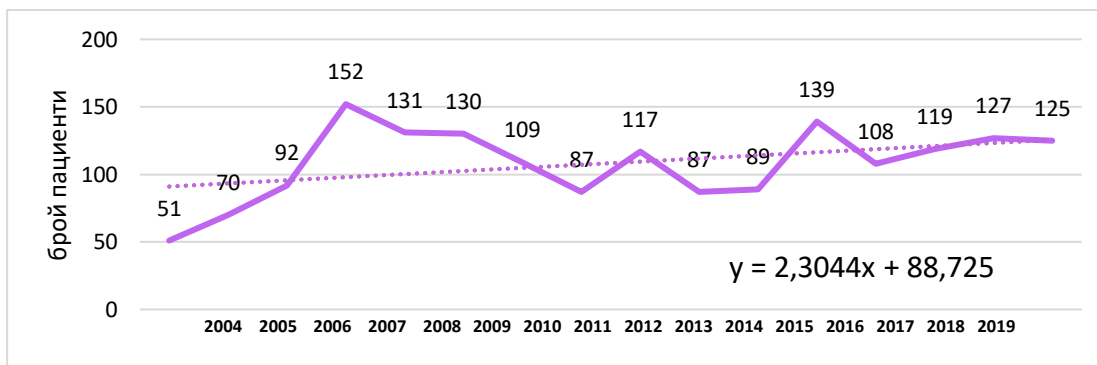
Възrastова група	ЖЕНИ		МЪЖЕ		ОБЩО	
	брой	%	брой	%	брой	%
до 35 г.	564	32,5	443	25,6	870	50,2
над 35 г.	306	17,7	420	24,2	863	49,8
ОБЩО	870	50,2	863	49,8	1733	100

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



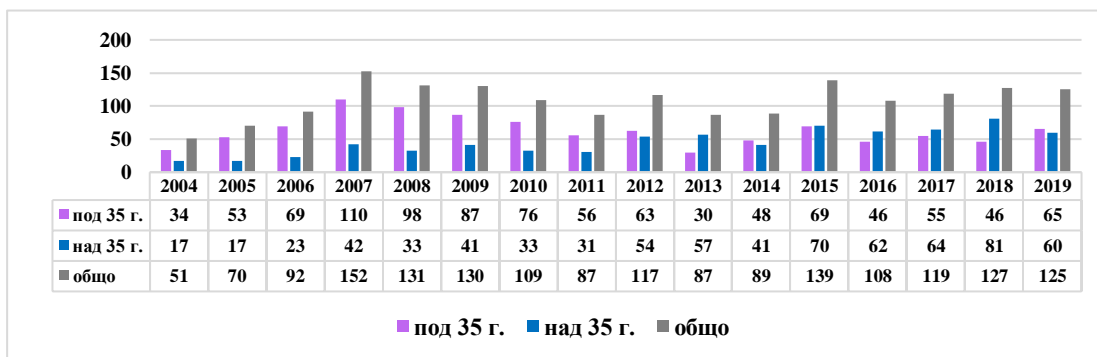
Фигура 2. Тенденция в разпределение на изследваните пациенти по години

Средният темп на нарастване броя на изследваните лица е около 6% (или 4,9 лица на година среден прираст). Не се наблюдава съществена разлика в броя на изследваните мъже и жени през годините. Ако се следва трендовият модел (от фиг.3), може да се предскаже, че след 5 години, броя на пациентите с РН, би бил около 137, т.е. тенденцията е към слабо и плавно покачване.



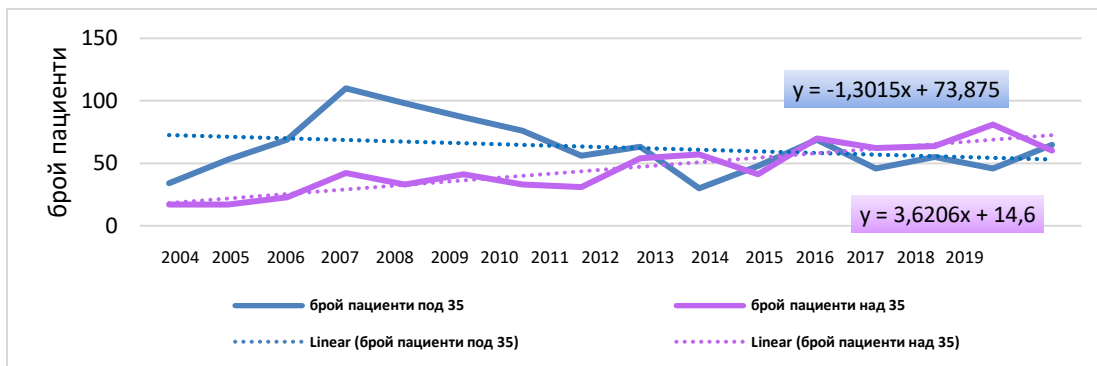
Фигура 3. Трендови модел на пациентите с РН за периода на проучването (2004-2019)

По отношение на възрастта се наблюдава нарастване в годините на броя на лицата, както на тези над 35 г., така и на тези под 35 години, съответно 3,5 пъти и 1,9 пъти. (фиг. 4).



Фигура 4. Разпределение на изследваните пациенти по години според възрастта им

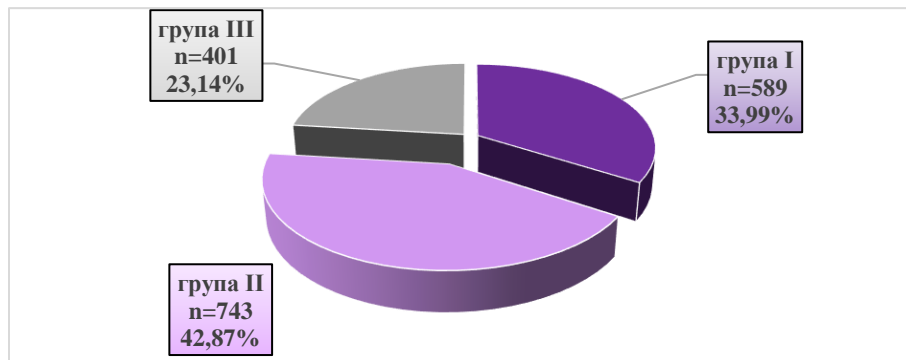
Ако се разгледа, обаче, трендовия модел (фиг.5) се вижда, че въпреки, че средният темп на нарастване е с около 4% на година, посоката на развитие като цяло е негативна и тенденцията е към намаляване на общия брой на пациентите под 35г. възраст. За разлика от тях, при пациентите с РН над 35 г., чийто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



Фигура 5. Трендови модел за периода на проучването на пациенти с РН по възраст

Според вида на репродуктивния проблем пациентите се разпределят в 3 групи (фиг.6):

- **Група I** – Пациенти с Инфертилитет (липса на бременности) с неуспешни АРТ процедури и такива без опити за АРТ; мъжки фактор – **589 лица**;
- **Група II** – Пациенти с ≥ 2 СПА (независимо от наличието или отсъствието на живо и здраво дете в семейството) – **743 лица**;
- **Група III** – Комбинирана репродуктивна история от *минимум 2 неудачи* (мъртвородено, прекъсната бременност по медицински показания за вродена аномалия, живородено с аномалии и/или УМИ, спонтанен аборт, неуспешни АРТ процедури) и пациенти с фамилна хромозомно преустройство – **401 лица**.



Фигура 6. Разпределение на пациентите според вида на репродуктивната неудача

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

Таблица 2. Груново-полово разпределение на анализирания извадка пациенти

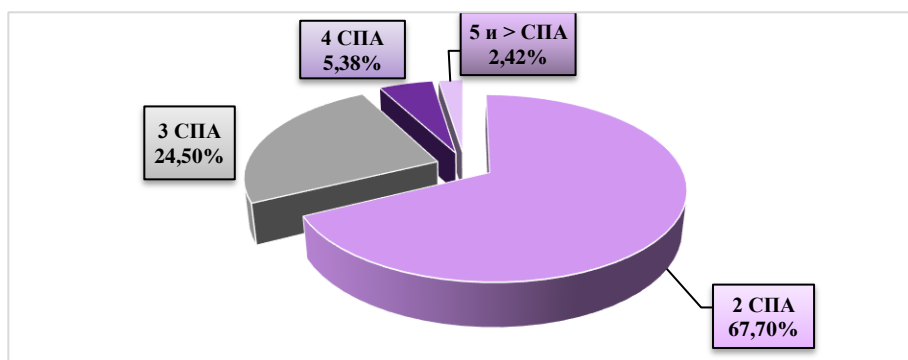
Категория пациенти	ЖЕНИ			МЪЖЕ			ОБЩО			стойност на p
	брой	%	% от групата	брой	%	% от групата	брой	%	% група	
група I	275	31,61	46,68	314	36,38	53,32	589	34,0	100	P=0.08
група II	380	43,68	51,14	363	42,07	48,86	743	42,9	100	
група III	215	24,71	53,62	186	21,55	46,38	401	23,1	100	
общо	870	100	50,2	863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

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

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

Най-голям е броят на изследваните пациенти от **група II** (≥ 2 СПА) – 743 лица. При подразделяне в подгрупи (фиг.7), ясно се наблюдава многократното преобладаване на семейства с два СПА. По-големият брой лица с 2 СПА се дължи на факта, че наличието на два аборта е първата индикация за насочване към диагностичен панел от изследвания според национален стандарт по Медицинска генетика и Европейската асоциация по Репродуктивна медицина, 2018г.

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

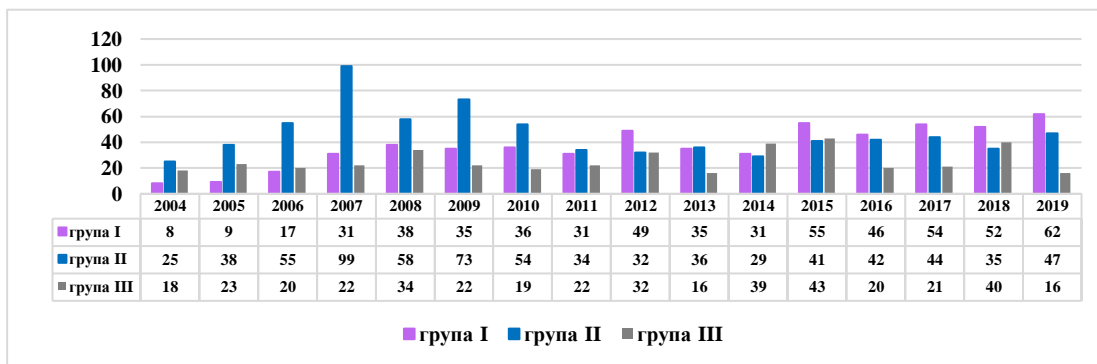


Фигура 7. Разпределение на пациентите от група II според броя на СПА

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

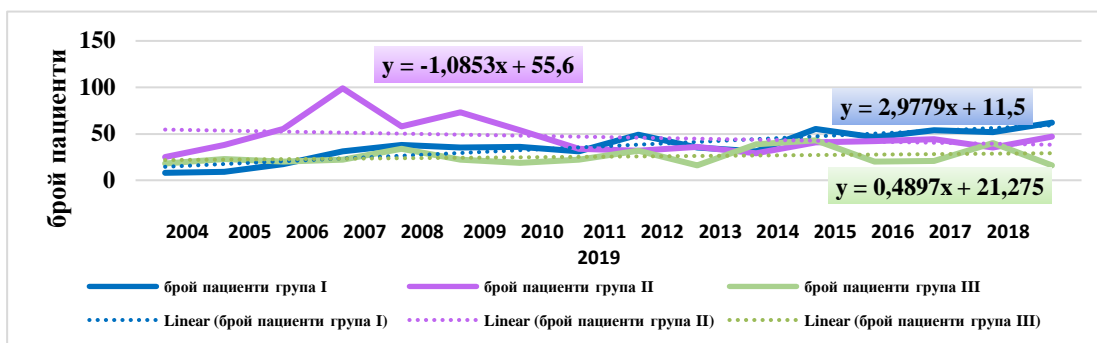
- Пациенти с комбинирана репродуктивна история (КРИ) – 364 лица;
- Пациенти с фамилно хромозомно преустройство – 37 лица (лица от първа степен на родство).

При проследяване на пациентските групи в годините за които се провежда проучването се наблюдава нарастване в броя на пациентите от група I (липса на бременност) и група II (с повтарящи се СПА); при пациентите от група III (комбинирани неудачи) не се отчита промяна (фиг.8).



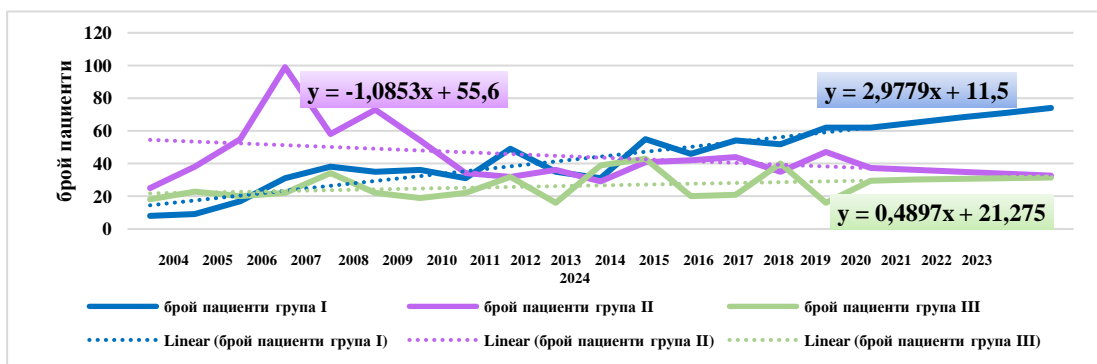
Фигура 8. Разпределение на изследваната извадка пациенти по години и групи

Съгласно трендовия модел (фиг.9), обаче, *тенденцията* към отчетливо нарастване е само за групата лица с инфертилитет (група I), при лицата с повтарящи се СПА (група II) е към слабо намаляване. Почти незабележимо е нарастването при двойките с комбинирана репродуктивна история (група III).



Фигура 9. Трендови модел на пациентите с РН по групи

Според този модел, (фиг.10) след 5 години пациентите и от трите групи биха били от сходен порядък: група I да са ≈ 74 , от група III - ≈ 32 , а тези от група II - ≈ 33 .



Фигура 10. Трендови модел на пациентите с РН по групи

Резултати получените от нашата извадка пациенти като цяло корелират с данните в световен мащаб, където броя на инфертилините двойки за период от 2010 до 2016 нараства около 1,5 пъти (от 48,5 млн до 60-80 млн) (114,127). За България, нарастването на броя двойките с РН е почти два пъти за една година (от 145 хил. през 2017 до 300-400 хил. през

2018) (7). При анализа на пациентите преминали през нашата лаборатория не се наблюдава такъв отчетлив скок, по-ясна тенденция към увеличение има само при пациенти с липса на бременности (група I) (от 8 през 2004г до 62 през 2019). В група II, съгласно трендовия модел се отчита леко намаляване на броя на пациентите само със СПА, но това понижение е по-скоро в резултат на сериозен връх от по-масово насочване за цитогенетично изследване на пациенти в периода 2006 - 2008г. след стартирането и акредитиране на Лабораторията по медицинска генетика през 2003. Ако, обаче, се проследи броят им в началото на периода на проучването (2004г. - 25 лица) и крайният период (2019г. - 47 лица), нарастването им е почти два пъти, т.е тенденцията като цяло е към увеличение.

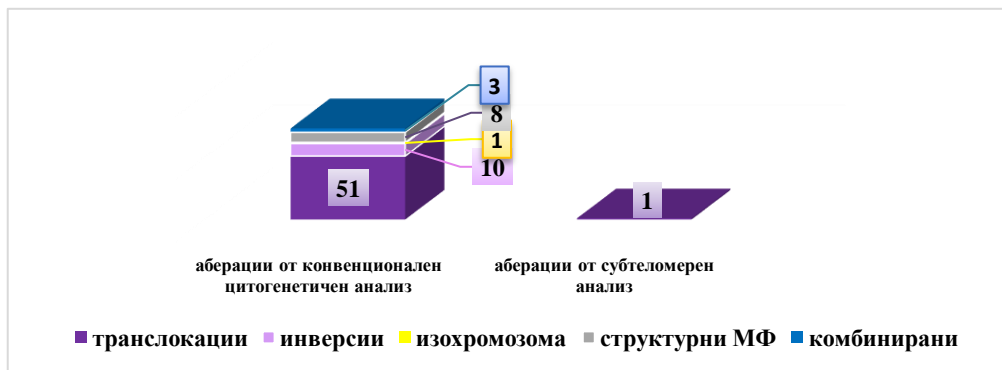
Според **лабораторния диагностичен метод** – обща характеристика

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

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

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

Аберациите, разкрити чрез субтеломерна молекулярна цитогенетика е **1** (фиг.11).



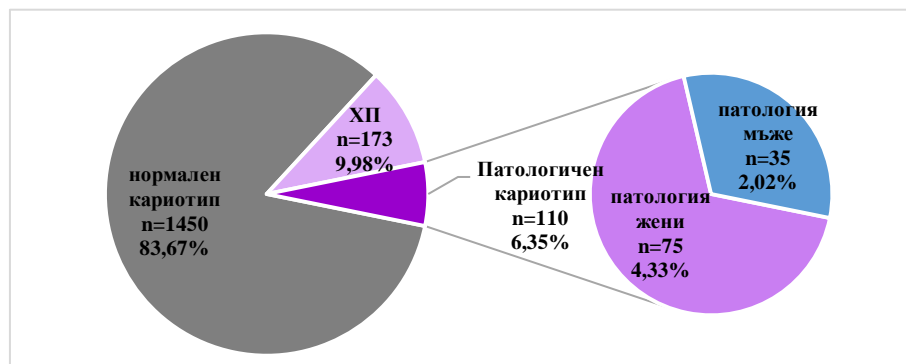
Фигура 11. Разпределение на пациентите с установени структурни аберации в зависимост от вида на включения хромозомен участък

4.2. Конвенционални цитогенетични изследвания

4.2.1. Обща характеристика

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

Бройни, структурни и комбинирани хромозомни нарушения са диагностицирани в **6,35%** (110 лица) от всички изследвани, като делът на жените (4,33%) е два пъти по-голям от този при мъжете (2,02%) (фиг.12).



Фигура 12. Разпределение на пациентите според установения кариотип

Установената от нас **честота** на бройни и структурни хромозомни нарушения в 6,35% от пациентите с РН е близка до средните проценти съобщавани в други подобни изследвания - 5.3% (22), 6% (14), 7,3% (72), 7,7% (13).

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

Съотношението по **пол** при тези 110 лица дава значим превес на жените (68,2%) спрямо мъжете - 31,8%. То корелира с данните от други сходни проучвания като се смята, че е резултат от по-високата честота на бройните аберации по половите хромозоми при жени, обикновено представени под формата на ниско степенен мозаицизъм (68,80,115,120,145,160,161,189). *Morel F, et al.* в своето проучване на пациенти с инфертилитет или неуспешни АРТ процедури, докладват много по-висок процент на

хромозомни нарушения при инфертилни жени (13%) спрямо инфертилни мъже (2,7%), като тази разлика се дължи отново на намерения голям брой варианти на полово хромозомен мозаицизъм при тях (91,7% от всички аберации) (128).

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

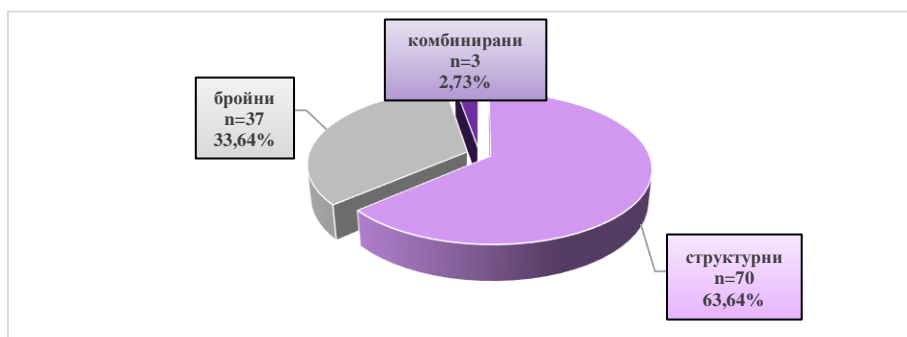
Хромозомен полиморфизъм е установен в 9,98% (173 лица) от анализираниите 1733 пациента. Този резултат се доближава до честотата на полиморфизмите при пациенти с РН описани в литературата (10-15%) и е два пъти повече в сравнение с този установен при нормалната популация (2-5%) (15,199). Намереният от нас процент на полиморфизъм е статистически значимо по-висок от установения в нормалната популация ($t=9$; $p<0,001$). По отношение на пола, при мъжете ХП е статистически значимо два пъти по-често срещан (6,52%) в сравнение с този при жените (3,46%) ($p=0,0001$ според теста на Фишър). Повисокият процент полиморфизъм при мъжете се дължи на Y-хромозомата, която показва висока честота на полиморфност и варира в широки граници между отделните индивиди и различните популационни групи (199). Това се потвърждава и от нашите резултати.

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

4.2.2. Хромозомни аномалии по вид и група репродуктивно нарушение

Откритите от нас хромозомни аномалии са разгледани и обсъждани по-долу според приетото разделение) (фиг.13) и впоследствие категоризирани според произхода на аберацията:

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



Фигура 13. Разпределение на патологията по вида на аберацията

Бройните нарушения (33.63% от пациентите) са почти два пъти по-малко от структурните (63,64%). Делът на комбинираните нарушения е много нисък (2,72%).

4.2.2.1. Бройни хромозомни нарушения

Бройни нарушения са открити само по половите хромозоми в **37** пациента, според формата на нарушението в пълна форма (ПФ) в 3 пациента и мозайчна форма (МФ) в 34 пациента.

Пълна форма на анеуплоидия по полови хромозоми е открита само при 3 лица, всички от мъжки пол (0,2% спрямо общия брой пациенти, 3/1733; 0,3% спрямо всички мъже, 3/863; 8,1% от всички бройни аберации, 3/37). И тримата пациента са от групата лица с първичен инфертилитет (група 1) - двама със синдром на Клайнфелтър (47,XXY) и един пациент с кариотип 48,XXYY,inv(9)(qh) (таблица 3).

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

Таблица 3. Пълни форми на бройни хромозомни нарушения по половите хромозоми при пациенти с РН

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

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

Броен мозаицизъм при жени

По литературни данни ниският процент (1-2%) с кариотип 47,XXX, както и липсата на една X хромозома в единична клетка при 46,XX жени (много ниско-степенен мозаицизъм), се приема за норма, т.к. се предполага, че се касае за едноклетъчен псевдомозаицизъм (68,80,115,145,160,161). В други проучвания дори се счита, че не се индикира повишен риск за репродукцията при мозаицизъм в $< 10\%$, за жени без стигми за синдром на Търнър (120). В нашето проучване за бройно нарушение в мозайчен вариант

приехме наличие на минимум две клетки от една и съща патологична клетъчна линия, а за ниско-степенен мозаицизъм - при процент на аберантната клетъчна линия ≤ 10 .

Всички намерени мозаични форми на бройни нарушения по половите хромозоми при жени с РН са представени в таблица 4. Интерес представляват два случая на жени с дългогодишен инфертилитет, при които беше установен мозаицизъм само от по две патологични клетъчни линии (случаи №1 и №24). При една пациентка (случай №28), в допълнение са изследвани и кожни фибробласти, при които също се установява мозаичен кариотип с монозомия X, в по-нисък процент (6,7%) (таблица 4).

Таблица 4. Мозаични форми на бройни нарушения по половите хромозоми при жени с РН

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

Броят на жените-мозаици по половите хромозоми са разпределени почти по-равно между група I (инфертилитет) – 13 лица и група II (СПА) – 14 лица. Прави впечатление, обаче, че при жените принадлежащи към група II се касае основно за наличие на

нискостепенен мозаицизм (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. При пациентките от група III (комбинирани репродуктивни нарушения) също е налице нискостепенен мозаицизм по половите хромозоми. В тази група, една от жените независимо, че е показала много ниско степенен полово - хромозомен мозаицизм, е отчетена за паталогична, т.к. тук повода за изследване е прекъсната бременност с T21, което показва тенденция към повишена склонност за неправилно разделяне на хромозомите.

Броен мозаицизм при мъже

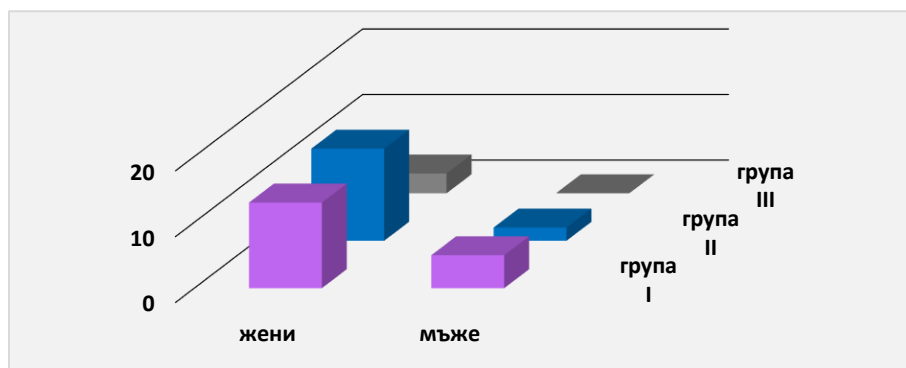
От изследваните мъже с РН, мозаични форми на бройни нарушения бяха установени само по половите хромозоми, общо в 4 пациента (таблица 5). Нисък процент мозаицизм се намира основно при мъже от двойки със СПА, полово-хромозомният мозаицизм при мъжете се свързва основно с техния инфертилитет (50,54).

Таблица 5. Мозаични форми на бройни нарушения в половите хромозоми при мъже с РН

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

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

Съгласно обобщените резултати може да се каже, че бройни нарушения бяха намерени почти по равно в група I – 18 лица и група II -16 лица. Най-малко бяха пациентите от **група III** (комбинирани репродуктивни неудачи) – 3 лица (таблица 6; фиг.14). Не се установи статистическа значима зависимост между груповата принадлежност на пациентите с открити бройни нарушения и пола ($\chi^2=2,051$, $p=0,35$).



Фигура 14. Разпределение на бройните нарушения по полови хромозоми по пол и групи

Таблица 6. Разпределение на бройни хромозомни нарушения по пол, форма и група РН

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

В огромната си част, очаквано, бройните нарушения са установени в мозаична форма и то основно при лица от женски пол. Делът на пациентите жени от група I (13 лица) и група II (14 лица) е почти равен. По-висока степен на мозаицизъм по патологична клетъчна линия, обаче, се установява при жените от **група I**. **Пълна** форма на бройно нарушение бе открито единствено по **половите** хромозоми, при лица от **мъжки** пол от група I (таблица 6).

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

Таблица 7. Общо разпределение на МФ на бройните нарушения по пол, групи и подгрупи

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

Обобщение по бройни хромозомни нарушения

Известно е по литературни данни, че **бройните** хромозомни аберации, намерени при двойки с РН, включват основно половите хромозоми и са представени най-често под формата на **мозаицизъм, основно в лицата от женски пол** (68,161). Нашите резултати, корелират с резултатите докладвани от сходни проучвания, според които по-високият

процент на хромозомни нарушения при жени спрямо мъже е свързан с установеният по-голям брой варианти на полово хромозомен мозаицизъм при жени с РН, под формата на нискостепенен мозаицизъм (68,80,115,120,145,160,161). *Morel F, et al.* в своето проучване например, дори докладват 10 пъти по-висок процент хромозомни нарушения при инфертилни жени (13%) спрямо инфертилни мъже (2,7%), като тази разлика се дължи именно на намерения голям брой варианти на полово хромозомен мозаицизъм при жените (91,7% от всички аберации) (128).

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

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

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

- 33,63% (37/110) са почти два пъти по-рядко срещани от структурните 63,64% (73/110);
- в голямото си болшинство (81,1% т.е.30/37) ангажират лица от женски пол;
- в голямото си болшинство (91,9% т.е. 34/37) са представени в мозаична форма:
 - ✓ със сходен дял между група I и група II, но с най-висок процент на патологична клетъчна линия в група I (инфертилитет);
 - ✓ по отношение група II, е характерен ниско-степенен мозаицизъм по полови хромозоми, като с повишаване броя на СПА намалява вероятността да се намери мозаицизъм.

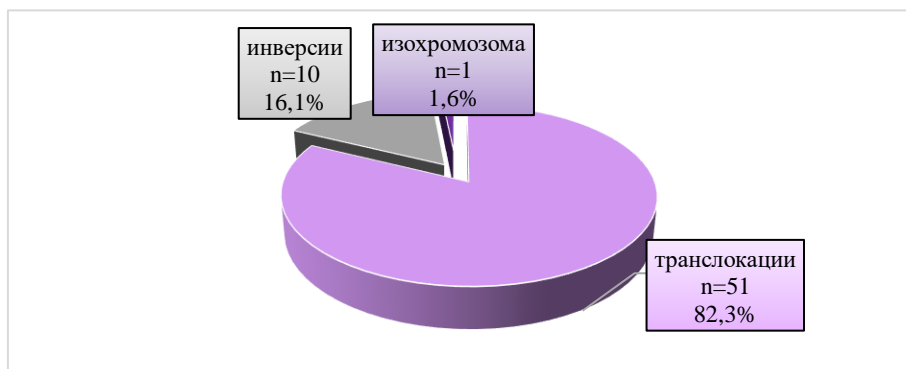
4.2.2.2. Структурни хромозомни нарушения

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

Структурни хромозомни нарушения в пълна форма

Намерените структурни хромозомни аберации в пълна форма (фиг.15) при 62 пациенти с репродуктивни неудачи са:

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



Фигура 15. Разпределение на пациентите по вида на структурна хромозомна аберация ПФ Транслокация

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

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

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

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

пъти по-малкия брой изследвани от нас пациенти (1733 спрямо 5088) в по-малък период на обхващане (16 спрямо 20 години).

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

Показанията, видът на кариотипа и групата репродуктивно нарушение са представени детайлно на таблици 8 и 9.

Таблица 8. Реципрочни транслокации, намерени при жени по групи (с различен цвят са обозначени различни семейства с членовете - носители на различно преустройство).

№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
1	4 СПА и 1 починало дете с МВА	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
2	Родено дете с хромозомна болест 47,XX,+der(9),t(2;9)(q36;q21)mat	III	46,XX,t(2;9)(q36;q21)
3	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(2;9)(q36;q21)
4	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(7;22)(q11;q12)
5	Родено дете с хромозомна болест 46,XY,t(5;19)(q12;p13.1)mat	III	46,XX,t(5;19)(q12;p13.1)
6	2 СПА	II	46,XX,t(9;11)(q10;q10)
7	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(8;13)(q22.1;q31)
8	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(8;13)(q22.1;q31)
9	2 СПА	II	46,XX,t(15;17)(q22;q12)
10	2 СПА	II	46,XX,t(2;21)(q22;q21)
11	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
12	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(7;9)(p13;q32)
13	Родено дете с хромозомна болест 47,XY+mat	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
14	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(5;15)(p15;q22)
15	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(1;9)(q21;q32)
16	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
17	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
18	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
19	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(7;22)(q11;q12)
20	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(11;22)(q24;q12.3)
21	3 СПА	II	46,XX,t(12;18)(q21.3;q12.3)
22	Родено дете с хромозомна болест 46,XY,der(5)t(5;11)(p15.2;q23.2)	III	46,XX,t(5;11)(p15.2;q23.2)
23	Фамилно хромозомно преустройство	III	46,XX,t(3;13)(p25;q31)
24	4 СПА	II	46,XX,t(11;13)(q22.2;q14.2)
25	Родено дете с хромозомна болест 46,X,der(X)t(X;7)(q21.1;q31.1)mat	III	46,X,t(X;7)(q21.2;q31.1)
26	Родители на дете с хромозомна болест 46,XX,der(9)t(9;14)(p22;q24.3)	III	46,XX,t(9;14)(p22;q24.3)
27	Родено дете с хромозомна болест 46,XY,der(18)t(7;18)(q35;q22)	III	46,XX,t(7;18)(q35;q22)

От установените транслокации, 26 са между автозомни хромозоми, и само една включва автозома и полова хромозома (случай № 25). Реципрочните транслокации бяха намерени при 8 двойки със спонтанни аборти, половината от които с по 2 СПА (случаи № 6, № 9 и № 10 от таблица 8 и случай № 1 от таблица 9).

Таблица 9. Реципрочни транслокации, намерени при мъже по групи

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

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

Робертсонови транслокации бяха установени при общо 12 пациента (12/62, 19,3% от всички структурни преустройства в ПФ). Те са в 50% (n=6) между акроцентричните хромозоми 13/14, преобладаващи в жени (в 83,3%; 5/6). По литературни данни, този е най-често срещан - около 75% от всички варианти (54). Установеният от нас процент е по-нисък, но като цяло се наблюдава еднопосочност между получените от нас резултати и тези съобщени в литературата. Детайлното представяне по показание, пол и група репродуктивно нарушение представено в таблица 10 и 11.

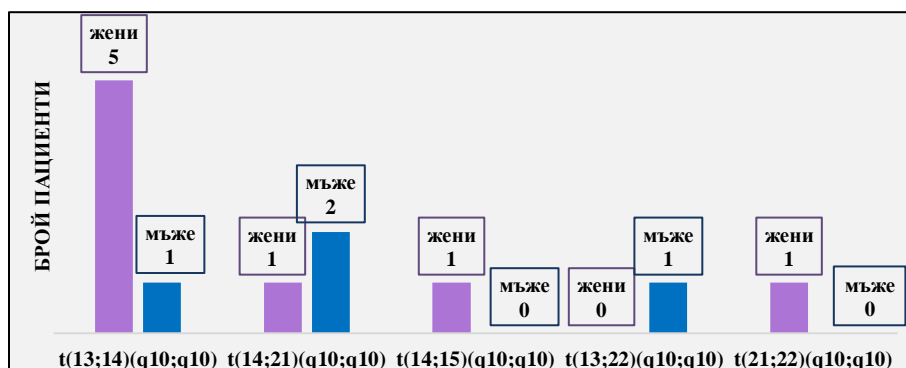
Таблица 10. Видове Робертсонови транслокации, намерени при жени

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

Таблица 11. Робертсонови транслокации, намерени при мъже по групи

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

Пациентите с Робертсонови транслокации имат повишен риск от неправилно разделяне на хромозомите, което по време на първото мейотично делене може да доведе до различни форми на сегрегация и да резултира в анеуплоидия на транслоцираните хромозоми. Транслокационна тризомия 14 в плода нормално води до загубата му още в първи триместър или до невъзможност за бременност (50%) (105). Това бе потвърдено и от нашите резултати, където при три от жените с rob(13;14) има повтарящи се ранни СПА, а при другите две – неуспешни АРТ процедури (фиг.16). За носителите на rob(13;14) общият риск от аборт не се очаква да бъде значително различен от статистически определения от 15% (105). Очаквана, спрямо същия автор, беше и втората по честота Робертсонова транслокация - между хромозоми 14/21, установена при нас в 25% от всички намерени Робертсонови транслокации (3/12).



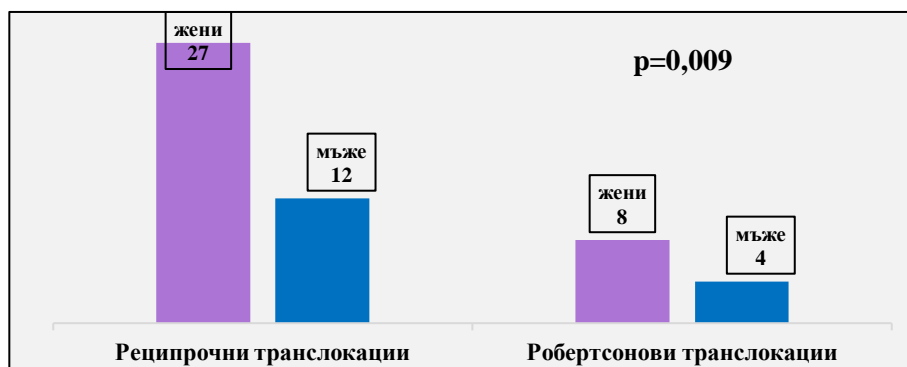
Фигура 16. Разпределение на Робертсоновите транслокации по вид и пол

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

наблюдава при жени по отношение rob(13;22), рядко преустройство между акроцентрици (<1% от всички Робертсонови варианти) (16), съобщено в по един пациент с инфертилитет (16,18).

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

По отношение на *пола*, прави впечатление, че при **жените** бяха намерени статистически значимо **два пъти повече реципрочни и робертсонови транслокации** (n=35, 68,6%) спрямо тези при мъжете (n=16, 31,4%) (p=0,009, Фишър тест) (фиг.17).



Фигура 17. Разпределение на транслокациите по пол

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

От описаните до тук резултати може да се обобщи, че балансираните реципрочни транслокации (ПФ) се срещат в над половината 62,9% (39 от 62) от всички структурни

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

Инверсия

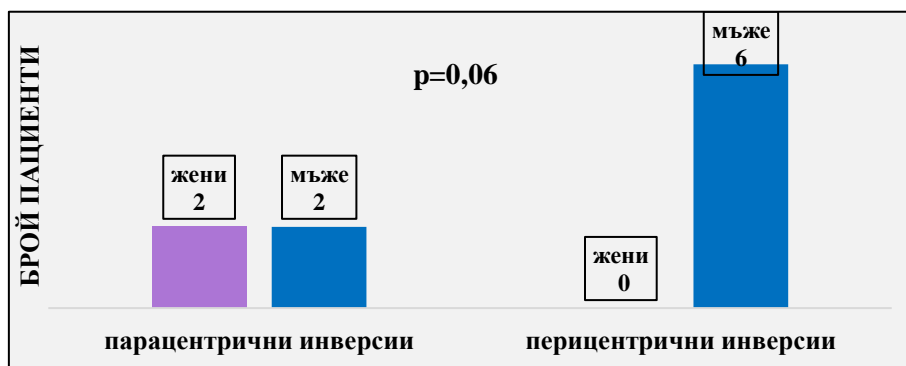
Втората по честота структурна аберация намерена в пациенти с РН в нашето проучване е инверсията. Тя беше установена в **16,1%** (10/62) или 0,6% (10/1733).

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

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

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

Интересен е фактът, че перичентрични инверсии са намерени само при мъже (фиг.18), но този факт има по-скоро случаен характер, поради липса на сигнификантна значимост по метода за статистическа обработка на нашите резултати - доказано с точният тест на Фишър по отношение пола на пациентите $p=0,06$ (към броя на пациентите по пол); $p=0,2353$ (към всички иверсии). При анализа на литературата включена в настоящата дисертация също не се отчита полово значима разлика в носителите на инверсии (13,21,122,180,189).



Фигура 18. Разпределение на намерените инверсии по вид и пол

Всички открити инверсии в изследваната извадка пациенти са представени в таблица 12.

Таблица 12. Пациенти с репродуктивни неудачи, при които са установени инверсии

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

Най-често намираната от нас инверсия е перичентрична инверсия в хромозома 2 - inv(2)(p11.2-q13), с идентични точки на счупване от мъжки пол. Други две перичентрични инверсии, също при мъже, засягат хромозома 7 с различни точки на счупване - inv(7)(p12-q21.1) и inv(7)(p11-q11.2). По една инверсия е открита в хромозоми 4, 10, 11,13 и 18. Няма статистическа значимост фактът, че в настоящото проучване, най-честа е инверсията в хромозома 2 ($\chi^2=0,6043$; $p= 0,9878$).

Изохромозома

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

Структурни хромозомни нарушения в мозаична форма

В изследваната от нас извадка пациенти с РН бяха намерени и 8 пациента с мозаични варианти на структурни аберации. Преобладаваше нисък процент на аберантната клетъчна линия (4-10%), лицата от мъжки пол, показание – инфертилитет. Всички намерени структурни аберации в мозаични форми са представени в таблица 13.

Таблица 13. Пациенти със структурни аберации-мозаична форма

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

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

В 6 пациента (случаи № 1, №2, №3, №5, №6 и №7) се касаеше за нискостепенен мозаицизъм. Значението за репродуктивния изход при нисък процент на аберантната клетъчна линия може да бъде спорно преценено, като спорадично явление - резултат от влияние на външен фактор (в т.ч. технически артефакт); мутагени с ендегенен произход (например, при някои автоимунни заболявания или нарушен обмен на витамин В₁₂); вътрешни фактори (семеина предразположеност) (9). В някои случаи мутагенния етиологичен фактор не може да бъде идентифициран, и тогава възникналите нарушения се определят като спонтанно възникнали, а не индуцирани (9). Литературните данни и номенклатура не дават ясен праг за процентът на клетките с аберантен каротиоп считащ се за хромозомно отклонение със значение за репродукцията (116). Приетият от нас протокол (виж Методи) за наличие на минимум две клетки от една и съща патологична клетъчна линия ни позволи да потвърдим принадлежността на находките при тези пациенти като хромозомно отклонение.

4.2.2.3. Комбинирани хромозомни нарушения

Комбинираните хромозомни нарушения включват наличие едновременно на структурни и бройни промени в даден пациент. В изследваните от нас пациенти с РН, бяха открити три лица със съчетание от бройни и структурни хромозомни нарушения (таблица 14). И тримата пациенти са от женски пол. Нямаме данни за произхода на структурното хромозомно преустройство в тези комбинирани нарушения.

Таблица 14. Пациенти с комбинирани хромозомни нарушения

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

Интересен е случаят с повод за изследване родено дете с хромозомна болест, (синдром на Даун), в чийто кариотип едновременно с допълнителна хромозома 21, се установява и условно балансирана транслокация t(2;9) във всички анализирани метафази. При изследване на родителите, носител на структурното преустройство в пълна форма се оказва майката; нещо повече, в 20% от анализирани метафази се установи и втора, патологична линия с монозомия X (случай №1). Условно е прието, че на хромозомно ниво структурни преустройства нямат излишък или загуба на наследствен материал и съответно фенотипен ефект – т.н. балансирани хромозомни аномалии. Въпреки, че се приемат за благоприятни, натрупващи се в семействата, имащи почти пълна липса на фенотипна изява (185), голяма част от публикуваните балансирани хромозомни преустройства са на индикирани / засегнати индивиди. Откриването им при двойки с РН е в подкрепата на хипотезата за „условна“ балансираност и необходимост от търсене молекулни данни за това (24).

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

Разпределение на откритите структурни хромозомни аберации (в ПФ) според групата на репродуктивното нарушение за двата пола са представени в таблица 15.

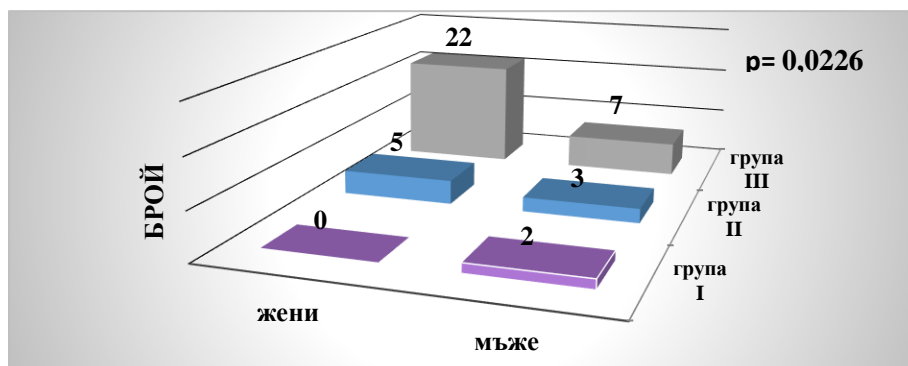
Таблица 15. Разпределение на пациентите по вид на структурната аберация, пол и групи

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

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

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

Водещо място сред структурните хромозомни нарушения са **реципрочните транслокации** отново в група III репродуктивно нарушение (фиг.19). По отношение на пола от пациентите с реципрочни транслокации, в група III превес имат **жените** спрямо мъжете, доказано чрез точния тест на Фишър ($p=0,0214$), докато по отношение на група II не се намери статистически значима връзка между пола и броя на реципрочните транслокации ($p=0,7258$). Не открихме реципрочна транслокация при жени с инфертилитет. Сравнителният анализ за всички групи показва статистическа значимост в полза на жените като носители на реципрочни транслокации ($p=0,0226$, Фишър тест).



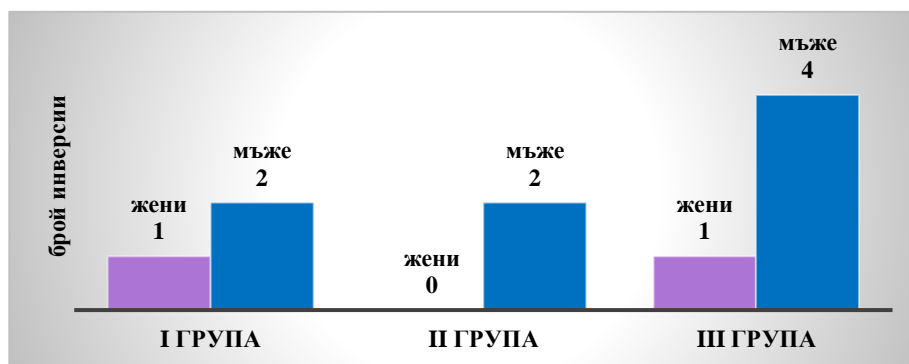
Фигура 19. Разпределение на пациенти с установени реципрочни транслокации по група репродуктивно нарушение

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

набор е около 12% при жена - носител на балансирана транслокация и 5% ако тя е налична при мъжа (10,57).

По отношение на Робертсонова транслокация (таблица 15) не установихме зависимост по група репродуктивно нарушение ($\chi^2=1,200$; $p=0,5448$) или пол ($p=0,3861$) според точния тест на Фишър). Множество научни съобщения посочват, че хромозомното нарушение може да повлияе сперматогенезата в т.ч. олигоспермия и невъзможност за бременност (инфертилитет) (19,117,140,164). При жени носители на Робертсонови транслокации *Keymolen K, et al.*, докладват резултати с небалансиран хромозомен набор в 10,3% от изследани хорионни вѐси и 5,9% - от амниоцентези, докато при мъже носители, тези цифри са съответно 3,6% и 0%. В същото проучване, в 52,7% от тези жените се е стигнало до раждане на здраво дете (96). Според данните от нашето проучване, половината от мъжете (50% или 2/4), както и 37,5% от жените (3/8) с Робертсонова транслокация бяха от група I с инфертилитет. При мъже-носители, със запазена фертилност, съществува, макар и изключително нисък риск (<1%) за живородено дете с хромозомна болест.

При другият вид балансирано хромозомно преустройство (инверсия) преобладаваха отново пациенти с комбинирани РН - група III (фиг.20)



Фигура 20. Разпределение на намерените инверсии по групи

Въпреки 4 пъти по-големия брой мъже (8 мъже) спрямо жени (2 жени) носители на инверсии намерени в нашата извадка, както и факта, че повече от половината инверсии са от група III (5/8), при анализа на хипотези не се установи статистически свързана зависимост по пол и групи ($\chi^2= 0,8333$, $p=0,6592$) (фиг.21).



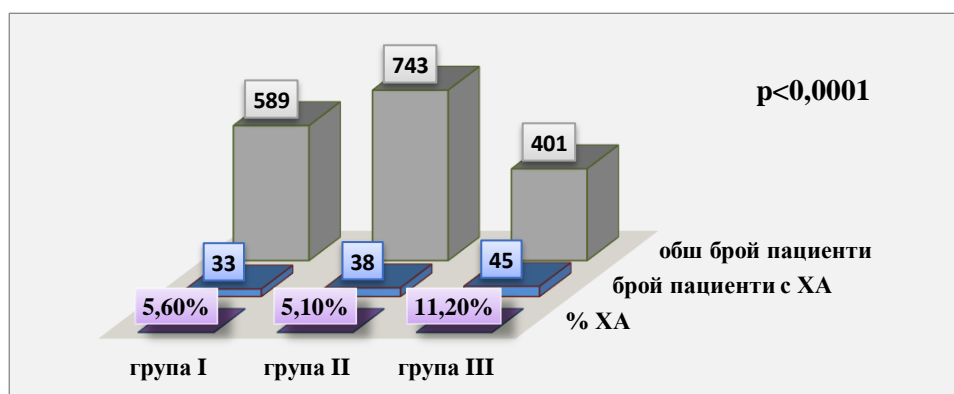
Фигура 21. Статистическа зависимост на инверсиите по пол и групи

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

- в болшинство си (57,1% т.е.40/70) ангажират лица от *женски* пол;
- голямото си болшинство (88,6%) т.е. 62/70 са представени в *пълна* форма; процентът при жените (61,3% или 38/62 лица) е статистически значимо по-висок ($p<0,0001$);
- Балансираните *транслокации* са най-често откриваната структурна хромозомна аберация (72,9% т.е. 51/70 от всички структурни преустройства), като реципрочните транслокации са около три пъти повече от Робертсоновите и при двата вида статистически значимо доминира женски пол ($p=0,009$); Най-често срещаната Робертсонова транслокация е между хромозома 13 и хромозома 14 (50% или 6/12);
- Инверсиите са по-висок процент спрямо този в нормалната популация със статистическа значимост ($p<0,001$) без статистически значима разлика в двата пола $p=0,06$;
- Според групата на репродуктивно нарушение преобладават пациентите от група III (64,5% или 40/62), статистически значимо по-висок ($p<0.0001$);

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

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



Фигура 22. Разпределение на пациентите с хромозомни нарушения по групи

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

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

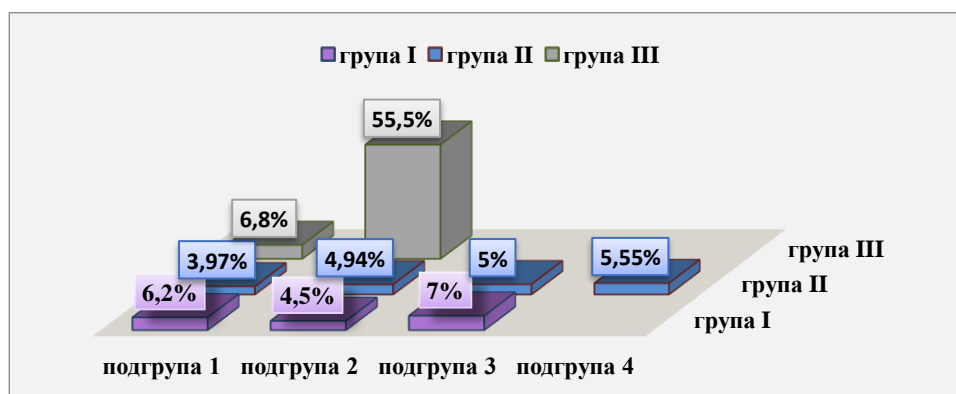
При сравнителен анализ на честотата на хромозомните аберации, намерени при двойки от група с повтарящи се СПА и такива с инфертилитет (с или без АРТ) *Stern C, et al. u Mozdarani H, et al.*, докладват два пъти повече хромозомни нарушения при двойките с повтарящи се аборти спрямо тези с инфертилитет,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

По отношение разпределението на хромозомните аберации по подгрупи данните са:

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

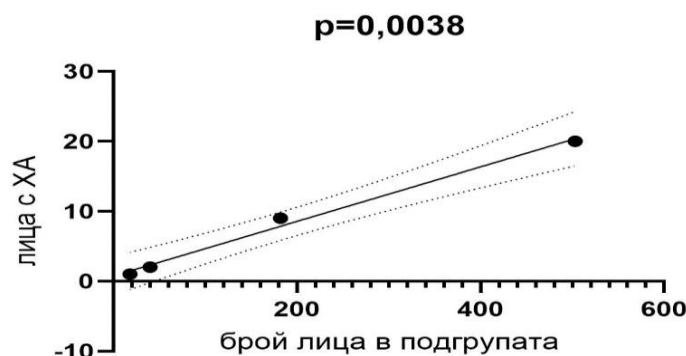
Група II: подгрупа 1 (с 2 СПА) – 20 лица (3,97%; 20/503); подгрупа 2 (с 3 СПА) - 9 лица (4,94%; 9/182); подгрупа 3 (с 4 СПА) – 2 лица (5%; 2/40); подгрупа 4 (с 5 и > СПА) – 1 лице (5,55%; 1/18).

Група III: подгрупа 1 (КРИ) - 25 лица (6,8%); подгрупа 2 (фамилно хромозомно преустройство) – 20 лица (55,5%) (фиг.23).



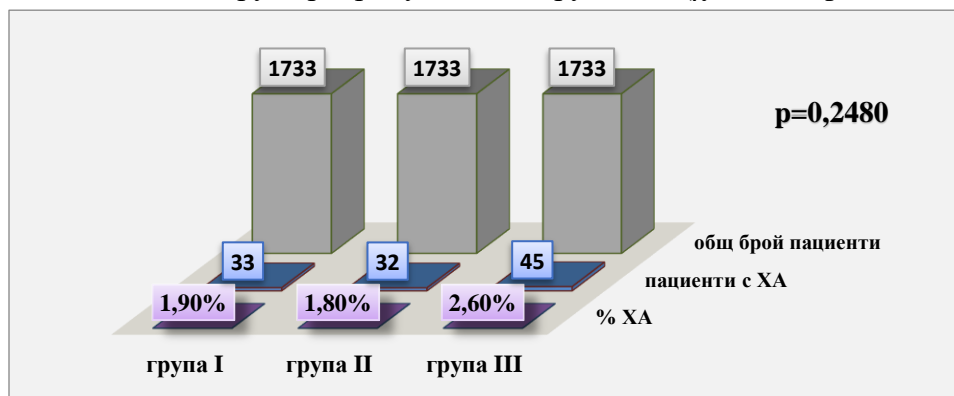
Фигура 23. Разпределение на ХА по подгрупи

Внимание привличат подгрупите от група II. Съгласно литературните данни, честотата на хромозомните нарушения нараства с броя СПА (13,63,70,147,167). *Sider D, et al, Gaboon NEA, et al.*, и *Ghazaey S, et al.*, съобщават за следните резултати по подгрупи при 2 СПА, 3 СПА, 4 СПА и ≥ 5 СПА: 6%, 10,2%, 7,4%, 11,1% (167); 4,4%, 6%, 8,3%, 13% (63); 11%, 15%, 15%, 21,2% (70). *Pokale YS, et al.* (147), също намират по-висок процент хромозомни аберации при двойки с ≥ 4 СПА (9,1%) в сравнение с тези с 3 СПА (4,7%), а *Yu MY, et al.* (201) отчитат сигнификантно по-голям процент хромозомни преустройства в двойки с ≥ 4 СПА (4,9%, $p < 0,01$). На базата на своите проучвания, тези автори достигат до извода, че **при двойки със спонтанни аборти, процента на намерените хромозомни аберации нараства с броя на абортите** ($p=0,005$) (13,63,70,147,167,201). В нашето изследване се наблюдава подобна закономерност - с 2 СПА в 3,97%; с 3 СПА в 4,94%, с 4 СПА в 5%; и с ≥ 5 СПА в 5,55%. Това беше потвърдено чрез проведения регресионен анализ (линейна регресия) и установената статистическа значимост ($p=0,0038$; $p < 0,05$), водещи до извода, че с нарастване на броя на СПА нараства и вероятността за наличието на ХА (фиг.24).



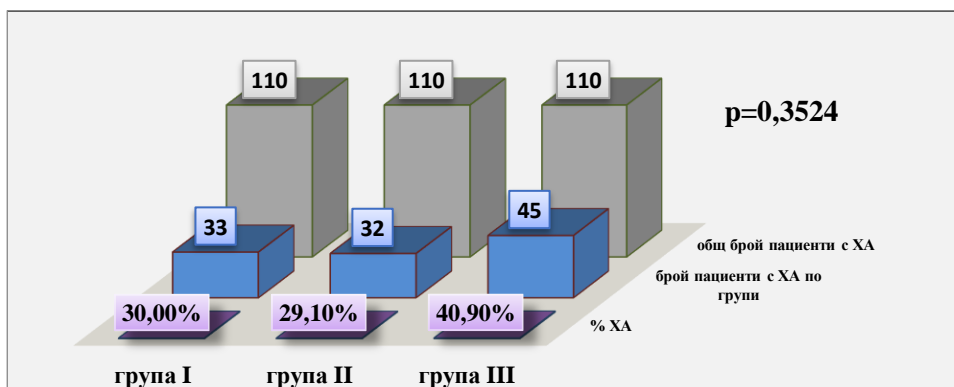
Фигура 24. Статистически анализ за брой СПА/брой ХА

Разпределението на хромозомните нарушения спрямо общия брой изследвани пациенти ($n=1733$), по групи, **не показва статистически свързана зависимост** между установената патология и група репродуктивно нарушение ($\chi^2=2,789$; $p=0,2480$) (фиг.25).



Фигура 25. Сравнение на пациентите с ХА по групи спрямо цялостната изследвана група

Разпределението на хромозомните нарушения спрямо броя на пациентите с намерена патология (n=110), по групи отново, **не показва статистически свързана зависимост** между установената патология и група на репродуктивно нарушение ($\chi^2= 2,086$, $p= 0,3524$) (фиг.26).

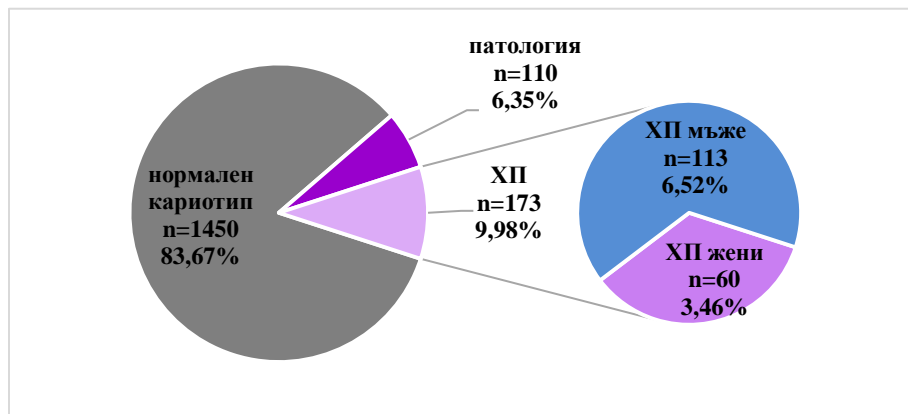


Фигура 26. Сравнение на пациентите с ХА по групи спрямо общия брой пациенти с ХА

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

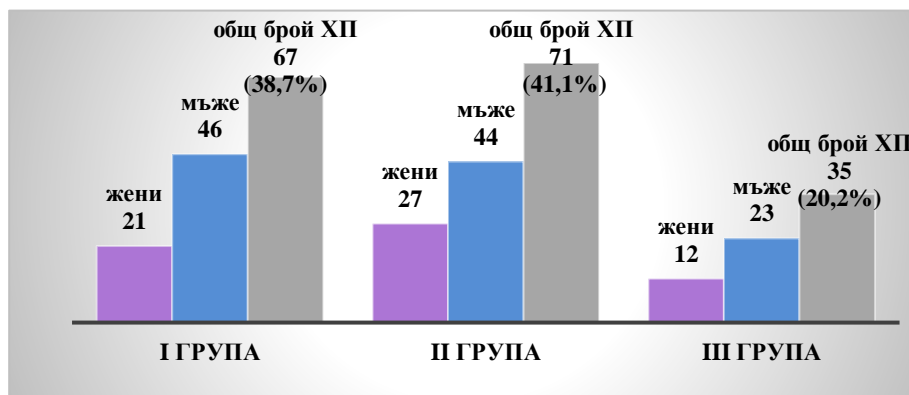
4.2.5. ХРОМОЗОМЕН ПОЛИМОРФИЗЪМ

От изследваните 1733 пациента с РН, в 173 е намерен хромозомен полиморфизъм (ХП) (9,98%) (фиг.27). Тази стойност е близка до цитираната по литературни данни (10-15%) (15,199). Касае се и за два пъти по-висока честота спрямо нормалната популация, където полиморфни варианти се срещат в 2-5% (15,199). Ние установяваме, че намереният от нас процент на полиморфизъм е **статистически значимо по-висок от установения в нормалната популация ($t=9$; $p<0,001$)** при прилагане на t-test за сравняване на относителен дял от извадка и нормалната популация (генерална съвкупност). **Мъжете показват почти два пъти повече полиморфизми (113/173; 6,52%)** отколкото жените (60/173; 3,46%), установено чрез Фишър тест ($p=0,0001$). Тази тенденция е еднопосочна с данните от литературата (190), където се приема, че това се дължи на наличието на различни варианти в Y-хромозомата, които имат неблагоприятен ефект върху сперматогенезата и негативно отражение на изхода от АРТ процедурите.



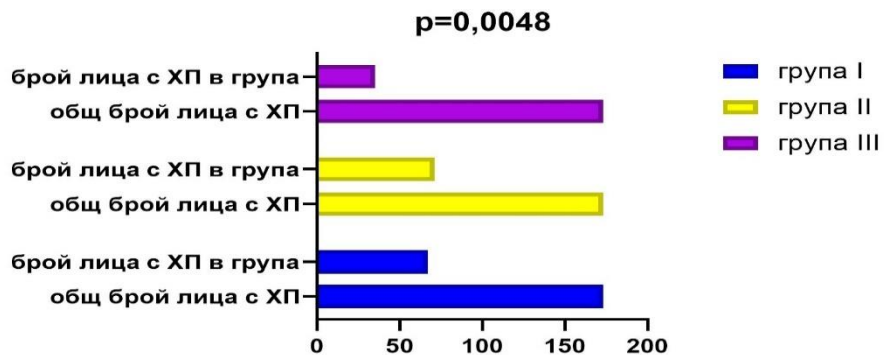
Фигура 27. Разпределение на пациентите с полиморфизъм по пол

Сред лицата с установен ХП най-голям е дялът на тези, принадлежащи към **група II** (аборти) - 41,1% (71/173); близко следвани от група I (инфертилитет) - 38,7% (67/173) и най-малко в група III с комбинирана репродуктивна история - 20,2% (35/173) (фиг.28).



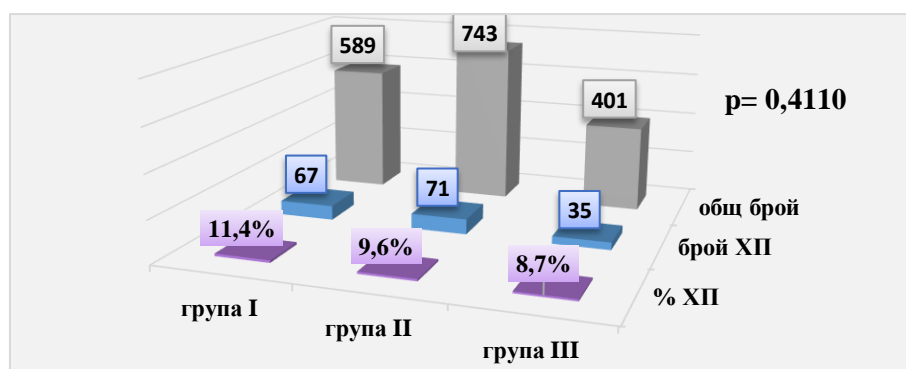
Фигура 28. Разпределение на пациентите с установени ХП по група репродуктивно нарушение и пол

По отношение на получените стойности по групи отнесени към общия брой намерени ХП в изследваната извадка, анализът на статистически хипотези **установи статистическа значима зависимост** между груповата принадлежност и намерения ХП ($\chi^2=10,68$; $p=0,0048$) (фиг.29).



Фигура 29. Статистическа свързана зависимост между груповата принадлежност и установения ХП

Делът на лицата с ХП, отнесен към общия брой изследвани пациенти от всяка група, е най-висок в **група I** - 11,4% (67/589); следвани от в група II - 9,6% (71/743); и група III - 8,7% (35/401). Сходен резултат за **група I** - 11,7% съобщават *Turan GA, et al.* (190). По отношение на резултатите докладвани за другите две групи, обаче, отчитаме разлика – нашите стойности са трикратно по-високи за група II (9,6% спрямо 2,9%), и обратно двукратно по-ниски за лицата от група III (8,7% спрямо 17,7%). Повишеното отчитане на полиморфизми в това проучване, авторите обясняват с наличие на механизъм включващ транскрипционна активация на гени в хетерохроматиновите региони на хромозомите, който може да бъде отговорен за асоциирането на полиморфните варианти с дадено клинично състояние чрез включване на епигенетични механизми на генна регулация и контрол (190). В този случай анализът на статистически хипотези **не установи статистически значима зависимост** между груповата принадлежност и установения ХП ($\chi^2=1,778$, $p=0,4110$) (фиг.30).



Фигура 30. Разпределение на намерените полиморфизми по групи и тяхното процентно съотношение спрямо броя пациенти в групата

От **група I** най-висок е делът на лицата с ПМ в **подгрупа 3 (мъжки фактор)** - 21% (12/57 пациента); докато в подгрупа 2 (пациенти с АРТ) те са 12% (27/224), а в подгрупа 1 (без АРТ) те са 9,6% (28/308). Анализът на хипотези показва **сигнификантно** по-висока честота на намерените хромозомни полиморфизми в **подгрупа 3** спрямо останалите подгрупи ($\chi^2=10,85$, $p=0,0044$) (таблица 16). Този резултат корелира и с данните от други подобни проучвания (74,126,135,148).

Таблица 16. Разпределение на лицата с разкрит ХП в зависимост от групата и подгрупата репродуктивно нарушение

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

От **група II**, най-висок е дялът лицата с ПМ в **подгрупа 3** (с 4 СПА) - 22,5% (9/40) и **подгрупа 4** (с 5 СПА) - 22,3% (4/18). В подгрупа 2 (с 3 СПА) - процента е 12,6% (23/182), а в подгрупа 1 (с 2 СПА) – 6,9% (35/503) (таблица 16). На базата на анализа на хипотези може да се заключи, че в нашата извадка с **нарастване броя на СПА** нараства и вероятността за откриване на ХП ($\chi^2=13,12$; $p=0,0044$).

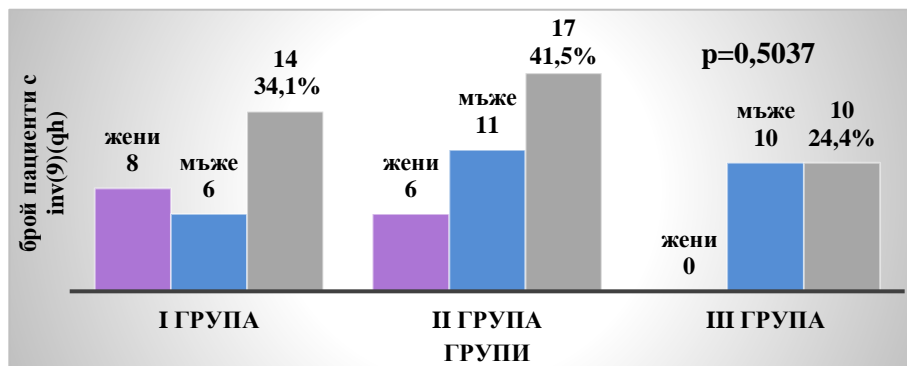
За **група III**, пациентите с комбинирана репродуктивна история показват хромозомен полиморфизъм в 8,5% (31/365), а при тези с фамилна обремененост в 11,1% (4/36). Тук не се установи статистическа закономерност в отделните подгрупи ($p=0,5481$).

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

Хромозомен полиморфизъм по хромозома 9

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

Най-много пациенти с inv(9)(qh) са установени в **група II** – 41,5% (17/41); следвани от група I - 34,1% (14/41) и група III – 24,4% (10/41). Намереният от нас по-висок процент при пациенти с повтарящи се СПА, корелират с все по-често съобщавани данни от други проучвания. Тази инверсия се асоциира основно с по-големия брой аборти, т.к. може да доведе до формирането на генетично небалансирани гамети в процеса на фертилизация (с летални делеции или големи дупликации), което води до СПА (53). При анализа на статистически хипотези обаче, **не се установи статистически значима зависимост** между броя на пациентите с установена inv(9)(qh) и принадлежността им към дадена група ($\chi^2=1,372$; $p=0,5037$) (фиг.31).



Фигура 31. Разпределение на пациентите с inv(9)(qh) по пол и групи.

Показанието за изследване, което категоризира групата на репродуктивно нарушение и кариотипа за пациенти от женски пол са представени в таблица 17. Интересен вариант е намерен в случай 6, жена с дългогодишен инфертилитет, при която се наблюдава завъртане само на центромерната част от дългото рамо на хромозома 9 (q11) и част от късото и рамо в точка p13.1. Това е по-рядко срещан вариант, който трудно се улавя с класическия цитогенетичен анализ. В своето проучване *Kosyakova N, et al.* описват тази и още много различни варианти на хромозома 9 установени чрез FISH анализ (102).

Таблица 17. Жени с inv(9)(qh)

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

Инверсия на хетерохроматиновия блок в хромозома 9 беше статистически значимо два пъти по-често откривана при мъже (n=27) спрямо жени (n=14) (p=0,0404, тест на Фишър). Показанието за изследване, което категоризира групата на репродуктивно нарушение и кариотипа за пациенти от мъжки пол са представени в таблица 18. При двама мъже, инверсията бе налична едновременно и в двете им хромозоми 9 - 46,XY,inv(9)(p11;q13),inv(9)(p11;q13) (случаи №7 и №22). По-рядко срещани са случаи 3 и 25, при които е засегнат p12 бенда, за който се предполагат наличие на няколко горещи

точки за рекомбинация. Освен това конституционните инверсии, засягащи перичентромерната област на хромозома 9 имат прекъсващи точки локализиращи в този регион. Именно констатацията на тези точки на прекъсване в региони с повтаряща се последователност, какъвто е 9p12, е важна и може да обясни защо подобни инверсии нямат клинични последици (175).

Таблица 18. Мъже с inv(9)(qh)

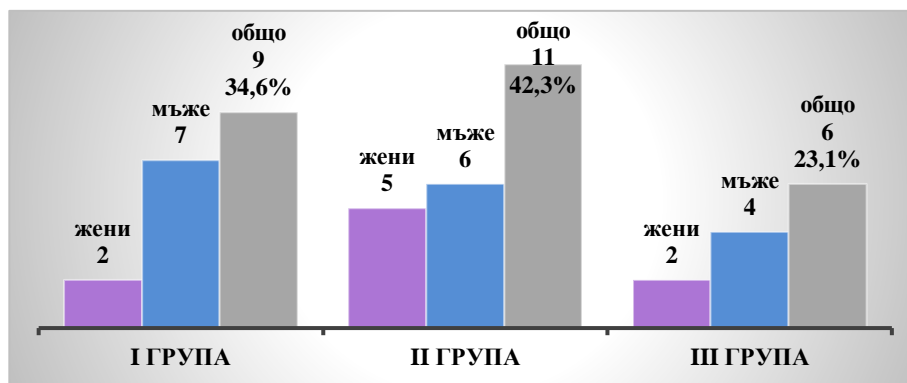
№	ПОКАЗАНИЕ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ	ГРУПА	КАРИОТИП
1	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
2	Фамилно хромозомно преустройство	III	46, XY, inv(9)(qh)
3	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(p12;q12)
4	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
5	4 СПА	II	46, XY, inv(9)(qh)
6	Плод със структурна аномалия	III	46, XY, inv(9)(qh)
7	2 СПА	II	46, XY, inv(9)(p11;q13);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

Хромозомен хетероморфизъм - разлика в големината на хетерохроматиновия блок в хромозома 9 (9qh+/-) беше намерена в 26 пациента с РН -15% (26/173). Преобладаваха пациентите с 9qh+ вариант (25 лица), а 9qh- вариант установихме само в 1 пациент. Делът и на двата варианта, установени сред всички пациенти с РН в нашето проучване е 1,44% (25/1733) за 9qh+ варианта и 0,05% (1/1733) за 9qh- варианта. Той е съпоставимо по-нисък от този цитиран в литературата в сродни проучвания – 3,67% за 9qh+ варианта по данни на *Gonçalves RO, et al.* (72) или съответно около 8% и < 1% по данни на

Starke H, et al. (175). Причината за установения от нас по-нисък процент по този ХП вероятно се дължи на факта, че в началото на обследвания период 9qh- вариантите не бяха отчитани и отразявани.

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

Най - много пациенти с ХП по големина на хетерохромативния блок в хромозома 9 беше установен отново **в група II** (42,3%) (фиг.32).



Фигура 32. Разпределение на пациентите с 9qh+/- по пол и групи

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

- Честотата на хромозомния полиморфизъм по хромозома 9 (inv(9)(qh) и 9qh+/-) е статистически значимо по-висок от този в нормалната популация (t=5,2; p<0,001);

- В нашето проучване за хромозомен полиморфизъм по хромозома 9 лицата от мъжки пол показват статистически значимо ($p=0088$, тест на Фишър) преобладаване над тези от женски пол (съответно 65,7% т.е. 44/67 лица) спрямо 34,3% т.е. 23/67 лица);
- Най-голям е дялът на лицата с полиморфизъм по хромозома 9 в група II (със СПА) - 41,8%, а най-нисък – в група III (24,4%).

Хромозомен полиморфизъм по Y хромозома

Y хромозомен полиморфизъм беше установен в **31** пациенти - **3,6%** (31/863 изследвани мъже с РН) или в **27,4%** (31/113 мъже с ХП). В нашата извадка той е представен единствено с вариации в дължината на Y хромозомата. От тях Yqh+ варианта заема **90,3%** от всички намерени полиморфизми по Y хромозомата (28/31), а Yqh- варианта – 9,7% (3/31), единствено при мъже с инфертилитет (група I) (случаи №25; №28 и №29). Не беше намерена инверсия в Y хромозомата.

Намереният в нашата извадка ХП по Y хромозомата по групи и подгрупи е предствен в таблица 19.

Таблица 19. Хромозомен полиморфизъм по хромозома Y при мъже с РН

№	ПОКАЗАНИЕ	ГРУПА	ПОД ГРУПА	КАРИОТИП
1	Инфертилитет -1 неуспешно АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
2	Инфертилитет - азооспермия	I	3	46,XY,Yqh+
3	Инфертилитет - 2 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
4	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
5	3 СПА	II	2	46,XY,Yqh+
6	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
7	Прекъсната бременност с ХБ на плода (синдром на Търнър)	III	1	46,XY,Yqh+
8	Родено дете с УМИ с неясна причина	III	1	46,XY,Yqh+
9	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
10	3 СПА	II	2	46,XY,Yqh+
11	Фамилно хромозомно преустройство	III	2	46,XY,Yqh+
12	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
13	Родено дете с ВА	III	1	46,XY,Yqh+
14	РН - мъртъв плод и 2 неуспешни АРТ	III	1	46,XY,Yqh+
15	2 СПА	II	1	46,XY,Yqh+
16	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
17	5 СПА	II	4	46,XY,Yqh+
18	Инфертилитет --1 неуспешно АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
19	Инфертилитет --3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
20	Инфертилитет	I	1	46,XY,Yqh+
21	Хабитуални аборти	II	4	46,XY,Yqh+
22	4 СПА	II	3	46,XY,Yqh+
23	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
24	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
25	Инфертилитет	I	1	46,XY,Yqh-
26	Инфертилитет - 2 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
27	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh+
28	Инфертилитет - азооспермия	I	3	46,XY,Yqh-
29	Инфертилитет - 3 неуспешни АРТ	I	2	46,XY,Yqh-
30	Инфертилитет - азооспермия	I	3	46,XY,Yqh+
31	3 СПА	II	2	46,XY,Yqh+

Най-голям е броят на мъжете с полиморфизъм по Y хромозома от група I (51,6%; 16/31); следван от група II (32,3%; 10/31); в група III – само при **5** мъже е намерен Yqh+ вариант (16,1%; 5/31). Анализът на хипотези **установи** статистически значима зависимост

между групата репродуктивно нарушение и броя на мъжете с полиморфизъм по Y хромозомата ($\chi^2 = 5,798$; $p = 0,05$).

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

Съгласно литературните данни, полиморфизмът по Y хромозомата е разпространен основно сред инфертилните мъже - 27,4% (199); 29,2% (123); 30,7% (132); 65,1% (73). Това корелира с резултатите от нашето изследване, където най-голям е броят на мъжете с установен Y хромозомен полиморфизъм в **групата с инфертилитет – 51,6% (16/31)**. За разлика от тези проучвания, обаче, които съобщават най-голям процент на Y-хромозомен полиморфизъм в групата с мъжки фактор (73,132,144), като *Minocherhomji S, et al.* (123) – 30,7%, в нашето бяха намерени само 3 мъже от тази подгрупа – 18,7%.

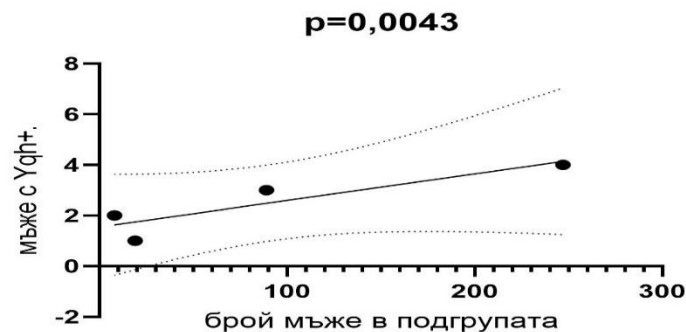
Най-често срещаната форма на полиморфизъм касае дължината на хетерохроматиновия регион на Y хромозомата, като в повечето доклади е намерен по-висок процент на **Yqh+** варианта: 91,9% (123); 86% (73); 90% (199); 100% (144). Подобно, и в нашето проучване, най-често срещаният вариант на Y хромозомата е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

Повишено присъствие на Y хромозомен полиморфизъм се докладва и в двойки с **повтарящи се СПА** (15,113,132). *An C, et al.*, съобщават честота на Y хромозомен полиморфизъм в 60,7% от мъжете сред такива двойки, като от тях, вариациите в дължината на Y хромозомата заемат 91,5% (15). В нашата извадка 1/3 от мъжете с установен полиморфизъм по Y хромозомата са от група II (с повтарящи се СПА) – 32,3% (10/31), всички с Yqh+ вариант. Два пъти по-ниския процент (32,3%) на Y хромозомен

полиморфизъм отчетен в групата с повтарящи се СПА в нашето проучване спрямо това на *An C, et al* (60,7%), се дължи на много по-големия брой изследвани от тях мъже от двойки с повтарящи се СПА (1543 мъже) спрямо тези от настоящата извадка (363 мъже). Близък до нашият процент (32,3%) съобщават *Madon PF, et al.*, (113) – 35,1%, като Yqh^+ варианта е представен в 80%. Някои автори докладващи резултати от хромозомни проучвания при инфертилни мъже с олигозооспермия и не-обструктивна азооспермия *Nagvenkar P, et al.*, (132), *Penna SV, et al.*, (144), смятат, че именно Yqh^+ варианта би могъл да се асоциира с повишен риск от аборт, като се има предвид ролята на хетерохроматина по време на мейоза. В нашето проучване се отчете и статистическа значима зависимост между Yqh^+ варианта и броя на СПА ($p=0,0043$).

В нашата извадка **български пациенти** не беше намерена $invY$, която е съобщавана често във връзка както с инфертилитета, така и с повтарящи се загуби на бременност. Подобно, *Penna et al. (144)* в проучването си върху испанска популация, също не намират инверсия в Y хромозомата, а само Yqh^+ вариант. Причината за това вероятно е, че тя е сравнително по-рядко срещан вариант в Европейската популация (166). На базата на нашия резултат не може да бъде изказано твърдение за връзка на този вариант с РН.

Интерес представляват данните от нашето изследване относно Yqh^+ варианта при лицата от група II, при разпределянето им на **подгрупи**. Беше установена зависимост, съгласно която вероятността за наличие на Yqh^+ варианта в мъжките партньори нараства с увеличаване броя на СПА в двойката: при 2 СПА - 1,6%; при 3 СПА - 3,4%; при 4 СПА - 5,3%; при 5 СПА - 25%. В достъпната за нас литература не намерихме данни за такава зависимост, но нашето наблюдение беше потвърдено чрез регресионен анализ (линейна регресия) с установена статистическа значимост ($p=0,0043$) (фиг. 33).



Фигура 33. Разпределение на Yqh^+ по подгрупи

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

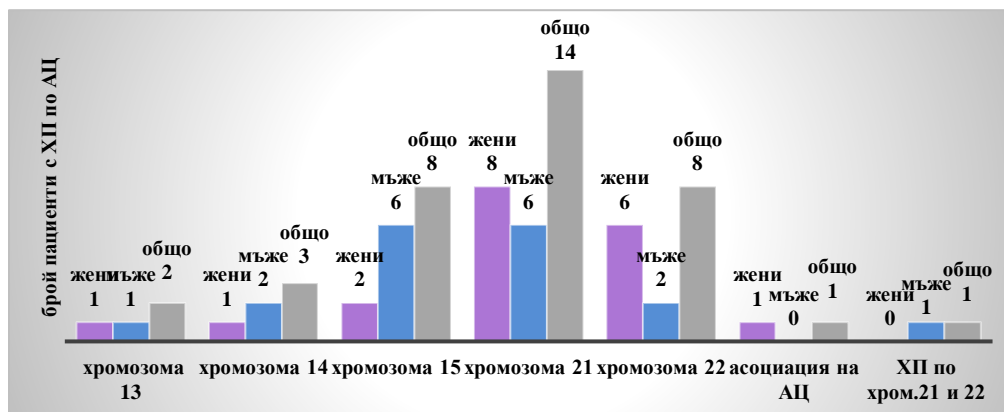
- Полиморфният Yqh^+ вариант е доминиращ - в 90,3% (28/31) над Yqh^- вариант; не беше установена инверсия в хетерохроматиновия блок на Y ($invY$);

- Най-голям е делът на мъжете с Y хромозомен полиморфизъм в група I (инфертилитет) – 51,6% (16/31), който е статистически значимо по-висок ($p=0,05$);
- С нарастване броя на СПА в двойката статистически значимо нараства вероятността за наличие на Yqh+ варианта ($p=0,0043$).

Хромозомен полиморфизъм по акроцентрични хромозоми

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

Най-често срещаният полиморфизъм по АЦ хромозоми при **жените**, е този по **хромозома 21 - 8 жени**, следвана от хромозома 22 - 6 жени (фиг.34). Единично представени са ХП по хромозома 13, 14 и 15. Тук интересен е случая на жена с установена склонност към асоциация на всички АЦ хромозоми във всички анализирани метафази. При **мъжете** полиморфизмът по **хромозома 21 и хромозома 15** показват **равен дял (по 6 мъже)** (фиг.34). По отношение на показанията за изследване за тези полиморфни варианта, най-голям е броят на мъжете от група II. По-рядко срещан е ХП по хромозома 13, 14 и 22. ХП едновременно по две акроцентрични хромозоми е намерен в един пациент. Показанието за изследване, което категоризира групата на РН и кариотипа за пациенти от мъжки и женски пол са представени в таблица 20. В една от изследваните двойки (родено дете със синдром на Rett и кариотип 46,XX,der(14p+), е намерен ХП по хромозома 14 и при двамата партньори (случай №3 от жените и №2 от мъжете в таблица 20).



Фигура 34. Разпределение на ХП според вида на АЦ хромозома и пол

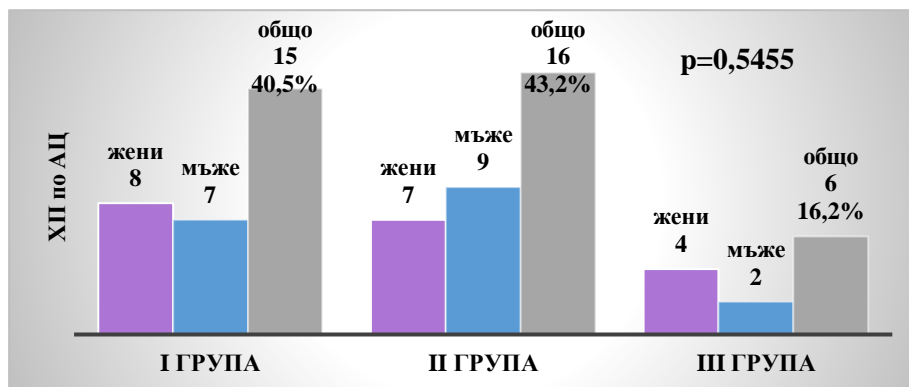
Таблица 20. Пациенти с ХП по АЦ хромозоми

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

Най-често срещания ХП е този по хромозома 21 (37,8% от всички варианти на АЦ хромозоми). Полиморфизмите по хромозома 15 и хромозома 22 показват еднакъв процент (по 21,6% или 8/37) (фиг.34).

При разпределението на този вид ХП по групи, групи I и II показват почти еднакво съотношение, съответно за група I - 15 пациента (40,5%) и за група II -16 лица (43,2%). В група III, пациентите с установен ХП по АЦ хромозоми са 6 (16,2%) (фиг.35). По литературни данни големите сателити в късите рамена на акроцентричните хромозоми могат да доведат до неправилна хромозомна сегрегация по време на мейозата и от там до загуба на плод, поради което имат по-голямо значение при изследване на двойки с

повтарящи се СПА (77). Това, обаче, не може да се потвърди категорично от нашите резултати, т.к. броя на пациентите с установен полиморфизъм по АЦ хромозоми е сходен както в групата с повтарящи се СПА, така и в тази с инфертилитет и не се установява статистически значима зависимост между тях ($\chi^2=1,212$; $p=0,5455$) (фиг.35).



Фигура 35. Разпределение на пациентите с XII по АЦ по пол и групи

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

Хромозомен полиморфизъм по хромозома 16

XII по хромозома 16 беше намерени при 22 пациенти (12,7%; 22/173) (несигнификантна разлика по пол според теста на Фишър $p=0,8266$). Това представлява 1,3% от всички изследвани от нас пациенти с РН (22/1733). Намерената честота е сходна с тази докладвана от *Turan GA, et al.* - 1,04% (190) и е по-висока от тази намерена при *Düzcan F, et al.* - 0,4% (55), *Mierla D, et al.* - 0,28% (122) и *Hussen DF, et al.* - 0,6% (82). Резултатите от нашето изследване, както и от тези в други проучвания потвърждава факта, че честотата на полиморфизмът по хромозома 16 е почти еднаква при пациенти с РН и нормалната популация – със силно вариращи граници от 0 до 6%. Това предполага, че този полиморфизъм почти няма ефект върху човешката репродукцията (146,171).

Показанието за изследване, което категоризира групата на репродуктивно нарушение, група и кариотипа за пациенти с полиморфизъм по хромозома 16 са представени в таблица 21.

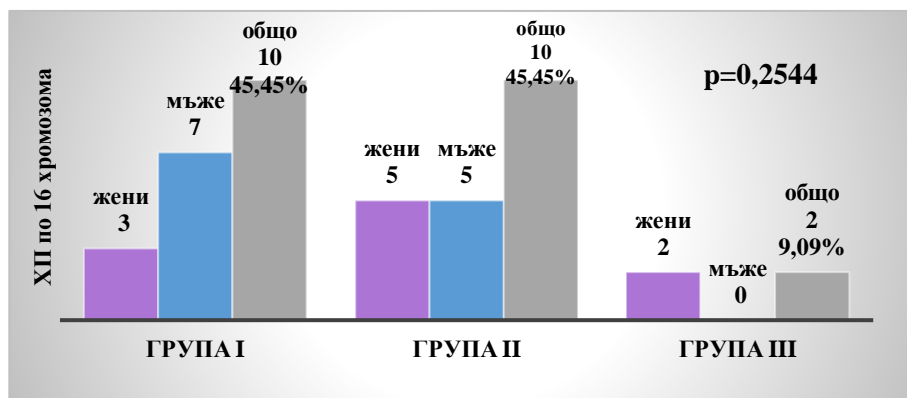
Таблица 21. Пациенти с ХП по хромозома 16

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

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

При разпределението на пациентите с установен полиморфизъм в хромозома 16 по групи, беше установено, че в групи I и II броя на лицата е равен – по 10 пациента (10/22; 45,45%), докато в група III – бяха намерени само 2 жени с 16qh+ (2/22; 9,09%) (фиг.36).

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



Фигура 36. Разпределение на пациентите с ХП по хромозома 16 по пол и групи

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

Хромозомен полиморфизъм по хромозома 1

В нашето проучване броят на пациентите с полиморфизъм по хромозома 1 е най-малък, и то единствено с 1qh+ варианта – 12 лица. Това бяха 6,9% (12/173) или 0,7% (12/1733). Намереният от нас дял от 0,7%, отнесен към цялата извадка, е сходен и е в границите на честотата докладвана от други проучвания - 0,4% (55) до 1,83% (199).

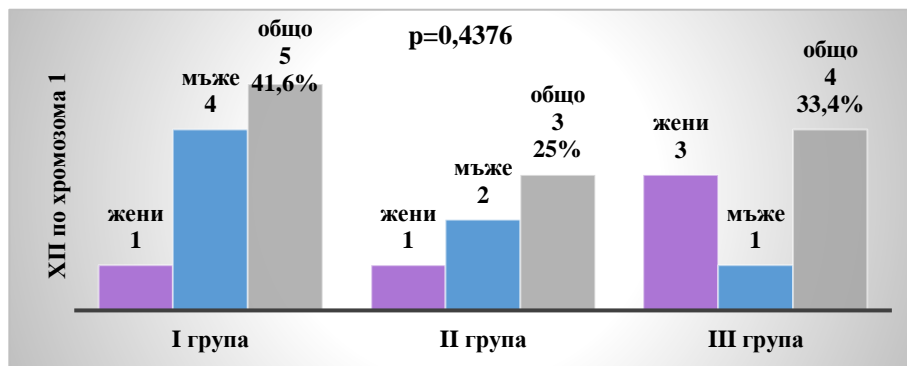
Всички намерени полиморфизми по хромозома 1 по пол, групи и са представени в таблица 22.

Таблица 22. Пациенти с ХП по хромозома 1

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

Не бяха намерени 1qh- и inv(1)(qh) варианти.

При анализирането им по групи, тези пациенти се разпределят по следния начин: група I – 5 лица (41,7%); група II – 3 лица (25%); група III – 4 лица (33,4%). Не се установи статистическа значимост на зависимостта между полиморфизъм по хромозома 1 и група репродуктивно нарушение ($\chi^2=1,653$; $p=0,4376$) (фиг.37).



Фигура 37. Разпределение на пациентите с XII по хромозома 1 по пол и групи

По литературни данни, 1qh+ вариантът се среща с повишена честота при инфертилни жени и мъже с азооспермия, както и се асоциира с множество аборти (122,123). От нашите резултати не може да се изведе подобен извод, т.к. от групата с инфертилитет има само една жена с установен такъв полиморфизъм, а от 4 мъже с 1qh+ вариант само един е с азооспермия. От групата със СПА само един от пациентите е с повече от два СПА. Причината вероятно е разликата в размера на изследваните извадки и вида на репродуктивната неудача разглеждан в тези проучвания (изследване само на пациенти с инфертилитет (122) или на такива с повтарящи се СПА).

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

Хромозомен полиморфизъм по две различни хромозоми

Полиморфизъм едновременно по две хромозома беше намерен в двама от пациентите с РН - 46,XY,1qh+,Yqh+ (родено дете с ХБ - синдром на Патау) и 46,XX,1qh+,16qh+ (4 СПА). Наслагването на два полиморфни варианта, вероятно има утежняващо обстоятелство върху репродукцията.

Хромозомен полиморфизъм - рядко срещан

При две жени в изследваната от нас група пациенти с РН, беше намерен рядко срещан полиморфизъм засягащ **центромерните райони на хромозома 19 и хромозома 20** - 46,XX,19qcenh+ (2 СПА) и 46,XX,20pcenth+ (родено дете с ХБ - синдром на Търнър).

Обобщението на всички намерени полиморфизми е представено в таблица 23.

Таблица 23. Обобщение на ХП по пол и вид

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

Обобщение на ХП:

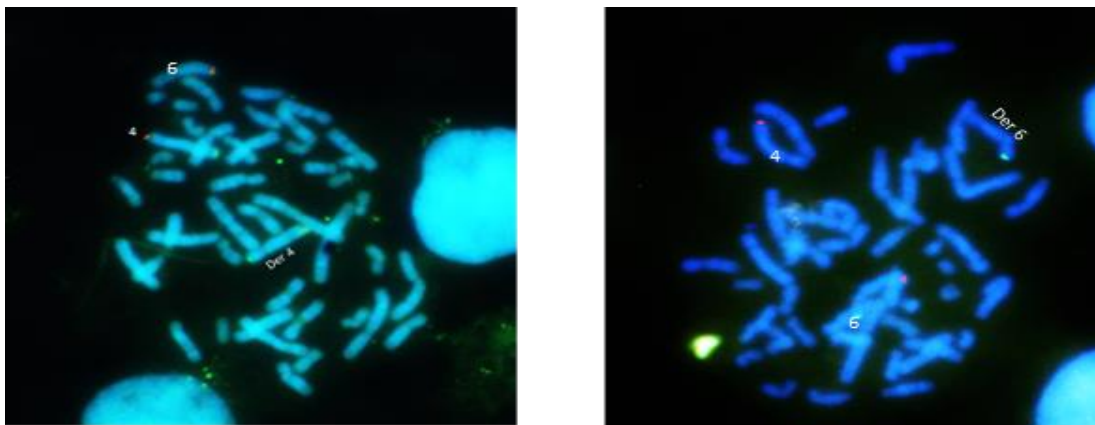
- ХП е намерен в 9,98% (173/1733) от изследваните пациенти с РН - статистически значимо по-висока честота в сравнение с нормалната популация ($t=9$; $p<0,001$); пациентите от мъжки пол показват статистически значимо два пъти повече полиморфност 6,52% спрямо женски пол 3,46% ($p=0,0001$);
- Полиморфизъм по хромозома 9 заема най-голям дял (38,7%; 67/173); инверсията на хетерохроматиновият блок е най-честа (61,2%; 41/67); проебладават лицата от мъжки пол (65,8%; 27/41); превес имат пациенти от група II (41,8%; 28/67);
- Полиморфизмът по Y хромозома при мъже е втори по честота: доминиращ е Yqh+ вариант (90,3%); със статистически значима зависимост при разпределението им по групи ($p=0,05$); в група II (повтарящи аборти) с нарастване броя на СПА статистически значимо нараства и вероятността за наличие на Yqh+ варианта ($p=0,0043$).
- Полиморфизмът по хромозома 1 и хромозома 16 е представен единствено с 1qh+ и 16qh+ варианти; от акроцентричните хромозоми, най-често срещаният е този по хромозома 21 - 37,8% (14/37);
- По отношение вида репродуктивно нарушение (групата), при съпоставяне към общия брой лица в групата, най-висока е честотата на хромозомния полиморфизъм при група I (инфертилитет) - 11,4% (67/589), следван от група II - 9,6% (71/743) и група III - 8,7% (35/401), без статистически значима зависимост ($p=0,4110$); при разпределението на намерения полиморфизъм по групи обаче, най-висок е процентът в група II (41,1%), следван от група I (38,7%) и група III (20,2%) при което се установена статистическа значима зависимост между тях ($p=0,0048$).

4.3. Молекулярно-цитогенетични изследвания за субтеломерни хромозомни преустройства

Субтеломерни хромозомни нарушения

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

Касае се за двойка с родено дете с хромозомна болест – 46,XX,der(4). Чрез микрочипова сравнителна геномна хибридизация (array CGH) в детето е установено допълнителен материал от *хромозома 6* върху дълго рамо на *хромозома 4*. Този резултат препоръчва провеждането на допълнителен анализ при родителите чрез субтеломерна цитогенетика. Установи се субтеломерно преустройство при бащата между хромозоми 4 и 6 (фиг.38) и нормален резултат при майката.



Фигура 38. Локус-специфична FISH при пациент 1 с използване на сонда за субтеломерните хромозомни региони на: А) *mix 04 - 4p* (зелен сигнал), *4q* (червен сигнал) Б) *mix 6 - 6p* (зелен сигнал), *6q*- (червен сигнал).

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

субтеломерно преустройство, както и на малката извадка от анализирани пациенти (20 лица).

В по-голяма част от проведените проучвания се потвърждава необходимостта и значимостта от търсенето на субтеломерни преустройства в пациенти с неизяснена етиология на повтарящи се СПА, в комбинация с мъртвородено и/или с дете с МВА и/или УмИ (35,71,75,93,125,150,194,200). Липсата или ниският процент на субтеломерни преустройства открити при други проучвания, кара някои автори да считат, че тези преустройства са редки и нямат съществен принос от приложение сред пациенти с множествени спонтанни аборта (27,44,56,88). Повечето от тях обаче, отчитат ролята им в случаите, когато една двойка, освен аборти, има и родени деца с малформации и/или УмИ, репродуктивни проблеми от комбиниран тип (27,44,56,125). Причината за това е че, носителите на балансирани хромозомни преустройства (в частност реципрочни транслокации) са фенотипно нормални, но преживяват повтарящи се неблагоприятни бременности, резултат от формирането на небалансирани гамети по време на мейозата. В болшинството случаи, този хромозомен дисбаланс в зиготите е несъвместим с живота, и води до неуспешна имплантация, спонтанен аборт, мъртвораждање или раждане на увредено дете в семейства, носители на такива. Малкият размер на хромозомните сегменти, участващи в субтеломерните транслокации, са малко вероятно да предизвикат само спонтанни аборти, но могат да бъдат отговорни за РН от комбиниран тип – ранни СПА и деца с МВА/УмИ и данни за хромозомна болест (35,71,75,93,125,150,194,200). На базата на това, авторите стигат до извода, че търсенето на субтеломерни балансирани преустройства чрез флуорисцентна ин ситу хибридизация в дадена двойка, трябва да се провежда само след зачеването на плод и/или раждането на дете с характеристика на хромозомна болест (194).

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

ИЗВОДИ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер:

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

Приноси с потвърдителен характер:

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

Приноси с приложен характер:

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

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ ПО ТЕМАТА

Научни публикации в пълен текст по темата на дисертационния труд:

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

Научни съобщения по темата на дисертационния труд

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

БИБЛИОГРАФИЯ

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

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

33. Boue A, Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn.* 1984;4(7):45–67.
34. Braekeleer MD, Dao T-N. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* [Internet]. 1990 Jul 1;5(5):519–28. Available from: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137135>
35. Bruyere H, Rajcan-Separovic E, Doyle J, Pantzar T, Langlois S. Familial cryptic translocation (2;17) ascertained through recurrent spontaneous abortions. *Am J Med Genet Part A.* 2003;123(3):285–9.
36. Bui T-H, Blennow E, Nordenskjöld M. Prenatal diagnosis: molecular genetics and cytogenetics. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002;16(5):629–43.
37. Campana M, Serra A, Neri G, Reynolds JF. Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: a study of 269 balanced translocations. *Am J Med Genet.* 1986;24(2):341–56.
38. Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma.* 1970; 30(2):215–27.
39. Celep F, Karagüzel A, Özeren M, Bozkaya H. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;127(1):106–9.
40. Chandley AC, Edmond P, Christie S, Gowans L, Fletcher J, Frackiewicz A, et al. Cytogenetics and infertility in man* I. Karyotype and seminal analysis: Results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Ann Hum Genet.* 1975;39(2):231–54.
41. Chelly J. MRX review. *Am J Med Genet.* 2000;94(5):364–6.
42. Çirakoğlu A, Yılmaz Ş, Kuru D, Tarkan-Argüden Y, Güven GS, Deviren A, et al. Structural chromosomal abnormalities in couples with recurrent pregnancy loss. *Turkiye Klin J Med Sci.* 2010;30(4):1185–8.
43. Clementini E, Palka C, Iezzi I, Stuppia L, Guanciali-Franchi P, Tiboni GM. Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod.* 2005;20(2):437–42.
44. Cockwell AE, Jacobs PA, Beal SJ, Crolla JA. A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities. *Hum Genet.* 2003;112(3):298–302.
45. Cooper JP. Telomere transitions in yeast: the end of the chromosome as we know it. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(2):169–77.
46. Coulam CB. Unexplained recurrent pregnancy loss: epilogue. *Clin Obstet Gynecol.* 1986;29(4):999–1004.
47. Cousens S, Blencowe H, Stanton C, Chou D, Ahmed S, Steinhardt L, et al. National, regional, and worldwide estimates of stillbirth rates in 2009 with trends since 1995: a systematic analysis. *Lancet.* 2011;377(9774):1319–30.
48. Crosignani PG, Fraccaro M, Rubin BL. Genetic control of gamete production and function. Vol. 3. Academic Press; 1982.
49. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet.* 1997;72(4):468–77.
50. Cyrus A, Malihea K, Farideh F. Cytogenetic studies among Iranian infertile men: The first 20-year long-term report. *African J Biotechnol.* 2012;11(37):8973–8.

51. de Kretser DM. Male infertility. *Lancet* [Internet]. 1997 Mar 15;349(9054):787–90. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)08341-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)08341-9)
52. Değirmenci B, Solak M, Yildiz SH, Erdogan MO, Elmas M, Fistik T. Evaluation of cytogenetic and y chromosome microdeletion analyzes in infertile cases. *Meta Gene*. 2019;19:78–81.
53. Demirhan O, Pazarbaşı A, Suleymanova-Karahan D, Tanriverdi N, Kılınc Y. Correlation of clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 and genetic counseling. 2008;
54. Dutta UR, Rajitha P, Pidugu VK, Dalal AB. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in Southern region of India: Report and review. *J Assist Reprod Genet*. 2011;
55. Düzcan F, Atmaca M, Cetin GO, Bağcı H. Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003;82(1):53–6.
56. Fan Y, Zhang Y. Subtelomeric translocations are not a frequent cause of recurrent miscarriages. *Am J Med Genet*. 2002;109(2):154.
57. Farcas S, Belengeanu V, Popa C, Stoicanescu D, Stoian M, Veliscu M, et al. Role of chromosomal translocations in recurrent spontaneous abortion. *Timisoara Med J*. 2007;2:117–21.
58. Feuerbach F, Galy V, Trelles-Sticken E, Fromont-Racine M, Jacquier A, Gilson E, et al. Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat Cell Biol*. 2002;4(3):214.
59. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* [Internet]. 2009; 2(2):76–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19609401>.
60. Franssen MTM, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PMM, Knegt AC, Gerssen-Schoorl KBJ, et al. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *bmj*. 2005;331(7509):137–41.
61. Frenster JH, Herstein PR. Gene de-repression. *N Engl J Med*. 1973;288(23):1224–9.
62. Fryns J, Van Buggenhout G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998;81(2):171–6.
63. Gaboon NEA, Mohamed AR, Elsayed SM, Zaki OK, Elsayed MA. Structural chromosomal abnormalities in couples with recurrent abortion in Egypt. *Turkish J Med Sci*. 2015;45(1):208–13.
64. Gadow EC, Lippold S, Otano L, Serafin E, Scarpati R, Matayoshi T. Chromosome rearrangements among couples with pregnancy losses and other adverse reproductive outcomes. *Am J Med Genet*. 1991;41(3):279–81.
65. García-Peiró A, Oliver-Bonet M, Navarro J, Abad C, Guitart M, Amengual MJ, et al. Sperm DNA Integrity and Meiotic Behavior Assessment in an Infertile Male Carrier of a 9qh. *Biomed Res Int*. 2010;2011.
66. Gardner RJ. M, Sutherland GR, Shaffer LG. Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York, Oxford University Press; 2004.
67. Gazvani, M. Rafet, et al. "Evaluation of the role of mitotic instability in karyotypically normal men with oligozoospermia." *Fertility and sterility* 73.1 (2000): 51-55.

68. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, et al. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod.* 2001;16(1):82–90.
69. Gersen SL, Keagle MB, Gersen S, Keagle M. *The principles of clinical cytogenetics.* Springer; 2013.
70. Ghazaey S, Keify F, Mirzaei F, Maleki M, Tootian S, Ahadian M, et al. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions in northeastern iran. *Int J Fertil Steril.* 2015;9(1):47.
71. Giardino D, Finelli P, Gottardi G, Clerici D, Mosca F, Briscioli V, et al. Cryptic subtelomeric translocation t (2;16)(q37;q24) segregating in a family with unexplained stillbirths and a dysmorphic, slightly retarded child. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(12):881–6.
72. Gonçalves RO, Santos WVB, Sarno M, Cerqueira BAV, Gonçalves MS, Costa OLN. Chromosomal abnormalities in couples with recurrent first trimester abortions. *Rev Bras Ginecol e Obs.* 2014;36(3):113–7.
73. Guo T, Qin Y, Gao X, Chen H, Li G, Ma J, et al. The role of male chromosomal polymorphism played in spermatogenesis and the outcome of IVF/ICSI-ET treatment. *Int J Androl.* 2012;35(6):802–9.
74. Hachmeriyan M., M.Zeleva, M.Tzvetkova, H.Duba. M.Maurer, V.Jotova, L.Angelova. Combination of Cri du Chat and partial trisomy 13 syndrome due to paternal balanced three way translocation – case report. 10th Balkan Congress of Human Genetics. 2nd Alpe Adria meeting of human genetics, Bled, Slovenia, 10-12 October 2013, Book of Abstracts, 101.
75. Hajlaoui A, Slimani W, Kammoun M, Sallem A, El Amri F, Chaieb A, et al. Subtelomeric rearrangements in patients with recurrent miscarriage. *Int J Fertil Steril.* 2018;12(3):218.
76. Hamada AJ, Esteves SC, Agarwal A. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia . Vol. 68, *Clinics . scielo* ; 2013. p. 39–60.
77. Hanif MI, Khan A, Arif A, Shoeb E. Cytogenetic investigation of couples with recurrent spontaneous miscarriages. *Pakistan J Med Sci.* 2019;35(5):1422.
78. Hassold TJ, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet.* 1984;18(1):69–97.
79. Hernández Uribe L, Hernández Marín I, Cervera-Aguilar R, Ayala AR. [Frequency and etiology of azoospermia in the study of infertile couples]. *Ginecol Obstet Mex* [Internet]. 2001;69:322-326. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/11599318>.
80. Hocquet D, Roux C, Collonge-Rame M-A, Fellmann F, Bresson JL. Bilan des examens chromosomiques de 277 couples candidats à l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde. *Andrologie.* 1999;9(4):505–10.
81. Houmaid H, El Bekkay C, Nassereddine S, Talbi H, Amehdare L, Hilali A. Chromosomal Abnormalities in 238 Couples with Recurrent Miscarriages in Morocco. *Open J Genet.* 2018;8(02):15.
82. Hussen DF, Hammad SA, Refaat KM, Ashaat EA, Aglan MS, Otaify GA, et al. Chromosomal aberrations and chromosomal heteromorphisms among young couples with recurrent spontaneous abortion. *Middle East J Med Genet.* 2019;8(1):48.
83. Hussen DF, Hammad SA, Refaat KM, Ashaat EA, Gaber KR, Aglan MS, et al. Screening for parental mitotic nondisjunction as a cause of fetal aneuploidy. *Middle East J Med Genet.* 2018;7(1):26.

84. Husslein P, Huber J, Wagenbichler P, Schnedl W. Chromosome abnormalities in 150 couples with multiple spontaneous abortions. *Fertil Steril.* 1982;37(3):379–83.
85. Hyde KJ, Schust DJ. Genetic Considerations in Recurrent Pregnancy Loss. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2015 Mar 1;5(3). Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/3/a023119.abstract>
86. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):411–26.
87. Jacobs PA, Klinger D. Paris conference (1971): Standardization in human cytogenetics. *Cytogenet Genome Res.* 1972;11:313–62.
88. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Lorentz CP, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, et al. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med.* 2003;5(1):28–34.
89. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *J Urol.* 2002;167(5):2138–44.
90. Jarvi K, Lo K, Fischer A, Grantmyre J, Zini A, Chow V, et al. CUA Guideline: The workup of azoospermic males. *Can Urol Assoc J [Internet].* 2010 Jun;4(3):163–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20514278>
91. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N, (SIGEP). O behalf of ESIG for EP. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod [Internet].* 2006 May 17;21(9):2216–22. Available from: <https://doi.org/10.1093/humrep/del150>
92. Jiang J, Fu M, Wang D. Cytogenetic analysis in 61 couples with spontaneous abortions. *Chin Med J (Engl).* 2001;114(2):200–1.
93. Joyce CA, Dennis NR, Howard F, Davis LM, Thomas NS. An 11p; 17p telomeric translocation in two families associated with recurrent miscarriages and Miller-Dieker syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(11):707–14.
94. Kalter H, Warkany J. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention. *N Engl J Med.* 1983;308(8):424–31.
95. Karakus N, Kara N, Tural S, Kocak I, Elbistan M. A retrospective study of balanced chromosomal translocations in a Turkish population. *Int J Hum Genet.* 2012;12(4):319–23.
96. Keymolen, K., Van Berkel, K., Vorsselmans, A., Staessen, C., & Liebaers, I. (2011). Pregnancy outcome in carriers of Robertsonian translocations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(10), 2381-2385.)
97. Khanna J, van Look PFA, Griffin PD, Activities UNF for P. Challenges in reproductive health research: biennial report: 1992-1993. World Health Organization; 1994.
98. Khudr G. Cytogenetics of habitual abortion: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 1974;29(5):299–310.
99. Knight SJL, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet.* 2000;37(6):401–9.
100. Knight SJL, Horsley SW, Regan R, Lawrie NM, Maher EJ, Cardy DLN, et al. Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which

- detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur J Hum Genet.* 1997;5:1–8.
101. Knight SJL, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, et al. An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):320–32.
 102. Kosyakova N, Grigorian A, Liehr T, Manvelyan M, Simonyan I, Mkrtychyan H, et al. Heteromorphic variants of chromosome 9. *Mol Cytogenet.* 2013;6(1):14.
 103. Kovacheva K, Kotsev R, Konova E, Rilcheva V, Kamburova Z, Simeonova M. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Bulgarian male with azoospermia or severe oligospermia. *J IMAB–Annual Proceeding Sci Pap.* 2018;24(4):2217–22.
 104. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):271–85.
 105. Kumar, R., Tanwar, M., Ammini, A. C., Kumar, R., Gupta, N. P., Sharma, R. K., & Dada, R. (2008). Robertsonian translocation and their role in pathogenesis of recurrent in vitro fertilization failure. *Medical Science Monitor*, 14(12), CR617-CR620.
 106. Lee JY, Dada R, Sabanegh E, Carpi A, Agarwal A. Role of genetics in azoospermia. *Urology.* 2011;77(3):598–601.
 107. Lee SY, Lee BY, Park JY, Choi EY, Lee YW, Oh AR, et al. Paracentric inversions found in prenatal diagnosis. *J Genet Med.* 2013;10(2):104–8.
 108. Lindsten JE, Klinger HP, Hamerton JL, Gefener ES. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978) ISCN (1978). *Cytogenet Cell Genet.* 1978;21:309–409
 109. Lippman-Hand A, Vekemans M. Balanced translocations among couples with two or more spontaneous abortions: are males and females equally likely to be carriers? *Hum Genet.* 1983;63(3):252–7.
 110. Lissitsina J. Cytogenetic causes of male infertility. 2011.
 111. Luckasson R, Borthwick-Duffy S, Buntinx WHE, Coulter DL, Craig EM (Pat), Reeve A, et al. *Mental retardation: Definition, classification, and systems of supports*, 10th ed. Washington, DC, US: American Association on Mental Retardation; 2002. xiii, 238–xiii, 238.
 112. Mackic-Djurovic M, Hasic S, Kiseljakovic E, Rukavina D, Ibrulj S. Cytogenetic Abnormalities Found in Patients with Reproductive Problems. *Med Arch.* 2017;71(6):396.
 113. Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(6):726–32.
 114. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med [Internet].* 2012/12/18. 2012;9(12):e1001356–e1001356. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23271957>
 115. Mau UA, Bäckert IT, Kaiser P, Kiesel L. Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997;12(5):930–7.
 116. McGowan-Jordan, J. (Ed.). (2016). *ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016); Recommendations of the International Standing*

- Human Committee on Human Cytogenomic Nomenclature Including New Sequence-based Cytogenomic. Karger.
117. McKinlay Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford Monogr Med Genet. 1996;29.
 118. Medicine PC of the AS for R. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril. 2008;89(6):1603.
 119. Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: an overview of genetic and non-genetic backgrounds. Int J Hum Genet. 2006;6(2):109–17.
 120. Meschede D, Lemcke B, Exeler JR, De Geyter C, Behre HM, Nieschlag E, et al. Chromosome abnormalities in 447 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection--prevalence, types, sex distribution and reproductive relevance. Hum Reprod. 1998;13(3):576–82.
 121. Mierla D, Stoian V. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. Maedica (Buchar). 2012;7(1):25.
 122. Mierla D, Stoian V. Chromosomal polymorphisms involved in reproductive failure in the romanian population. Balk J Med Genet. 2012;15(2):23–8.
 123. Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. Fertil Steril. 2009;92(1):88–95.
 124. Mitelman F. ISCN 1995: an international system for human cytogenetic nomenclature (1995): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tennessee, USA, October 9-13, 1994. Karger Medical and Scientific Publishers; 1995.
 125. Monfort S, Martínez F, Roselló M, Badia L, Prieto F, Orellana C. A subtelomeric translocation apparently implied in multiple abortions. J Assist Reprod Genet. 2006;23(2):97–101.
 126. Morales R, Lledó B, Ortiz JA, Ten J, Llácer J, Bernabeu R. Chromosomal polymorphic variants increase aneuploidies in male gametes and embryos. Syst Biol Reprod Med. 2016;62(5):317–24.
 127. More R, Borate S, Gangane SD. Cytogenetic Study in Couples with Primary Infertility. J Med Sci Clin Res. 2016;4(1):8941–4.
 128. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris M, Amice V, Le Martelot MT, Roche S, et al. Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature. Int J Androl. 2004;27(3):178–82.
 129. Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H. Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9)(p11q12)] on infertility. Indian J Hum Genet. 2007;13(1):26.
 130. Mozdarani H, Meybodi AM, Zari-Moradi S. A cytogenetic study of couples with recurrent spontaneous abortions and infertile patients with recurrent IVF/ICSI failure. Indian J Hum Genet. 2008;14(1):1.
 131. Naasse Y, Charoute H, El Houate B, Elbekkay C, Razoki L, Malki A, et al. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. BMC Urol. 2015;15(1):95.
 132. Nagvenkar P, Desai K, Hinduja I, Zaveri K. Chromosomal studies in infertile men with oligozoospermia & non-obstructive azoospermia. Indian J Med Res. 2005;122(1):34.

133. Najafi K, Gholami S, Moshtagh A, Bazrgar M, Sadatian N, Abbasi G, et al. Chromosomal aberrations in pregnancy and fetal loss: Insight on the effect of consanguinity, review of 1625 cases. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. 2019 Aug 1;7(8):e820. Available from: <https://doi.org/10.1002/mgg3.820>
134. Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M, et al. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol*. 2001;8(2):49–52.
135. Nakatsu SL, Masek MA, Landrum S, Frenster JH. Activity of DNA templates during cell division and cell differentiation. *Nature*. 1974;248(5446):334–5.
136. Nazmy, Nahla A. Cytogenetic studies of couples with reproductive failure in Alexandria, Egypt. *J Egypt Public Health Assoc*, 2008, 83.3-4: 255-271.
137. Neri G. Pericentric inversion of chromosome 9 and Down's syndrome: a retrospective and prospective family survey. *Clin Genet*. 1981;19:526–7.
138. Nguyen RHN, Wilcox AJ. Terms in reproductive and perinatal epidemiology: 2. Perinatal terms. *J Epidemiol Community Heal*. 2005;59(12):1019–21.
139. Niroumanesh S, Mehdipour P, Farajpour A, Darvish S. A cytogenetic study of couples with repeated spontaneous abortions. *Ann Saudi Med*. 2011;31(1):77–9.
140. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine e-book*. Elsevier Health Sciences; 2015.
141. Ogur, G., Van Assche, E., Vegetti, W., Verheyen, G., Tournaye, H., Bonduelle, M., ... & Liebaers, I. (2006). Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Molecular human reproduction*, 12(3), 209-215.
142. Osztovcics MK, Toth SP, Wessely JA. Cytogenetic investigations in 418 couples with recurrent fetal wastage. In: *Annales de genetique*. 1982. p. 232–6.
143. Panasiuk B, Danik J, Lurie I, Stasiewicz-Jarocka B, Lesniewicz R, Sawicka A, et al. Reciprocal chromosome translocations involving short arm of chromosome 9 as a risk factor of unfavorable pregnancy outcomes after meiotic malsegregation 2: 2. *Adv Med Sci*. 2009;54(2):203.
144. Penna SV, Araujo H, Ballesta F, Ballesca JL, Vanrell JA. Chromosomal abnormalities and polymorphisms in infertile men. *Arch Androl*. 2001;46(3):205–10.
145. Peschka B, Leygraaf J, Van der Ven K, Montag M, Schartmann B, Schubert R, et al. Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1999;14(9):2257–63.
146. Pokale Y, Khadke P. Cytogenetic studies of recurrent miscarriage-A review. *Int STD Res Rev*. 2016;1–18.
147. Pokale YS, Khade P. Evaluation and Contribution of Major Chromosomal Abnormalities in Couples with Recurrent Miscarriage. 2016;15(1):84–8.
148. Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B, et al. Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet*. 2002;111(1):31–9.
149. Prager P. States mandating insurance coverage for infertility and pregnancy loss: The international council on infertility information dissemination. Retrieved Novemb. 2003;28:2015.

150. Primerano A, Colao E, Vilella C, Nocera MD, Ciambrone A, Luciano E, et al. A cryptic balanced translocation (5; 17), a puzzle revealed through a critical evaluation of the pedigree and a FISH focused on candidate loci suggested by the phenotype. *Mol Cytogenet.* 2015;8(1):70.
151. Radoslava Emilova, Mihaela Mladenova AT and IB. Results from cytogenetic studies in patients with reproductive failure (a 20-year experience). In: 12th Balkan Congress of Human Genetics. Plovdiv, Bulgaria; 2017.
152. Rao B V, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K. Pericentric inversion of chromosome 9 [inv (9)(p12q13)]: Its association with genetic diseases. *Indian J Hum Genet.* 2006;12(3):129–32.
153. Raziell A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002;78(3):515–9.
154. Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R, Fox MF, Kotze GM, Brusnický J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet.* 1984;66(2–3):162–4.
155. Rosenbusch B. Somatic chromosomal abnormalities in couples undergoing infertility treatment by intracytoplasmic sperm injection. *J Genet.* 2010;89(1):105.
156. RPL EGG on, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod open.* 2018;2018(2):hoy004.
157. Rubio C, Pehlivan T, Rodrigo L, Simón C, Remohí J, Pellicer A. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview. *Am J Reprod Immunol.* 2005;53(4):159–65.
158. Sant-Cassia LJ, Cooke P. Chromosomal analysis of couples with repeated spontaneous abortions. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1981;88(1):52–8.
159. Schaefer GB, Bodensteiner JB. Evaluation of the child with idiopathic mental retardation. *Pediatr Clin North Am.* 1992;39(4):929–43.
160. Scholtes MCW, Behrend C, Dietzel-Dahmen J, van Hoogstraten DG, Marx K, Wohlers S, et al. Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril.* 1998;70(5):933–7.
161. Schreurs A, Legius E, Meuleman C, Fryns J-P, D’Hooghe TM. Increased frequency of chromosomal abnormalities in female partners of couples undergoing in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2000;74(1):94–6.
162. Serra A, Bova R, Neri G, Brahe C, Tedeschi B. Potential effects of pericentric inversion of the heterochromatic region of chromosome 9 on reproductive fitness. *Clin Genet.* 1980;17:87.
163. Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri G, Tedeschi B, Tassone F, et al. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet.* 1990;37(S7):162–8.
164. Shah K, Sivapalan G, Gibbons N, Tempest H, Griffin DK. The genetic basis of infertility. *Reproduction-Cambridge-.* 2003;126(1):13–25.
165. Sheth FJ, Liehr T, Kumari P, et al. Chromosomal abnormalities in couples with repeated fetal loss: An Indian retrospective study. *Indian Journal of Human Genetics.* 2013 Oct;19(4):415-422. DOI: 10.4103/0971-6866.124369.

166. Sheth FJ, Shah UJ, Desai MJ, Sheth JJ. Clinical profile of inversion Y in people of Gujarat, West India. *Int J Hum Genet.* 2011;11(4):245–8.
167. Sider D, Wilson WG, Sudduth K, Atkin JF, Kelly TE. Cytogenetic studies in couples with recurrent pregnancy loss. *South Med J.* 1988;81(12):1521–4.
168. Simeonov E DB. Registration of congenital anomalies in genetic/environmental interactions studies. In: *Euroworkshop on reproductive and developmental toxicity of pesticides.* Sofia; 2000.
169. Simpson JL, Elias S, Martin AO. Parental chromosomal rearrangements associated with repetitive spontaneous abortions. *Fertil Steril.* 1981;36(5):584–90.
170. Singhal, P., Malik, A., Naredi, N., Pranaya, G., & Agrawal, A. (2019). The robertsonian translocation of '21/22' in nonobstructive azoospermia: A rare case report from India. *Journal of Human Reproductive Sciences,* 12(3), 255.
171. Solari AJ. Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma.* 1980;81(3):315–37.
172. Soler A, Morales C, Mademont-Soler I, Margarit E, Borrell A, Borobio V, et al. Overview of chromosome abnormalities in first trimester miscarriages: a series of 1,011 consecutive chorionic villi sample karyotypes. *Cytogenet Genome Res.* 2017;152(2):81–9.
173. Speicher M, Antonarakis SE, Motulsky AG. *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches.* Springer Science & Business Media; 2009.
174. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *TRENDS Genet.* 2002;18(2):74–82.
175. Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, et al. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(12):790–800.
176. Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HWG. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod.* 1999;14(8):2097–101.
177. Stouffs K, Seneca S, Lissens W. Genetic causes of male infertility. In: *Annales d'endocrinologie.* Elsevier; 2014. p. 109–11.
178. Sudhir N, Kaur T, Beri A, Kaur A. Cytogenetic analysis in couples with recurrent miscarriages: a retrospective study from Punjab, north India. *J Genet.* 2016;95(4):887–94.
179. Suganthi R, Vijesh VV, Vandana N, Benazir JFA. Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *Int J Fertil Steril.* 2014;7(4):253.
180. Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Sato T, Suzumori N, Suzumori K. Poor prognosis of recurrent aborters with either maternal or paternal reciprocal translocations. *Fertil Steril.* 2004;81(2):367–73.
181. Tempest HG, Simpson JL. Why are we still talking about chromosomal heteromorphisms? *Reprod Biomed Online.* 2017;35(1):1–2.
182. ten Hoope-Bender P, Stenberg K, Sweeny K. Reductions in stillbirths—more than a triple return on investment. *Lancet.* 2016;387(10018):e14–6.
183. Tharapel At, Tharapel Sa, Bannerman Rm. Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: a review. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1985;92(9):899–914.

184. Tho PT, Byrd JR, McDonough PG. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. *Fertil Steril*. 1979;32(4):389–95.
185. Tommerup, N., Mehrjouy, M., Rasmussen, M., Bache, I., Halgren, C., Kroisel, P., ... Midyan, S. (2017). Interpretation of NGS-mapped chromosomal breakpoints: The importance of healthy controls . 50th European-Society-of-Human-Genetics (ESHG) Conference (pp.616-617). Copenhagen, Denmark.
186. Toncheva D, Ilieva P, Mavrudieva M. Detection of low level sex-chromosomal mosaicism. *Genet Couns*. 1994;5(4):363–7.
187. Tsenghi C, Metaxotou-Stavridaki C, Strataki-Benetou M, Kalpini-Mavrou A, Matsaniotis N. Chromosome studies in couples with repeated spontaneous abortions. *Obstet Gynecol*. 1976;47(4):463–8.
188. Tsui KM, Yu WL, Lo FM, Lam TS. A cytogenetic study of 514 Chinese couples with recurrent spontaneous abortion. *Chin Med J (Engl)*. 1996;109(8):635–8.
189. Tunç, E., Tanrıverdi, N., Demirhan, O., Süleymanova, D., & Çetinel, N. (2016). Chromosomal analyses of 1510 couples who have experienced recurrent spontaneous abortions. *Reproductive biomedicine online*, 32(4), 414-419.
190. Turan GA, Kaya I, Genç M, Kasap E, Eskicioglu F, Gur EB, et al. Chromosomal abnormalities and polymorphisms among couples with recurrent in vitro fertilization (IVF) failure. *Sifa Med J*. 2015;2(3):49.
191. Turnepenny P & Ellard S. *Emery's Elements of Medical Genetics*. 12th ed. Elsevier; 2007.
192. van den Berg MMJ, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Basis Dis*. 2012;1822(12):1951–9.
193. VBabu R, Ghosh K. Chromosomal variants and genetic diseases. *Indian J Hum Genet*. 2005;11(2):59–60.
194. Wakui K, Tanemura M, Suzumori K, Hidaka E, Ishikawa M, Kubota T, et al. Clinical applications of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis: identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J Hum Genet*. 1999;44(2):85–90.
195. Wang HS, Hamerton JL. C-band polymorphisms of chromosomes 1, 9, and 16 in four subgroups of mentally retarded patients and a normal control population. *Hum Genet*. 1979;51(3):269–75.
196. Ward BE, Henry GP, Robinson A. Cytogenetic studies in 100 couples with recurrent spontaneous abortions. *Am J Hum Genet*. 1980;32(4):549.
197. Who: Recommended Definitions, Terminology and Format for Statistical Tables Related to The Perinatal Period And Use of A New Certificate For Cause of Perinatal Deaths. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1977;
198. Wilson R, Ling H, MacLean MA, Mooney J, Kinnane D, McKillop JH, et al. Thyroid antibody titer and avidity in patients with recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 1999;71(3):558–61.
199. Xu X, Zhang R, Wang W, Liu H, Liu L, Mao B, et al. The effect of chromosomal polymorphisms on the outcomes of fresh IVF/ICSI–ET cycles in a Chinese population. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(11):1481–6.

200. Yakut S, Berker-Karaüzüm S, Şimşek M, Zorlu G, Trak B, Lüleci G. Telomere-specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet.* 2002;61(1):26–31.
201. Yu MY, Chen YL, Qiu J. Cytogenetic analysis on patients with a history of spontaneous abortion. *Zhejiang da xue xue bao Yi xue ban= J Zhejiang Univ Med Sci.* 2002;31(5):375–8.
202. Yuce H, Tekedereli I, Elyas H. Cytogenetic results of recurrent spontaneous abortions in Turkey. *Med Sci Monit.* 2007;13(6):CR286–9.
203. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril.* 2009;
204. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod [Internet].* 2017 Jul 28;32(9):1786–801. Available from: <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>.