# МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

# МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

## КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

**СЛАВЯНА ЯНУШЕВА ЯНЕВА СТАЙКОВА**

---

**ГЕНОМНИ НАРУШЕНИЯ В ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННИ ЧОВЕШКИ ЕМБРИОНИ**

---

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР”

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

Шифър 4.3.

Професионално направление: „Биологически науки”

Научна специалност: „Генетика”

---

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**

ПРОФ. Д-Р САВИНА ХАДЖИДЕКОВА, ДМ

София, 2020

*„Технологии, които са налице при раждането ни, приемаме за обикновени; технологии, изобретени преди да навършим 35, смятаме за революционни и вълнуващи; технологии, създадени след 35-та ни годишнина, заклеймяваме като неестествени и неправилни.“*

*Дъглас Адамс*

**Благодаря:**

Благодаря на научния ми ръководител проф. Хаджидекова за помощта, насоките и възможността да реализирам този дисертационен труд.

Благодаря на проф. Тончева за насърчаването, подкрепата и вярата, че мога да се справя с реализацията на дисертационния труд.

Благодаря на д-р Станева за полезните съвети и напътствия и на Блага за получените нови знания.

Благодаря на д-р Стаменов за възможността да работя с богат клиничен материал и съвременни технологии.

Сърдечно благодаря на семейството ми – сина ми Симеон, съпруга ми Владимир, мама и тати, леля, баба и дядовците ми, както и на най-близките ми приятели – Ивайло, Надежда и Марта, за безрезервната им подкрепа, насърчаване и вяра в мен, без които нямаше да се справя.

**<u>СЪДЪРЖАНИЕ</u>**

**Използвани в текста съкращения**

***Съкращения на кирилица:***

**АРТ -** асистирани репродуктивни технологии

**ДНК -** дезоксирибонуклеинова киселина

**ПГС -** предимплантационен генетичен скрининг

**ПГТ -** предимплантационен генетичен тест

***Съкращения на латиница:***

**aCGH -** array-based Comparative Genomic Hybridization (микрочипова сравнителна геномна хибридизация)

**ADO -** Allele Drop-Out (отпадане на алел)

**CCR -** Complex Chromosome Rearrangements (сложни хромозомни преустройства)

**CGH -** Comparative Gemomic Hybridization (сравнителна геномна хибридизация)

**COH -** Controlled Ovarian Hyperstimulation (контролирана овариална хиперстимулация)

**Cy3 -** Cyanine 3 (цианин 3)

**Cy5 -** Cyanine 5 (цианин 5)

**dNTP -** Deoxyribonucleotides Triphosphate (деоксирибонуклеотид трифосфат)

**eSET** - elective Single Embryo Transfer (избирателен единичен ембриотрансфер)

**ESHRE** - European Society of Human Reproduction and Embryology (Европейското общество по репродукция и ембриология)

**FET -** Frozen Embryotransfer (замразен ембриотрансфер)

**FISH -** Fluorescent in Situ Hybridization (флуоресцентна хибридизация ин ситу)

**GnRH -** Gonadotropin-Releasing Hormone (гонадотропин-освобождаващ фактор)

**GTG -** G-banding by Trypsin and Giemsa (G лентуване чрез трипсин и боя на Гимза)

**HLA -** Human Leukocyte Antigen (човешки левкоцитен антиген)

**ICSI -** Intracytoplasmic Sperm Injection (вътре цитоплазмено инжектиране на сперматозоид)

**IVF -** In Vitro Fertilization (ин витро оплождане)

**NGS -** Next Generation Sequencing (секвениране от ново поколение)

**PGD -** Preimplantation Genetic Diagnosis (предимплантационна генетична диагноза)

**PGS -** Preimplantation Genetic Screening (предимплантационен генетичен скрининг)

**PGT -** Preimplantation Genetic Test (предимплантационен генетичен тест)

**PGT-A -** Preimplantation Genetic Test for Aneuploidies (предимплантационен генетичен тест за анеуплоидия)

**PGT-M -** Preimplantation Genetic Test for Monogenic defects (предимплантационен генетичен тест за моногенни дефекти)

**PGT-SR -** Preimplantation Genetic Test for Structural Rearrangements (предимплантационен генетичен тест за структурни преустройства)

**PCR -** Polymerase Chain Reaction (полимеразна верижна реакция)

**QC -** Quality Control (качествен контрол)

**QF-PCR -** Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction (количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция)

**SART** - Society for Assisted Reproductive Technology (Общество по асистирани репродуктивни технологии)

**SBR -** Signal to Background Ratio (съотношение на интензитета на сигнала към фоновия шум)

**SBS -** Sequence-By-Synthesis (секвениране чрез синтеза)

**SKY -** Spectral Karyotyping (спектрално кариотипиране)

**SNPs -** Single Nucleotide Polymorphisms (единичен нуклеотиден полиморфизъм)

**SSC -** Saline-Sodium Citrate (солеви натриев цитрат)

***Дисертацията съдържа: 198 страници, 56 фигури и 35 таблици.***

**<u>Списък на фигурите в текста:</u>**

**Списък на таблиците в текста:**

# ВЪВЕДЕНИЕ

Генетичните болести представляват бич за човечеството. Независимо че през последните години в сферата на генна терапия е постигнат значителен напредък, не са описани много успешни опити за лечение на генетични заболявания. В повечето случаи предотвратяването на появата на нови болни е единствена възможност за превенция на генетичните заболявания. Една от най-разпространените техники за предотвратяване раждането на засегнато дете при двойки с генетичен риск е пренаталната диагностика, която, обаче, води до увеличен процент аборти в случаи на засегнат плод. Прекъсването на бременност по медицински показания води до риск както за физическото, така и за психическото здраве на бременната. В допълнение, в редица етнически групи извършването на медицински аборт не е разрешено поради социални или религиозни причини. В такива случаи добра алтернатива са предимплантационните гентични тестове, които дават възможност в хода на ин витро оплождане да се селектира ембрион, който не носи съответния генетичен дефект. Методът е алтернатива на естественото зачеване, последвано от инвазивна пренатална диагноза и прекъсване на бременността по медицински показания в семейства с риск за генетично заболяване на потомството (1).

PGT представлява допълнение към ин витро оплождането (IVF) и се извършва преди настъпване на бременността. Трстът е метод за ранна генетична диагноза и подбор на ин витро ембриони преди трансфера им в матката. PGT е върхова технология, която се състои от биопсия на полярни телца, бластомери или трофектодермални клетки от ембриона, изолиране на ДНК и генетичен анализ (2, 3). Провеждането на PGT е оправдано за тежки заболявания при липса на ефективна терапия. В случаите, когато със сигурност се знае, че заболяването води до мъртвораждане или до летален изход в ранна детска възраст, нуждата от ПГД е очевидна. Също така провеждането на PGT има смисъл и при заболявания с по-голяма продължителност на живота, но с нелечими тежки, множествени, често прогресиращи физически и/или умствени увреждания. Обикновено се касае за редки генетични болести, представляващи живото-застрашаващи или хронични инвалидизиращи заболявания без ефективна или със скъпоструваща терапия. Тяхната честота е 1 на 2000 души, но заедно се превръщат в сериозен проблем, тъй като засягат между 6 и 8 % от хората през живота им (4). Редките болести са тежък проблем за болния, неговото семейство, близки и обществото като цяло и представляват съществена финансова тежест за системата на здравеопазването. Алтернатива на PGT за семейства, които желаят да предотвратят раждането на деца с генетични заболявания, е естественото забременяване, последвано от пренатална диагноза и прекъсване на бременността при патологичен резултат, използване на донорски гамети, осиновяване или въздържане от репродукция.

PGT е много по-добър превантивен метод от инвазивната пренатална диагноза (хорионбиопсия, амниоцентеза), тъй като не носи риск за самата бременност и се избягва прекъсването на желана бременност в случай на засегнат плод, което допълнително е свързано със здравен риск за жената и тежка психотравма (5, 6).

# ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

## I. Мястото на PGT в ин витро технологиите

От раждането на първото бебе ин витро Луиз Браун през 1978 до 2018 броят на родените чрез ин витро процедури деца е повече от 8 милиона, което съставя около 0.1% от световното население. В световен мащаб всяка година се раждат приблизително 500 000 бебета IVF (7). Статистически установено е, че до края на 21-ви век 157 милиона души ще дължат живота си на асистираните репродуктивни технологии (АРТ) (1.4% от световното население) (8). Успеваемостта на методите на асистираната репродукция е около 20-40% (9). Това налага необходимост от усъвършенстването на вече съществуващите и разработването на нови методи в асистираната репродукция, които да подобрят изхода от процедурите ин витро. Големи усилия в последните години са насочени към разработването на диагностични методи за определяне качеството на ембриони с оптимална функционалност и потенциал за имплантиране. Това е необходимо за подобряване на резултатите от все по-широко навлизащите технологии за АРТ в съвременния свят.

До настоящия момент техниките за селекция включват основно използването на морфологични критерии, като ембрионите се оценяват на няколко основни етапа от ранното им развитие и съответно са разработени различни системи за оценка. Тези етапи включват: стадий на пронуклеусите (час на поява и изчезване, морфология); стадий на две клетки (ранно делене); стадий на четири клетки (морфология на ден 2-ри); стадий на осем клетки (морфология на ден 3-ти); стадий морула (4-ти ден); стадий бластоцист (5-ти ден).

Тези методи за селекция се основават на статични наблюдения на ембрионите в конкретен момент от тяхното развитие и не могат да обхванат целия цикъл от оплождането до активирането на ембрионалния геном и деленето до стадий на бластоцист.

Най-често използваният инвазивен тест за определяне качеството на ембрионите е преимплатационният генетичен тест, който позволява да се отчете генетичният статус на полярни телца, бластомери или трофектодермални клетки (10). Прилагането на PGT е от интерес за асистираната репродукция, тъй като предлага възможност за предварително селектиране на генетично здрави ембриони, като по този начин позволява да се извърши единичен ембриотрансфер и увеличава шанса за забременяване със здрав ембрион (11).

PGT на практика е много ранна пренатална диагностика, в първите дни от развитието на ембриона, още преди имплантацията му в матката. Процедурата най-често намира приложение при двойки с доказани балансирана хромозомна транслокация, хромозомен дефект на предишно дете в семейството, висок риск от молекулна болест, Х-свързана или У-свързана аномалия, възраст на майката над 35 години, нежелание за селективен аборт, множество спонтанни аборти, повече от три несполучливи опита ин витро или при повтарящи се случаи на ембриони с лошо качество (12-14). PGT намира приложение не само при стерилни, но и при фертилни двойки поради възможността от избягването на селективен аборт по медицински причини, тъй като методът позволява избор на балансиран ембрион и съответно раждане на здраво дете. В допълнение, процедурата може да доведе до намаляване на стреса при двойката по време на забременяване и имплантация (особено при двойки, които имат вече едно родено болно дете или няколко аборта поради засегнат плод) (15, 16).

По своята същност PGT е допълнение към асистираната репродуктивна технология и изисква ин витро оплождане за получаване на яйцеклетки или ембриони за анализ (17). Предшествана от техниките за АРТ (ин витро оплождане - IVF и вътрецитоплазмено инжектиране на сперматозоид - ICSI), тази диагностика се прилага като част от здравните програми на развити държави като Япония, Израел, Канада, Великобритания, Франция, Австралия, Индия, Холандия, САЩ (18, 19). Установено е, че PGT се използва при 20% от ин витро циклите, извършвани ежегодно в САЩ, като този процент рязко нараства в последните години (20).

## II. Исторически план на методите за PGT

Най-ранните изследвания в сферата на PGT датират от 1968 година, когато Едуардс и Гарднър извършват биопсия на заешки бластоцисти и анализират телцето на Бар с цел определяне пола на ембрионите (21). След това, през 1986 година група от експерти обсъждат възможността за изследване на ембриони в предимплантационния период, за да се избегне необходимостта от селективен аборт, пренатална диагностика (хорионбиопсия и амниоцентеза), като избират потенциална групи кандидати за PGT изследване: двойки с висок риск от раждането на дете с генетично заболяване (22).

За пръв път клинично приложим PGT с успешен край е проведен от Хендисайд, Контоджиани и Уинстън в болницата Хамърсмит в Лондон. Пациенти са пет двойки, засегнати от X-свързани заболявания. Ембрионите са получени в резултат на ин витро процедура, последвана от биопсия на ембрионите и изследване на Y хромозомата. Учените използват PCR (полимеразна верижна реакция) за определяне на пола чрез намножаване на У-хромозомни специфични последователности с цел да разграничат женски от мъжки ембриони и да трансферират селективно женски ембриони (23). Аналогичен метод е приложен за предимплантационен генетичен тест на хемофилия, муковисцидоза, мускулна дистрофия, α-1 антитрипсинов дефицит (24, 25). От този момент насетне, използването на предимплантационния генетичен тест се разраства основно в сферата на предотвратяване раждането на деца, засегнати от тежки генетични заболявания.

Еволюцията на PGT започва с използването на флуоресцентна хибридизация in situ (FISH). Грифин и Грифо ползват сонди за X и Y хромозомите с цел определяне на пола, а по-късно Мън развива протокол за многоцветен FISH, позволяващ скрининг на до пет хромозоми едновременно (26-28).

С течение на времето FISH техниката се заменя с по-надеждни и ефективни молекулярни технологии за изследване на генетични заболявания като сравнителната геномна хибридизация върху чипове (aCGH), единичен нуклеотиден полиморфизъм върху чипове (SNP), количествен PCR (qPCR) и новогенерационно секвениране (NGS) (29). Потенциалните приложения на PGT драстично се увеличават с лесно достъпната информация за патологични секвенционни промени и вариации в броя копия, както и със забележителната способност на настоящите секвенционни платформи скоростно да генерират голямо количество секвенционни данни.

### III. Етапи на PGT анализа

Осъществяването на PGT е пряко свързано с ин витро оплождането. Етапите на PGT са следните (Фиг. 1):

- Подготовка за ин витро оплождане;
- Получаване на яйцеклетки чрез пункция на фоликулите;
- Вземане на сперматозоиди;
- Оплождане на яйцеклетките от сперматозоидите чрез IVF/ICSI;
- Биопсия;
- PGT;
- Трансфер на селектираните ембриони в матката.

*Фиг. 1. Етапи на PGT анализа:*


(снимки – МБАЛ „Надежда“, 2019)

## IV. Същност на ин витро технологиите

Ин витро оплождането е вид асистирана репродуктивна технология. Представлява процес, при който се извършва оплождане на една или няколко яйцеклетки извън тялото на жената, като след това получените ембриони се връщат в матката. Целта на процедурата е ин витро условията максимално да се доближат до тези ин виво, за да може яйцеклетката успешно да се оплоди от сперматозоида и да се мониторират първите етапи на постзиготното развитие.

Първата успешна ин витро бременност е постигната през 1977 г. във Великобритания, където д-р Ричард Едуардс и д-р Патрик Степто – двамата първооткриватели, прилагат метода на двойката Лесли и Джон Браун, които нямат деца в продължение на 9 години поради запушени фалопиеви тръби. С помощта на лапароскопски уреди д-р Степто успява да получи годна яйцеклетка от яйчниците на жената, която по-късно е оплодена със сперматозоидите на съпруга ѝ и върната обратно в матката, където се имплантира успешно. Така първото „бебе в епруветка" – Луиз Браун, се появява на бял свят с цезарово сечение на 25 юли 1978 г. в болница в Олдъм, недалеч от Манчестър, Великобритания. За великото си постижение, дало шанс на милиони бездетни двойки по света да имат собствени деца, Робърт Едуардс получава Нобелова награда за медицина за 2010 г.

В България методът е въведен през 1987 г., като първите деца, заченати ин витро, се раждат в началото на 1988 г. Към 2010 г. вече десетки клиники в цялата страна предлагат ин витро процедури. С решение на Министерски съвет през 2009 г. е създаден Фонд за асистирана репродукция, който подпомага финансово лечението на бездетните двойки в България.

Ин витро оплождането е основен метод за лечение на безплодие (стерилитет), когато останалите АРТ (например вътрематочна инсеминация и др.) не дават резултат. Процесът на IVF включва следните техники, които рутинно се използват при АРТ: овариална (яйчникова) хиперстимулация за получаване на множество яйцеклетки, трансвагинална пункция на фоликулите под ултразвуков контрол, подготовка на яйцеклетките и сперматозоидите, както и култивиране и подбор на получените ембриони. След това подходящите зиготи се връщат в матката на пациентката с намерение да се постигне успешна бременност.

Освен, че представлява важен подход при лечението на инфертилитета, ин витро оплождането и свързаните с него технологии се прилагат и при семейства без репродуктивен проблем, но с риск за предаване на генетично заболяване в потомството. Тук приложение намира PGT, който се развива с усилен темп през последните десетилетия.

### 1. Контролирана овариална хиперстимулация

При индикации за провеждане на PGT най-често пациентките претърпят контролирана овариална хиперстимулация (COH).

Контролираната овариална хиперстимулация има за цел да осигури образуването на множество ооцити. Добиването на по-голям брой ооцити дава възможност след процедурата на оплождане да се получат повече ембриони, които да бъдат изследвани с предимплантационен генетичен тест. В продължение на години, клиницистите се стараят да оптимизират стратегията за PGT и да установят дали съществува минимален брой яйцеклетки или ембриони, които да преминат през PGT (30-32). Броят на ооцити, кореспондиращ на максималния процент живо раждане, е 15. Най-голям процент живо раждане се наблюдава с увеличаване на броя ооцити (до 15), представлява плато между 15 и 20 яйцеклетки и постоянно намалява след 20 яйцеклетки. Оттук се предполага, че оптималният брой яйцеклетки, за успешна ART е между 10 и 15. Следователно съществуват противоречиви резултати за определения минимален брой яйцеклетки или ембриони за преминаване към PGT. В много клиники по репродукция PGT може да продължи дори и с много малък брой яйцеклетки или ембриони по желание на пациентите и по преценка на лекуващите лекари. Въпреки това, COH значително увеличава шансовете за установяване на генетично здрав ембрион при двойки със статистически нисък шанс за такъв и евентуална последваща успешна бременност (например при двойки с транслокации, моногенни заболявания и т.н.). Пациентите са подложени на COH чрез стимулационни протоколи, като най-често се използват агонисти или антагонисти на гонадотропин освобождаващия хормон (GnRH) (33). Към всеки пациент се подхожда индивидуално и се подбира подходящ за него стимулационен протокол според клиничната оценка на профила му (възраст, индекс на телесна маса (BMI), яйчников резерв, ендокринни параметри, отговор към предходни стимулации, причина за инфертилитет и т.н.) (34).

### 2. Пункция на яйцеклетки

В деня на пункцията (т.нар. ден 0) получените при фоликуларната пункция ооцити се анализират под микроскоп, като се класифицират според качеството и зрелостта си и се поставят в специална среда за култивиране. В по-голямата част от докладваните ин витро цикли с PGT се прилага интра цитоплазмено инжектиране на сперматозоид (ICSI) вместо IVF (35). Около 16-18 часа след процедурата се констатира дали е настъпило оплождане. Признаците на оплождане се изразяват в появата на два пронуклеуса (един от сперматозоида и един от яйцеклетката). Разработени са методи за оценяване на ембрионите с цел да се оптимизира процентът на успеваемост. Методите за оценяване могат да включват морфологични, имунологични и генетични показатели, по които да се подберат най-добрите ембриони, които биха довели до успешна бременност. Развитието на всеки ембрион ежедневно се оценява до извършване на ембриотрансфер. На етапа на тридневен ембрион, оценката се извършва въз основа на броя, размера, формата на клетките и скоростта на фрагментация на бластомерите. На петия ден ембрионите се оценяват в зависимост от тяхната степен на уплътняване (компактизиране) и бластоцистите са класифицирани в зависимост от качеството на трофектодерма, вътрешната клетъчна маса и степента им на експанзия.

### 3. Спермален анализ

Семенният материал се събира и анализира след мастурбация на пациентите при 3-5 дни полово (сексуално) въздържане. Анализът на еякулата се осъществява ръчно или с помощта на автоматичен анализатор, спазвайки стриктно изискванията на Световната Здравна Организация (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5$^{th}$ edition, 2010). Стандартният спермален анализ включва измерване на обем (ml), концентрация (million/ml) и подвижност (a - активно подвижни сперматозоиди; b - подвижни сперматозоиди; c - бавно подвижни сперматозоиди; d - неподвижни сперматозоиди). Оценяват се вискозитет и цвят на еякулата. С помощта на лакмусови ленти (с обхват 4.5-10) се определя pH. Морфологията на сперматозоидите се определя според стриктните критерии на Крюгер.

### 4. IVF/ICSI оплождане на яйцеклетки

Класическата ин витро процедура представлява прибавяне на капацитирани сперматозоиди към зрели яйцеклетки, заедно с обкръжаващите ги кумулусни клетки. При успешно настъпване на оплождане мъжката и женската гамети образуват зигота след 16-18 часа инкубация (36).

В допълнение към класическото ин витро оплождане, съществува и друг много разпространен в световната практика метод - интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид (ICSI - Intracystoplasmic Sperm Injection). При ICSI методът е необходим само един сперматозоид за оплождане на яйцеклетката, докато класическото IVF има нужда от 50 до 100 хиляди сперматозоиди. Това се дължи на факта, че при класическата ин витро процедура IVF трябва да протече акрозомна реакция, докато при ICSI техниката тази стъпка се пропуска.

ICSI техниката е създадена през 1991 г. от Gianpiero Palermo и неговия екип в Центъра за репродуктивна медицина към Vrije Universiteit Brussel. Първото раждане на дете вследствие на процедурата е осъществено на 14 януари 1992 г. (37, 38).

ICSI процедурата се прилага най-често за преодоляване на мъжки инфертилитет (тератозооспермия, азооспермия), въпреки че може да се използва в случаи на трудно проникване на сперматозоиди в яйцеклетката или при донорство на сперма (39). При тератозооспермия се прилага с цел откриване на малкото сперматозоиди с нормална морфология, което позволява оптимален успех (40).

## 5. Биопсия на полярни телца, яйцеклетки и ембриони

Като материал за изследване при PGT могат да бъдат използвани първото или второто полярно телце, бластомери и клетки от трофектодермата (Фиг. 2).

*Фиг. 2. А) биопсия на полярно телце; Б) биопсия на тридневен ембрион; В) биопсия на трофектодерм:*


(снимки - ембриологична лаборатория, МБАЛ „Надежда“, 2019)

***Биопсия на полярно телце***

При редуциране на броя на хромозомите в женската гаметогенеза половината от хромозомите се отделят под формата на полярно телце. Процесът на отделянето на полярно телце дава възможност  индиректно да се изследват хромозомите на яйцеклетката, без самата тя да се уврежда. Полярното телце няма роля при оплождането и претърпява деградация.

Основното предимство при биопсия на полярни телца е, че не се оказва директно влияние върху изследвания ембрион, тъй като полярните телца не са необходими за успешното оплождане и нормалното развитие на ембриона. Главен недостатък на процедурата е, че се получава информация само за майчиния геном, следователно могат да бъдат установени автозомно-доминантни и Х-свързани болести, предадени от майката, но автозомно рецесивните заболявания могат да бъдат само частично диагностицирани. Съществува увеличен риск от погрешна диагноза поради деградиране на генетичен материал или рекомбинация, водеща до формиране на хетерозиготни първи полярни телца. Изследването на полярни телца не може да детектира пост-зиготни грешки, възникнали в ооцитите (41).

Препоръчителна е биопсия и на двете полярни телца с цел минимизиране на риска за грешно диагностициране. Болшинството грешки се появяват по-често в хроматидите, отколкото в целите хромозоми. По тази причина скрининг само на първото полярно телце няма да може да установи голям процент от дефектните яйцеклетки. От друга страна, хромозомна аномалия в първото полярно телце може да доведе до получаването на здрав ембрион, т.е. като резултат от скрининга може да бъдат унищожени нормални яйцеклетки (42).

***Биопсия на клетки (бластомери) от тридневни ембриони***

Биопсия на бластомерите се извършва на третия ден след оплождането (64-66-тия час след инсеминирането), когато ембрионът се състои от 6-8 бластомера). С помощта на лазер се прави малък отвор в обвивката на ембриона, от където чрез микробиопсична пипета се изваждат един или два бластомера. Тази процедура нормално не уврежда последващото развитие на ембриона (43). Предимство на бластомерната биопсия е, че на стадий 7-8 клетки клетките имат най-висок митотичен индекс и ембрионът може по-лесно да компенсира липсващата клетка (44).

За пръв път биопсия на бластомери е извършена на заешки ембриони от Гарднър и Едуардс през 1968 година (45), а на човешки ембриони – от Хендисайд и Грифо през 1990 и 1992 година (23, 24, 46).

Основно ограничение на биопсията на бластомери е, че се изследват една, максимум две клетки от ембриона и че на този стадий от развитието на ембриона се наблюдава високо ниво на мозаицизъм – възможно е изследваната клетка да е дефектна, а останалите да са нормални. Възможна е и обратната ситуация, при която изследваният бластомер е нормален, а останалите клетки са дефектни. Това би довело до погрешна диагноза, че ембрионът няма хромозомни аномалии, докато на практика той няма шансове за нормално развитие (47).

Биопсията на трети ден се препоръчва при семейства, чиито ембриони по-рядко достигат до бластоцист.

***Биопсия на трофобластни клетки (трофектодерм) от петдневни ембриони***

Понастоящем това е най-често прилаганият подход (48). Биопсията се извършва на стадий бластоцист на 5-6 ден след оплождането, когато ембрионът има около 100-150 клетки. Бластоцистът се формира между 5 и 7 ден след оплождането и е изграден от два вида клетки. Повърхностните клетки, които обграждат сърцевината и от които се развива бъдещата плацента, се наричат трофектодерм. От по-централно разположената група клетки на бластоциста се формира плодът. С помощта на лазер се прави малък отвор в обвивката на ембриона, откъдето чрез микробиопсична пипета се взимат трофектодермални клетки (49). Използването на лазер значително опростява биопсията и я прави по-малко травматична за ембриона. По този начин не се засягат бъдещите фетални клетки и не се уврежда последващото развитие на ембриона (48, 50).

Предимство на трофектодермалната биопсия е, че могат да бъдат изследвани по-голям брой клетни (5-10 и повече), което осигурява по-сигурен резултат и намалява вероятността от погрешна диагноза, тъй като на този етап нивото на мозаицизма е съществено по-ниско (48, 51). Поради това в повечето клиники и ин витро центрове се практикува трофектодермална биопсия в сравнение с биопсията на бластомери.

Основен недостатък на метода е, че 25% до 60% от всички осемклетъчни ембриони имат потенциал в ин витро условия да достигнат до стадий бластоцист (52). Също така при необходимост от свеж трансфер, срокът за извършване на предимплантационната диагностика е кратък, тъй като ембрионът трябва бързо да се трансферира на жената, за да настъпи имплантация.

Биопсираните ембриони запазват напълно потенциала си за развитие и имплантация, и при необходимост могат да бъдат замразени.

***Неинвазивни техники за биопсия***

За изясняване причините за липсата на имплантация е необходимо прилагането на комплексен подход, обхващащ геномни, транскриптомни, метаболомни, епигеномни, мтДНК анализи, като усилията трябва да се концентрират в търсенето на неинвазивни биомаркери. Много изследователи предполагат, че инвазивното отстраняване на клетки от ембриони преди имплантацията може да попречи на ембрионалното развитие, отнема ценно време и е финансово неизгодно. Важна следваща стъпка в еволюцията на PGT е разработването на надеждни неинвазивни техники за биопсия за диагностика на човешки ембриони. Циркулиращата свободноклетъчна ДНК, изолирана от бластоцела или културалната среда на бластоцистите, напоследък се разглежда като потенциална алтернатива на конвенционалната биопсия (Фиг. 6) (53).

Понастоящем основните недостатъци на неинвазивните подходи за биопсия са недостатъчното количество ембрионална свободноклетъчната ДНК, нарушена цялост на ДНК; майчина контаминация и ембрионален мозаицизъм. Следователно за момента тези методи не са достатъчно надеждни за точното определяне на геномния статус, шанса за имплантация на ембриона и раждането на здраво бебе. Необходими са допълнителни проучвания, за да се определи и подобри точността на неинвазивните техники за биопсия. Анализът на свободноклетъчната ДНК с по-модерни технологии за генетично секвениране има потенциала в близко бъдеще да осигури голям пробив в концепцията за неинвазивен PGT (54).

*Фиг. 3. Неинвазивни предимплантационни тестове:*


(фигура - Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders, Assou et al., 2014)

## 6. Ембриотрансфер

Ембриотрансферът (ЕТ) представлява поставяне на ембриони обратно в кухината на матката (55, 56). ЕТ може да се извърши на различни етапи в ембриогенезата и след различна продължителност на култивиране на ембриона. Основните етапи, при които се извършва трансфер на ембриони, са етапът на разцепване (ден 3, но може и ден 2 до ден 4 след ко-инкубация) и стадият на бластоцист (ден 5 или 6 след ко-инкубация) (57). Ембрионите могат да бъдат „свежи“ (получени от оплодени яйцеклетки на същия менструален цикъл) или "замразени" (генерирани в предходни цикли, криопрезервирани и размразени преди самия трансфер).

При прилагане на PGT за евентуални генетични дефекти и хромозомни болести, времето на ЕТ зависи от следните фактори - на какъв етап от развитието на ембрионите се извършва предимплантационното тестване; какъв е методът, който се прилага; какви са резултатите от изследването. При PGT на стадии бластомер може да се извърши ембриотрансфер на 4-5 ден в случай, че има подходящ незасегнат генетично ембрион. При предимплантационно тестване на стадий бластоцист може да се извърши свеж ембриотрансфер на ден 6 или подходящите ембриони да се криопрезервират и да се извърши FET (frozen embryotransfer) на следващ цикъл.

Нормалните ембриони, които не се използват, могат да бъдат замразени. В зависимост от желанието на семейството ембриони, носещи аномалии, могат да бъдат унищожени, замразени, дарени за научни цели или трансферирани.

За всички двойки, подложени на PGT, е препоръчително провеждането на пренатална диагностика, за да се потвърдят резултатите от предимплантационния анализ, тъй като методите за преимплантационен генетичнен тест имат технически ограничения, които включват възможността за техническа грешка, наличие на нискостепенен мозаицизъм, фалшиво положителен или фалшиво отрицателен резултат (58, 59).

## 7. Рискове свързани с биопсията и аналитичните процедури при PGT

Съществува риск под 0,5% за увреждане на яйцеклетката/ембриона от биопсията. Възможна е около 5% погрешна фалшиво положителна или отрицателна диагноза, основно дължаща се на естествения мозаицизъм на ембрионите, възможността им за самокорекция или техническите ограничения на метода. Някои от ембрионите могат да останат недиагностицирани поради загуба на генетичния материал в процеса на обработката или технически проблеми при анализа.

Съществува вероятност всички изследвани ембриони да имат мутации, при което да няма нормални ембриони за трансфер. В част от случаите е възможно резултатите да са неинтерпретабилни. PGT е експериментална технология и е в тестова фаза. Все още са необходими допълнителни данни относно ефективността на техниката при селекцията на ембрионите. Съществува риск от технически грешки или неинтерпретабилни резултати, които да компрометират диагнозата.

## 8. Диагностична точност на PGT техниката

Важно е да се отбележи, че по-голямата част от центровете за IVF, които извършват PGT, препоръчват при настъпване на бременност след процедурата да се извърши пренатална диагностика (хорионбиопсия или амниоцентеза) за потвърждение на получените резултати. Подобно на голяма част от технологиите, макар и в редки случаи, съществуват вероятност за грешка и риск от неправилна диагноза по време на PGT (60-62).

Има много решения, които трябва да бъдат взети от двойката, преди извършване на ин витро цикъл с PGT. По време на процеса възникват сложни дискусии, когато се срещат неточни, непоследователни или непълни резултати.

От решаващо значение за намаляване на неблагоприятните резултати е прецизността при работа - реализиране на ин витро цикъл, наблюдение и биопсиране на ембрионите, извършване на генетичната диагностика.

В научната литература са съобщени множество причини за неправилна диагноза (63, 64). Смята се, че най-често погрешните резултати се дължат на човешка грешка, отпадане на алел, контаминация с чужда (обикновено майчина или бащина) ДНК и мозаицизъм. Човешка и/или лабораторна грешка може да възникне при всяка стъпка на процедурата и лабораторният персонал има задължение да спазва строги мерки за контрол на качеството по време на целия процес.

## V. Наследствени болести и предразположения, подлежащи на ПГД

Генетичните болести при човека, за които се прилага PGT, могат условно да се разделят на следните три големи групи: хромозомни болести, моногенни болести и мултифакторни заболявания.

### 1. Хромозомни болести

Хромозомните болести са патологични състояния с честота в популацията около 1% и се дължат на бройни или структурни хромозомни мутации. Формираният хромозомен дисбаланс води до тежки смущения в соматичното, половото и интелектуалното развитие (65). Повечето от тези смущения са несъвместими с интраутеринното развитие, като в резултат настъпва спонтанен аборт (в около 50% от случаите) (66-70). Умерено изразеният генетичен дисбаланс води до преживяване на плода до по-късна бременност и може да се изяви като перинатална смърт или мъртво раждане. Само ембриони с по-лек хромозомен дисбаланс могат да завършат с раждане на живо дете, но с наличие на редица вродени аномалии, дисморфизъм и умствено изоставане (71, 72). Установено е, че хромозомните аберации играят роля за перинатална смъртност в 13% - 25% от случаите и 6% от ранната неонатална смърт (73-76).

Хромозомните болести могат да възникват в резултат на настъпили бройни аберации или структурни преустройства.

**Бройни аберации** – настъпват в резултат на бройни хромозомни промени:

- ***полиплоидии*** - бройно нарушение на кариотипа, при което се засяга целият геном, а броят на хромозомите се увеличава кратно на моноплоидния набор (n). При хората полиплоидията се среща под формата на триплоидия (3n - 69 хромозоми) и тетраплоидия (4n - 92 хромозоми).
- ***анеуплоидии*** - промяна в броя на хромозомите в отделна двойка хомоложни хромозоми. Може да се наблюдава допълнителна трета хромозома (тризомия) или липса на едната хромозома (монозомия) По-рядко се срещат полизомии (тетразомия или пентазомия) и двойни анеуплоидии със засягане на две или повече хромозомни двойки. Липсващи или допълнителни хромозоми в различни двойки се срещат при някои злокачествено трансформирани клетъчни клонове.

**Структурни преустройства** – количествени промени и пренареждания на хромозомния материал, ангажиращи една или повече хромозоми:

- ***делеции*** – загуба на генетичен материал;
- ***дупликации*** – удвояване на хромозомен сегмент;
- ***ринг (пръстеновидни) хромозоми*** – свързване на двата края на хромозомата, предизвикано от загуба на генетичен материал (терминални сегменти) преди сливането;
- ***инверсии*** – разкъсване в две ленти, при което сегментът между тях се обръща на $180^0$ и се свързва в обратна посока;
- ***изохромозоми*** – хромозоми с генетично и морфологично идентични рамена;
- ***транслокации*** – преместване на част от една хромозома върху друга. Поделят се на реципрочни (взаимен обмен на генетичен материал между нехомоложни хромозоми); нереципрочни/инсерции (вмъкване на вътрешен сегмент от една хромозома в друга); Робертсонови транслокации (между хомоложни или нехомоложни акроцентрични хромозоми); сложни хромозомни пренареждания (три или повече разкъсвания с обмен на генетичен материал между две или повече хромозоми).

2. **Моногенни болести**

Много от наследствените заболявания при човека са причинени от различни мутации в единичен ген. Те се унаследяват по Менделов тип с висок риск от повторение. Известни са над 10 000 заболявания, като повече от половината се унаследяват автозомно-доминантно, 36% са автозомно-рецесивни и по-малко от 10% са X-свързани (77, 78). Y-свързаните нарушения са изключително редки и обикновено са свързани с репродуктивни неблагополучия.

Моногенните заболявания често променят функцията на широк спектър белтъци (ензими, рецептори, транспортни белтъци, хормони, имуноглобулини, колагени, фактори на кръвосъсирването), което се отразява върху множество биологични процеси. Поради тази причина моногенните заболявания често засягат едновременно няколко органи и системи.

***Точковите мутации*** са стабилни промени в молекулата на ДНК, които представляват замяна на една двойка азотни бази с друга (***субституции***), елиминиране на бази (***делеции***) или добавяне на нови бази (***инсерции***). Според ефекта, който предизвикват, точковите мутации се поделят на:

- ***missense мутации*** – предизвикват замяна на една аминокиселина с друга;

- ***nonsense мутации*** – водят до преждевременно възникване на стоп кодон, в резултат на което се формира скъсен или нефункционален протеин;
- ***frameshift мутации*** – променят рамката на четене. В резултат на делеция или инсерция на една нуклеотидна двойка се получава пълна промяна на аминокиселинната последователност след мястото на замяната
- ***splice мутации*** – вмъква, премахва или променя редица нуклеотиди в конкретни места (спайс места), важни за превръщането на прекурсорна РНК в зряла иРНК.

**3. Наледствени малигнени заболявания**

С настоящия напредък в разбирането на молекулярната основа на рака и секвенирането на гени, участващи в отключването на злокачествени заболявания, наследственото предразположение към рак се превърна в една от нововъзникнкналите индикации за PGT. Първият случай на PGT, довел до раждане на здраво дете без ракова предиспозиция, е извършен за мутации в тумор-супресорния ген *p53* (79). Същият подход е приложен за мутации при двойки с неврофиброматоза тип I и неврофиброматоза тип II (80).

Въпреки обширната дискусия на етичните и правни въпроси, свързани с PGT за болести с късно начало и генетична предразположеност (81, 82), все по-голям брой пациенти гледат на PGT процедурата като единствена възможност за здраво дете. При бременност с PGT може да бъде установена мутация, предразполагаща към рак, от самото начало, като се избягва потенциалното трудно решение за раждане на дете с висок риск от развитие на малигнено заболяване, и се предоставя възможност за пренатална диагноза и прекратяване на бременността, ако плодът е диагностициран като носител на патологичен генотип.

Понастоящем PGT се прилага и за фамилна аденоматозна полипоза, синдром на Von Hippel-Lindau, ретинобластом, синдром на Li-Fraumeni, фамилен тумор в задна черепна ямка и др. (83-85).

## VI. Видове предимплантационни генетични тестове

Понастоящем предимплантационният генетичен тест е разделен на три основни категории: PGT за моногенни нарушения (PGT-M); PGT за структурни преустройства (PGT-SR); PGT за анеуплоидия (PGT-A) (86).

### 1. PGT за моногенни нарушения

PGT-M се прилага в семейства, в които единият и/или двамата родители са носители на моногенен дефект (автозомно-рецесивно, автозомно-доминантно, X-свързано заболяване, наследствени ракови синдроми) и има риск за раждане на болно дете. В зависимост от вида на унаследяването рискът от раждане на болни деца варира от 25 до 100%. Процедурата идентифицира ембрионите, носещи специфичната генетична мутация, като по този начин се избягва трансфер на засегнат ембрион. PGT-M се провежда най-често за моногенни болести като муковисцидоза, бета-таласемия, сърповидноклетъчна анемия, спинална мускулна атрофия тип 1, булозна епидермолиза (автозомно-рецесивни); миотонична дистрофия, болест на Хънтингтън, болест на Шарко-Мари-Тут (автозомно-доминантни); синдром на чуплива X хромозома, хемофилия А, мускулна дистрофия на Дюшен (X-свързани заболявания); синдром на Лий и митохондриална енцефаломиопатия с лактатна ацидоза и инсулин-подобни епизоди (митохондриални разстройства) (65, 87-112).

В последно време PGT-M се прилага и за диагностициране на болести с късно начало и предразположение към ракови заболявания. Някои от моногенните наследствени ракови синдроми имат много висока степен на пенетрантност, достигаща до 100%, което означава, че носителят на мутацията ще развие болестта със сигурност в някакъв момент от живота (87). PGT-M се за болести като фамилна аденоматозна полипоза, фамилна меланома, синдром на ювенилна полипоза, неврофиброматоза тип 1 и тип 2, карцином на щитовидна жлеза, рак на гърда и яйчник (87, 113). Тъй като се касае за болести с късно начало и разработена терапия, съществуват задълбочени етични и морални дебати за това дали PGT-M трябва да се прилага такива случаи.

PGT-M може да се използва и за селекция пола (сексинг) на ембриони при полово свързани болести или определяне на HLA съвместимост с родено болно дете в семейството, нуждаещо се от трансплантация на стволови клетки, в страни, където законът позволява (114, 115).

### 2. PGT за структурни преустройства

PGT-SR се прилага в семейства, в които единият и/или двамата родители са носители на структурна хромозомна аномалия - балансирана транслокация, инверсия, дупликация/делеция (116). Приблизително 1,2% - 6,9% от двойките с репродуктивни проблеми имат балансирано пренареждане (117). Балансирани транслокации са открити при 3.2 % от двойките с повече от десет неуспешни ин витро цикъла (118-120). Такива мутации се наричат фамилни и в повечето случаи носителите са фенотипно нормални, но поради формиране на небалансирани гамети по време на мейозата имат значително повишен риск от репродуктивни неблагополучия - безплодие, спонтанен аборт, забавяне развитието на плода и вродени аномалии в потомството (121-126). PGT-SR се прилага за подбор на балансирани ембриони, като по този начин може да се предотврати предаването на небалансирано хромозомно преустройство в поколението (122). Тъй като обикновено се тестват всички хромозоми на ембриона, а не само участващите в хромозомното преустройство, е възможно да се докажат и допълнителни мутации по останалите хромозоми.

### 3. PGT за анеуплоидия

PGT-A (преди известен като предимплантационен генетичен скрининг – PGS, ПГС) идентифицира ембриони с de novo възникнали анеуплоидии, включително субхромозомни делеции и дупликации, в ембриони на двойки с нормален кариотип (127-131). Показания за PGT-A са напреднала репродуктивна възраст на майката, повтарящи се спонтанни аборти, предишни неуспешни ин витро процедури, тежък мъжки инфертилитет (132).

Приблизително 70% от абнормните ембриони в резултат на естествено оплождане или ин витро процедури спират развитие преди раждането. По-голямата част от ембрионите се губят през първия триместър, повечето преди имплантацията (133, 134). Високата честота на хромозомни аномалии е причина за спиране на развитието на голям процент от ранните ембриони. Небалансирани хромозомни преустройства се наблюдават при 75% от тридневните ембриони и 50% от бластоцистите. По-голямата част от тези аномалии завършват с неуспешна имплантация или спонтанен аборт обикновено в първия триместър на бременността (135).

Още през 60-те години на 20 век е наблюдавана корелация между спонтанните аборти и хромозомните аномалии (136, 137). Около 60% от спонтанните аборти са резултат на анеуплоидия (69, 70, 138-143). Анеуплоидията се наблюдава по-често в яйцеклетките (85%). При сперматозоидите представлява 7-8%. Останалите хромозомни аберации възникват случайно в ранния ембрионален стадий (144). Промени в еуплоидния брой на хромозомите могат да се появят във всяка възраст, но честотата нараства с възрастта на майката (>90% риск при жени над 40 години). (145-147).

Избягването на трансфер на анеуплоидни ембриони може да намали риска от спонтанен аборт и усложнения, свързани с прекъсване на бременността; да подобри вероятността от зачеване с жизнеспособен плод (148-150). Над 90% от ин витро центровете практикуват трофектодермална биопсия за PGT-A. Това позволява единичен еуплоиден трансфер на ембриони, което води до значително подобрена честота на забременяване (70% - 80%), нисък процент полиплоидни бременности и ниска степен на спонтанни аборти (29, 151-160).

Широкото приложение на микрочиповата сравнителна геномна хибридизация и секвенирането от ново поколение за PGT-A в последните години доведе до увеличаване детекцията на мозаицизъм в ембрионите (161). Мозаицизмът е естествено явление при значителен брой ембриони в ранен стадий, който възниква чрез митотични грешки или изоставане в анафазата (162). В ембрионалния мозаицизъм присъстват две или повече генетично обособени клетъчни линии, обикновено една с хромозомна аномалия, а другата с нормален хромозомен брой (51, 162-164). Въпреки факта, че някои мозаечни ембриони водят до здрави живородени деца поради възможността за корекция, в много случаи мозаицизмът е свързан с по-неуспешни клинични резултати в сравнение с еуплоидните ембриони (165-168). Ембриони с до 50% абнормни клетки се имплантират с подобна честота на еуплоидните ембриони (167). Ембриони с повече от 50% абнормни клетки имат по-ниска степен на имплантация и раждане (24.4% и 15.2%) в сравнение с мозаечни ембриони с по-малко от 50% абнормни клетки (48.9% и 42.2%) (5).

Поради този факт в повечето ин витро клиники трансферът на еуплоидни ембриони е с приоритет пред мозаечните (163, 165, 169, 170). След PGT-A, при липса на еуплоидни ембриони, може да се помисли за трансфер на мозаечни ембриони, като се вземат предвид свързаните с тях аномалии, както и степента на докладвания мозаицизъм. Ембрионите с по-ниски нива на мозаечна анеуплоидия (20-40%) са за предпочитане пред тези с по-високи нива (40-70%). Ембрионите, мозайки за тризомии, способни да доведат до живо раждане (хромозоми 13, 18, 21, 22), тризомиите, свързани с унипарентална дизомия (хромозоми 7, 11, 14, 15) и тризомиите, свързани с вътрематочно забавяне на растежа (хромозоми 2, 7, 16), са с най-нисък приоритет (171).

От съществено значение е генетичното консултиране на пациентите и получаване на писмено информирано съгласие за трансфер на мозаечни ембриони. Трябва да се обсъди възможността, че, макар и малко вероятно, може да настъпи бременност с хромозомно абнормен плод. Пациентите, които обмислят трансфер на небалансирани ембриони, при доказана бременност трябва да бъдат съветвани да се подложат на пренатален генетичен тест. Не трябва да се изключва възможността да се наложи индуцирано прекъсване на бременността по медицински показания (165, 169, 170).

## VII. Преимущества и приложения на PGT-A процедурата

### 1. Политика за единичен трансфер на ембриони eSET

Многоплодната бременност може да има неблагоприятни ефекти като повишен риск от преждевременно раждане и перинатална смърт (172). За да се намали честотата на многоплодни бременности, се препоръчва ограничаване на броя на трансферираните ембриони, особено при пациенти с добра прогноза (173). Осъществяването на единичен ембриотрансфер е най-очевидният начин за избягване на риска от двуплодна бременност след ин витро процедури. Възприемането на тази стратегия е дискутабилно и е задължителна практика само в някои страни (174).

В този контекст, прилагането на стратегията PGT-A представлява възможност за избор на ембриони за трансфер. Важно да се посочи е, че eSET не оказва отрицателно въздействие върху кумулативната честота на живо раждане.

Проучване на Cochrane et al. не показва доказателства за значителна разлика в кумулативната честота на живо раждане между единичен цикъл с двоен ембриотрансфер и многократни eSET (175).

Според Ubaldi et al. прилагането на eSET в комбинация с подходящия подбор на бластоцисти от PGT-A може да се счита за ефективен подход и при жени в напреднала възраст. В действителност, след въвеждането на политиката за eSET, съчетана с PGT-A, степента на многоплодна бременност намалява от 21.0% на 6.8%, поддържайки постоянна кумулативната успеваемост на IVF процедурите (176).

### 2. Време до постигане на бременност

Двойките, подложени на няколко неуспешни ин витро опити или аборти, могат да бъдат подложени на икономически и психологически тежести. Освен това за жени над 35 години бременността представлява своеобразна надпревара с времето. При извършване на PGT-A двойката може да зачене с нормален ембрион за по-кратко време, тъй като се осъществява трансфер само на еуплоидни ембриони и това може да бъде предимство главно за пациенти с напреднала възраст на майката.

В рандомизирано контролирано проучване Rubio et al. времето за постигане на успешна бременност е скъсено при пациенти, подложени на PGT-A, но не съществено (177).

Наскоро ретроспективно кохортно проучване, включващо жени в напреднала възраст, показа, че групата, в която е приложен PGT-A, е постигнала клинична бременност, водеща до живо раждане за по-кратко време, в сравнение с контролната група (104,8 дни срещу 140,6) (178).

По-краткото време за достигане на бременност води до намаляване на броя на ембриотрансферите с последващо намаляване на разходите по IVF процедурите (177).

### 3. Психологически аспект на PGT-A процедурата

Индикацията за провеждане с PGT-A вследствие на многократни аборти и повтарящи се имплантационни неуспехи може да се основе на психологическите последствия, които често включват скръб, вина, загуба и в някои случаи психични смущения, включително депресия, тревожност и посттравматично стресово разстройство (179). В допълнение загубата на предишно бебе може да повлияе на психологическата нагласа към следваща евентуална бременност и на привързаността на родителите към деца, родени в резултат на тази бременност (180).

Следователно въз основа на предполагаемата възможност за намаляване на времето до достигане на бременност, PGT-A често се предлага за редуциране на емоционалното страдание от множество трансфери на ембриони с отрицателни резултати.

Освен това криоконсервирането на ембриони с реален потенциал за имплантиране поради еуплоидния им статус може да успокои жените за семейното им планиране.

Нито едно проучване до момента не е оценило психологическите последици от PGT-A процедурите, при които се наблюдават единствено анеуплоидни ембриони за трансфер. В този случай PGT-A може да представлява психологически повратен момент (177).

## VIII. PGT в световен мащаб

Действителният брой извършени до момента ин витро цикли с PGT може само да бъде предположен. Доскоро в САЩ съществува изискване получените чрез PGT клинични данни да бъдат докладвани към Обществото за Асистирани Репродуктивни Технологии (SART - Society for Assisted Reproductive Technology), което публикува бази данни за ин витро цикли и резултати на американските клиники по репродукция.

Формират се две международни групи за PGT, които извличат и събират данни от извършени ин витро процедури с PGT. Съществува и форум за центрове, прилагащи PGT, с цел обмен на информация, разработване на мерки за качествен контрол и определяне на стандартна практика за получаване на най-добри резултати. Предоставят се възможности за образование и практически семинари в сферата на предимплантационния генетичен тест.

През 1997 г. от ESHRE е създаден консорциум за PGD, който ежегодно обединява данните, получени за PGT от ин витро клиниките (181).

Индикациите за PGT показват значителни промени през последните години. Според консорциума на ESHRE за PGD в рамките на 10 години (от 1997 до 2007 година) са докладвани 27 630 PGT процедури, 61% от които са били за анеуплоиден скрининг, 17% за моногенни нарушения, 16% за хромозомни аномалии, 4% за определяне на пола при Х-свързани заболявания и 2% за определяне на пола по социални причини. От тези 27 630 PGT цикъла 26 609 стигат до етап на диагностика, а 19 901 – до трансфер (74%). При останалите 6708 цикъла не се достига до ембриотрансфер поради абнормни ембриони, ембрионален арест или неинтерпретабилни резултати. Като резултат са постигнати 5187 клинични бременности, 4140 раждания и 5135 новородени (3182 родени от едноплодни бременности деца, 921 близнаци и 37 тризнаци) (3).

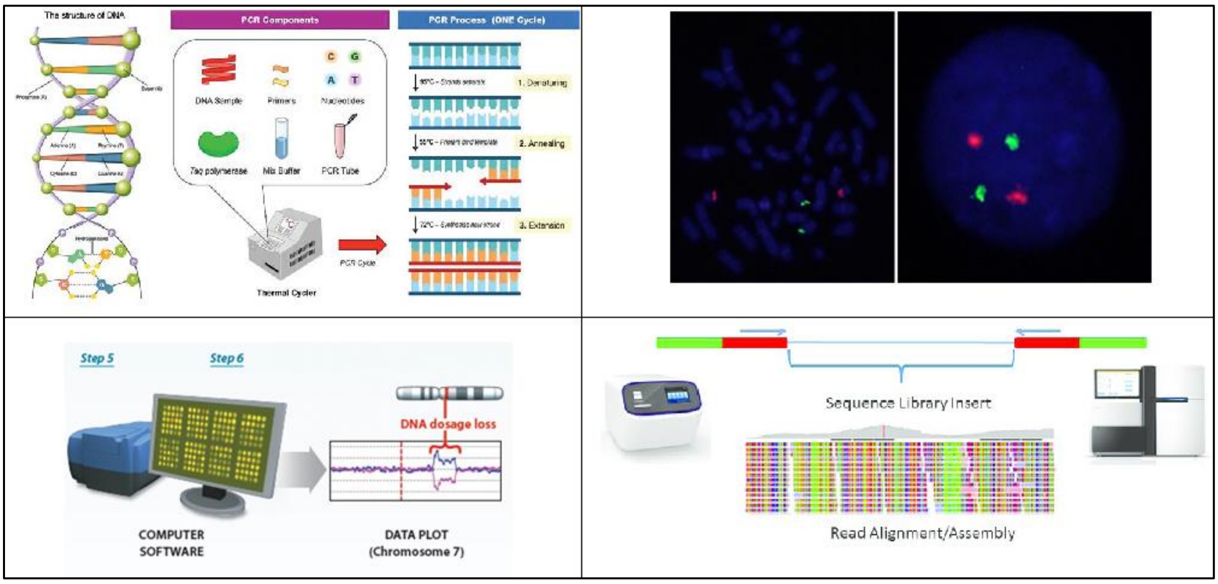
През 2013 г. консорциумът за PGD съобщава данните от 115 регистрирани ин витро центъра, извършващи PGT. Събрана е информация от 51,589 цикъла с PGT, извършени за следните индикации: моногенни болести (11,084 цикъла, 21%), скрининг за анеуплоидия (30,033 цикъла, 58%), наследствени хромозомни аномалии (8104 цикъла, 16%), определяне на пола, Х-свързани болести (1603 цикъла, 3%) и определяне на пола поради социални причини (765 цикъла, 2%) (182).

Като допълнение към консорциума за PGD, през 2003 г. Verliski и Kuliev организират Международно дружество за PGD (PGDIS - Preimplantation Genetic Diagnosis International Society) в Чикаго с цел провеждане на срещи, посветени на образованието и развитието в областта на PGT. PGDIS описва повече от 100,000 цикъла с PGT, проведени в целия свят през последните 23 години. Почти 80% от тези цикли са проведени за анеуплоиден скрининг, 12% - за един моногенни разстройства, 6% - за хромозомни преустройства и 2% - за HLA съвместимост с цел трансплантация на стволови клетки. Тези данни, както и данните от консорциума за PGD, потвърждават, че основната индикация за провеждане на PGT е анеуплоидният скрининг (181).

## IX. Методи за генетичен анализ при PGT

През последните две десетилетия диагностичните и научно-изследователските възможности в областта на моногенните и хромозомните болести се обогатиха извънредно много в методологично отношение. Този прогрес е тясно свързан с напредъка в биохимичната и молекулната генетика (Фиг. 4).

*Фиг. 4. Развитие на технологиите за генетичен анализ при PGT през последните години (по часовниковата стрелка) – развитие на молекулно-генетични техники като секвениране и PCR през 80-те; приложение на FISH-метода през 90-те, изобретяването на молекулното кариотипиране чрез ДНК-микрочипова сравнителна геномна хибридизация в края на 90-те и анализ чрез секвениране от ново поколение от 2000 г. до наши дни:*




(снимки – www.thebiologynotes.com, www.abnova.com, www.researchgate.net, Diagram of the microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) process, Theisen, 2020)

### 1. PCR (полимеразна верижна реакция)

Първоначално полимеразната верижна реакция е приложена клинично за предимплантационна диагностика на Х-свързани рецесивни заболявания. Целта е прехвърляне на мъжки ембриони, които имат 50% вероятност да бъдат засегнати. Полът на ембрионите се определя, като се използват праймери за Y-хромозомни специфични повтарящи се ДНК последователности.

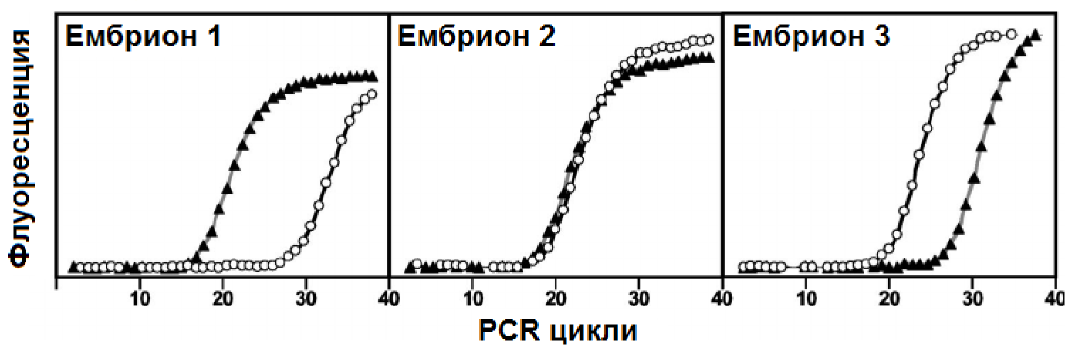
Понастоящем PCR методът се прилага за ПГД на редица моногенни заболявания, сред които муковисцидоза, бета таласемия, епидермолизис булоза, сърповидноклетъчна анемия, анемия на Фалкони, фамилна аденоматозна полипоза, хорея на Хънтингтън, синдром на чуплива X хромозома и др. Техниката може да бъде използвана и за ПГС за анеуплоидии.

Основните недостатъци при използване на PCR за PGT са повишената честота на замърсяване, възможността за неуспешна амплификация и allele drop-out (ADO). Явлението ADO представлява преференциално успешно амплифициране на само единия от двата налични алела в хетерозиготни проби. Това представлява проблем при PGT на автозомни доминантни заболявания, където ADO на мутантния алел може да доведе до трансфер на засегнат ембрион.

**2. QF-PCR (количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция)**

Методът на количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция е най-мощното средство за количествен анализ на нуклеинови киселини. QF-PCR е използван много ефективно за откриване на множество копия на Y хромозомни последователности, *BRCA1* последователности и булозна епидермолиза (Фиг. 5). Техниката може да се използва за диагностициране на синдром на Даун, синдром на Едуардс и синдром на Патау, както и за идентифициране на други анеуплоидии при пациенти.

*Фиг. 5. QF-PCR за детекция на булозна епидермолиза – ембриони 2 и 3 са балансирани, ембрион 1 е засегнат от мутацията:*

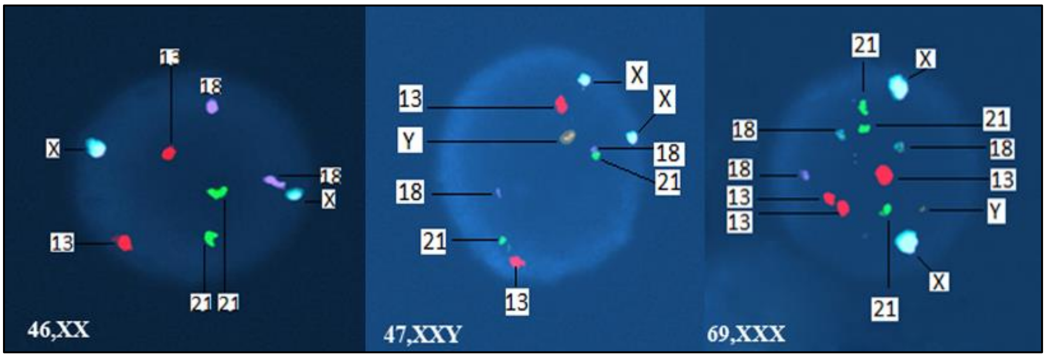



(фигура – Novel Hairpin-Shaped Primer Assay To Study the Association of the −44 Single-Nucleotide Polymorphism of the DEFB1 Gene with Early-Onset Periodontal Disease, Boniotto et al., 2004)

**3. FISH (fluorescent in situ hybridization)**

Значителен напредък при изучаването на генетичните заболявания е постигнат с откриването на флуоресцентна хибридизация in situ през 80-те години. FISH представлява бърза и надеждна техника в молекулярната цитогенетика. Методът позволява директна визуализация на специфични места в хромозомите чрез комплементарно свързване на флуоресцентно белязани проби към един или два бластомера, фиксирани върху предметно стъкло. Приложението на метода включва микроделеционен/микродупликационен анализ, идентификация на маркерни хромозоми, изясняване на структурни реаранжировки и генни преустройства и амплификации, асоциирани с неоплазми, определяне на пола при X-свързани заболявания, анеуплоиден скрининг (Фиг. 6) (149, 183).

*Фиг. 6. FISH анализ за анеуплоиден скрининг на бластомери от тридневни ембриони за хромозоми 13, 18, 21, X и Y. А) нормален женски бластомер; Б) синдром на Клайнфелтър; В) бластомер с триплоидия по изследваните хромозоми:*




(снимки – генетична лаборатория, МБАЛ „Надежда“, 2010)

***FISH техниката включва:***

- ***Фиксация*** – предварителна обработка на пробата, съдържаща таргетните клетки, при което протеините се денатурират и отстраняват за достъп на FISH-пробата до таргетната ДНК;
- ***Хибридизация***, която се състои в свързване на флуоресцентни ДНК проби с денатурирана таргетна ДНК;
- ***Промиване*** за отстраняване на несвързаната проба;
- ***Анализ*** на флуоресцентен микроскоп.

Използването на FISH за предимплантационен генетичен тест на анеуплоидии и транслокации в човешките ембриони е разработено за първи път в света от Сантяго Мън  и и Джейми Грифо (149, 183). Основното предимство на FISH за PGT е, че позволява хромозомно преброяване, което се извършва в интерфазните ядра без необходимост от култивиране, т.е. дава бърз резултат.

Ограничения на FISH техниката са високата цена на консумативите, необходимостта от наличие на множество специфични ДНК сонди, възможност за фалшиво положителни и фалшиво отрицателни резултати.

Интерфазният FISH създава технически трудности и е ограничен от броя хромозоми, които могат да бъдат изследвани в единична клетка. Вероятността от поява на артефакти по време на експеримента е по-голяма с нарастването на броя проби, което води до противоречиви резултати между клетките от един и същи ембрион и съответните ембриони могат да бъдат погрешно класифицирани като мозайки. Препоръчително е да не бъдат използвани повече от пет проби за пет различни хромозоми при едно изследване с FISH.

Липсата на даден сигнал може да бъде признак, както за наличие на монозомия, така и за неуспех на FISH техниката. Причини за неуспеха могат да бъдат неуспешна хибирдизация, загуба на ядрото по време на фиксация на бластомера, ниска способност за проникване на флуоресцентната сонда. Друг недостатък на FISH техниката е, че понякога близко разположени сигнали могат да се припокриват и изглеждат като единична точка или един сигнал да се разцепи и да изглежда като две отделни точки, което би могло да доведе до погрешна диагноза. В около 7,5% от случаите при FISH се наблюдава разцепване или припокриване на сигнали, могат погрешно да бъдат анализирани като две или повече отделни хромозоми и това от своя страна може да доведе до погрешна диагноза (184, 185).

Мозаицизмът на ембрионите също представлява проблем при FISH техниката, тъй като се изследва най-често един бластомер от ембрион на стадии 8 клетки. В нормално развиващия се ембрион, мозаицизмът се осъществява през второ, трето или последващо делене и следователно голям процент от ембрионите на стадии 8 клетки са мозаечни. Счита се, че наличието на мозаицизъм води до 5% погрешна диагноза (186).

## 4. Сравнителна геномна хибридизация

Сравнителната геномна хибридизация е молекулно-цитогенетична техника за детекция на небалансирани геномни промени (187). CGH методът е базиран на конкурентна хибридизация между ДНК от изследваната проба (т.нар. тест ДНК) и ДНК от нормални клетки (референтна ДНК), върху нормални метафазни хромозоми. Важно е да се отбележи, че CGH не дава информация за плоидността или локализацията на реаранжираните секвенции, отговорни за промяната в броя копия.

***CGH има няколко силни страни:***

- позволява анализ на целия геном за допълнителен или липсващ генетичен материал в единичен експеримент;
- не изисква метафазни препарати от пациента;
- може да бъде проведен при наличие на малък брой високопречистени клетки.

За първи път методът е приложен върху абортивен материал от фетуси и за пренатална диагностика през 1992 г. (188), а от 1995г. се използва в практиката от много водещи цитогенетични лаборатории (189). През 1999 г. за първи път се разработва метод за CGH върху единични клетки (взети от ембриони), както и върху цели ембриони (190) в предимплантационната им фаза.

5. **Микрочипова сравнителна геномна хибридизация (array CGH)**

Представлява молекулярно-цитогенетична техника за детекция на небалансирани геномни промени (187). Методът на микрочип-базираната сравнителна геномна хибридизация е разработен в края 90-те години от Солинас-Толдо и сътрудници и Пинкел и сътрудници (191, 192).

***В научната литература се натрупват все повече данни, които доказват големите предимства на array CGH пред конвенционалните методи:***

- много по-висока разделителна способност, позволяваща идентифициране на нови микроструктурни преустройства;
- разкриване на ниско-степенни мозаицизми;
- доказване на хромозомен дисбаланс при привидно балансирани преустройства.

Молекулното кариотипиране удвоява степента на детекция на хромозомните нарушения благодарение на високата си резолюция (193).

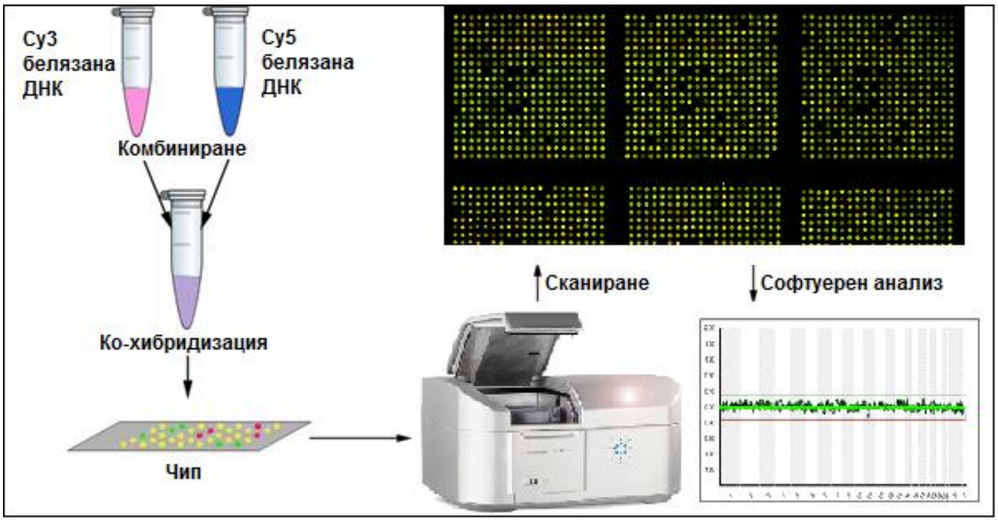
CGH методът е успешно приложим при анализ на хромозомните структури при пренаталната диагностика, а от 1999 година е разработен експериментален метод за CGH върху бластомер, взет от ембрион. По настоящем се изолира ДНК от няколко клетки на стадии бластоцист чрез използването на изменени олигонуклеотиди, въведени в полимеразната верижна реакция degenerate oligonucleotide primed (DOP–PCR), с помощта на които се намножава целият геном преди CGH анализа (190, 194). Първият случай на  бременност и раждане на здраво дете след този вид диагностика е регистран през 2001 година (195).

Използването на CGH за оценката на броя на хромозомните копия на всички хромозоми в човешкия предимплантационен ембрион позволява да се открият действителните аномалии и мозаицизъм на това ниво на предконцепционното развитие, тъй като най-често се взимат повече от една клетки на стадий бластоцист.

***Принцип на микрочиповия CGH***

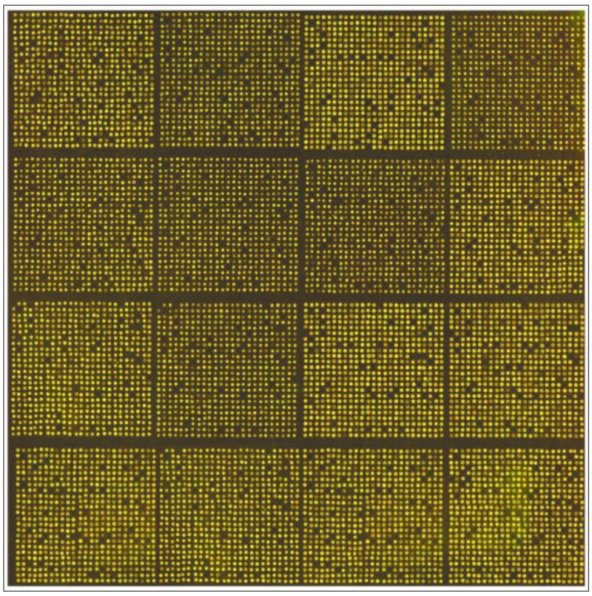
Принципът на микрочиповата CGH подобно на метафазната CGH се базира на конкурентната хибридизация на алтернативно белязани тествана и контролна ДНК върху картирани и секвенирани геномни клонове, фиксирани върху твърд носител под формата на микрочипове (Фиг. 7, 8).

*Фиг. 7. Схематично представяне на принципа на микрочиповата CGH:*




(фигура – Agilent, снимки – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“, 2010)

*Фиг. 8. Изглед на едно от двете полета на сканиран микрочип 24 sure v3 и 24 sure +:*



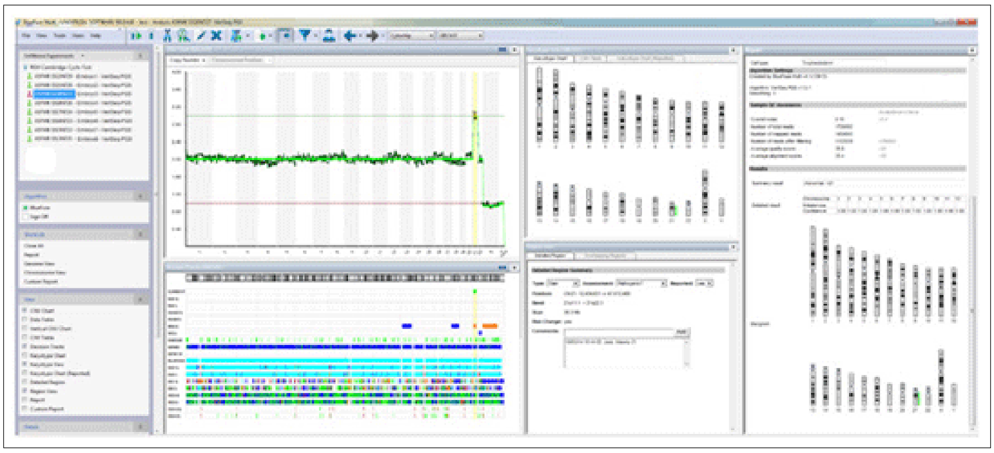
(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“)

Показан е примерен софтуерен анализ на ембрион (фиг. 9). Представени са ДНК профили с:

- нормален/балансиран мъжки хромозомен набор (фиг. 10);
- монозомия на хромозома 19 (фиг. 11);
- тризомия на хромозома 7 (фиг. 12)
- наличие на частична делеция на хромозома 11 и частична дупликация на хромозома 1 (фиг. 13).

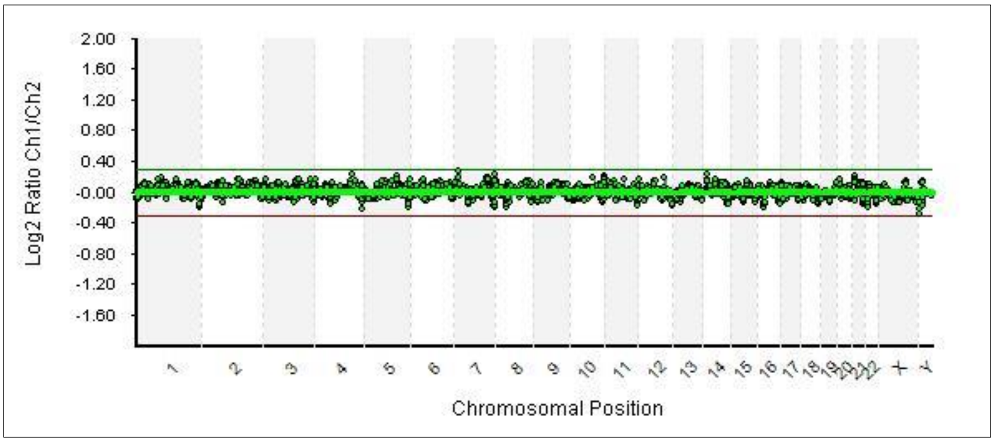
Показана е визуализация на балансирана хромозома (А), дупликация (Б) и делеция (В.) (Фиг. 14).

*Фиг. 9. Софтуерен анализ на скенирания чип с програма BlueFuse Multi version 4.3, (Illumina). Образ на белязаните ДНК-фрагменти върху 24 sure + микрочип:*



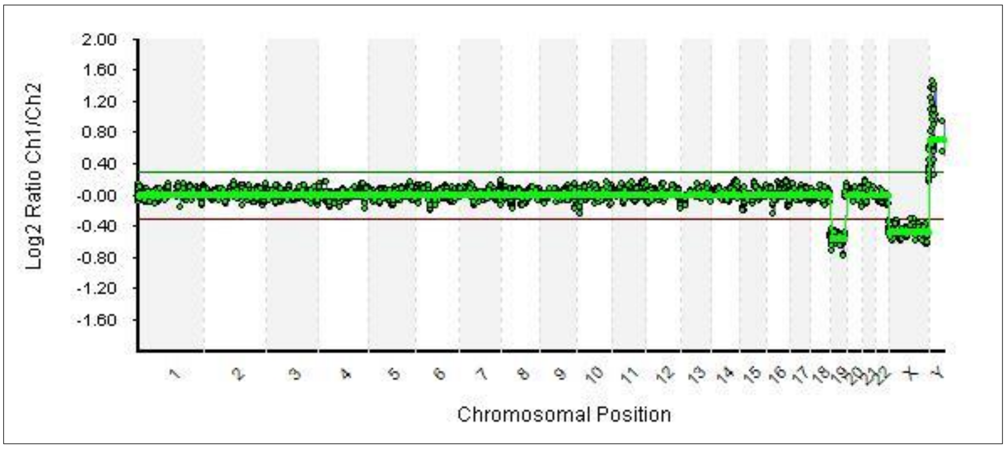
(снимка – Illumina, 2016)

*Фиг. 10. ДНК профил с нормален/балансиран мъжки хромозомен набор в тестваната ДНК. Тестването е извършено срещу мъжка контрола - arr(1-22)x2,(XY)x1:*



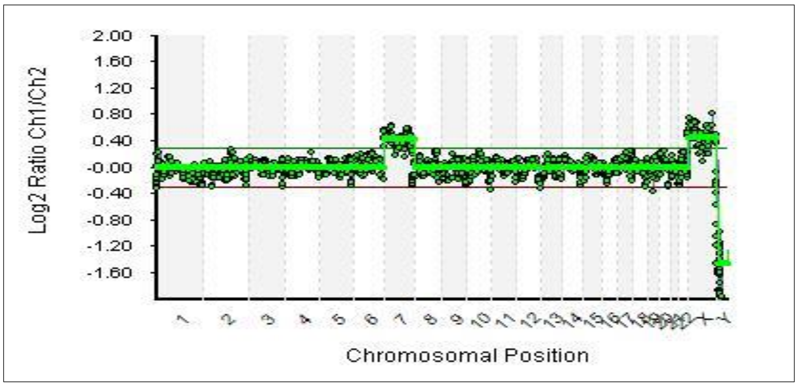

(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“)

*Фиг. 11. ДНК профил с монозомия на хромозома 19 в тестваната ДНК. Тестването е извършено срещу женска контрола - arr(19)x1,(XY)x1:*



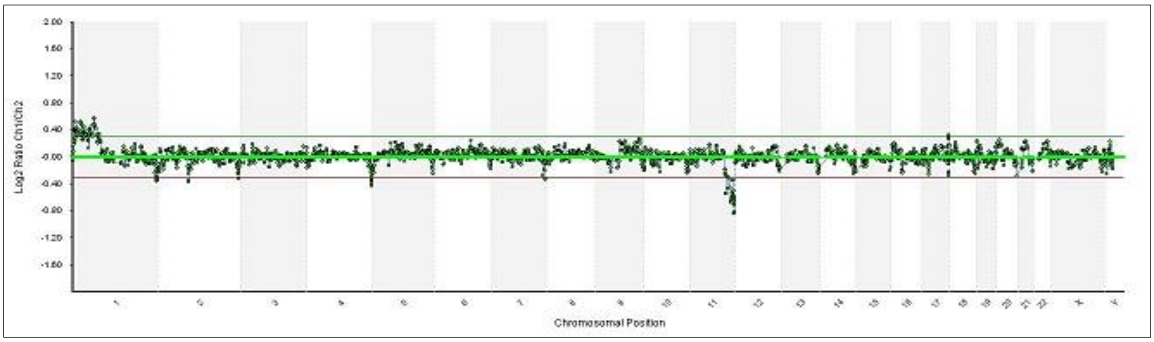

(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда")

*Фиг. 12. ДНК профил с тризомия на хромозома 7 в тестваната ДНК; Тестването е извършено срещу мъжка контрола - arr(7)x3,(X)x2:*



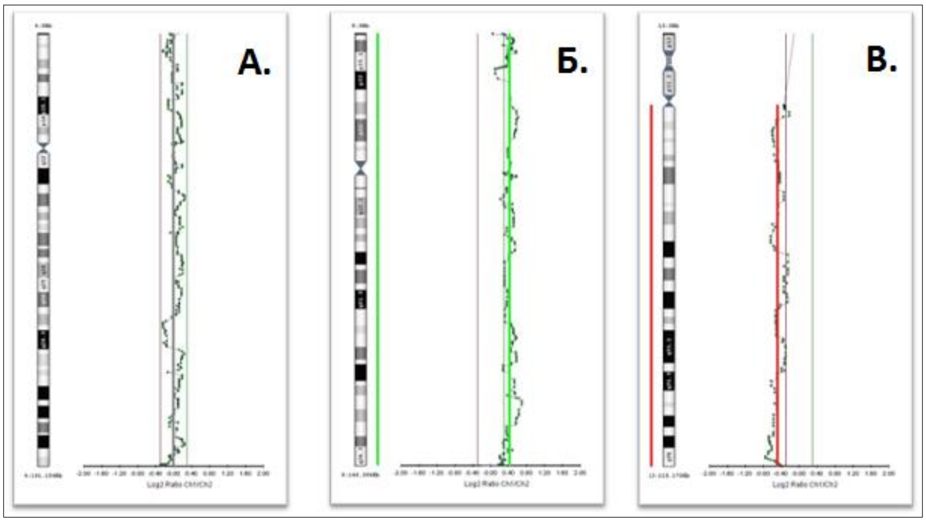

(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда")

*Фиг. 13. ДНК профил с наличие на частична делеция на хромозома 11 и частична дупликация на хромозома 1 в тестваната ДНК - arr (1)(pterp22.1)x3,(11)(q22.3qter)x1, (XY)x1:*



(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда")

*Фиг. 14. ДНК профил с визуализация на балансирана хромозома (А), тризомия (Б) и монозомия (В):*




(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“)

***Ограничения на микрочиповия CGH метод***

Наред със значителните предимства на молекулното кариотипиране съществуват и някои недостатъци. Методът не може да детектира балансирани транслокации и кратни промени на хаплоидния хромозомен набор, както и моногенни дефекти. Тъй като се отчитат само количествени разлики между тестваната и контролната проба, балансираните транслокации, които по дефиниция нямат загуба или допълнение на генетичен материал, не могат да бъдат засечени. При полиплоидните аберации двойният интензитет от полиплоидната ДНК проба не се детектира поради нормализацията на съотношението от интензитетите на флуоресцентните сигнали. Друг недостатък на метода е, че някои гени инкорпорират с различна ефективност най-често използваните багрила Cy3 и Cy5, което води до грешка при отчитането на резултатите. Този недостатък може да бъде преодолян като се проведе експеримент с размяна на флуорохромите (dye swap), при който тестваната ДНК се бележи веднъж със Cy3 и втори път със Cy5 и съответно контролната ДНК със Cy5 и Cy3.

## 6. Секвениране от ново поколение (NGS)

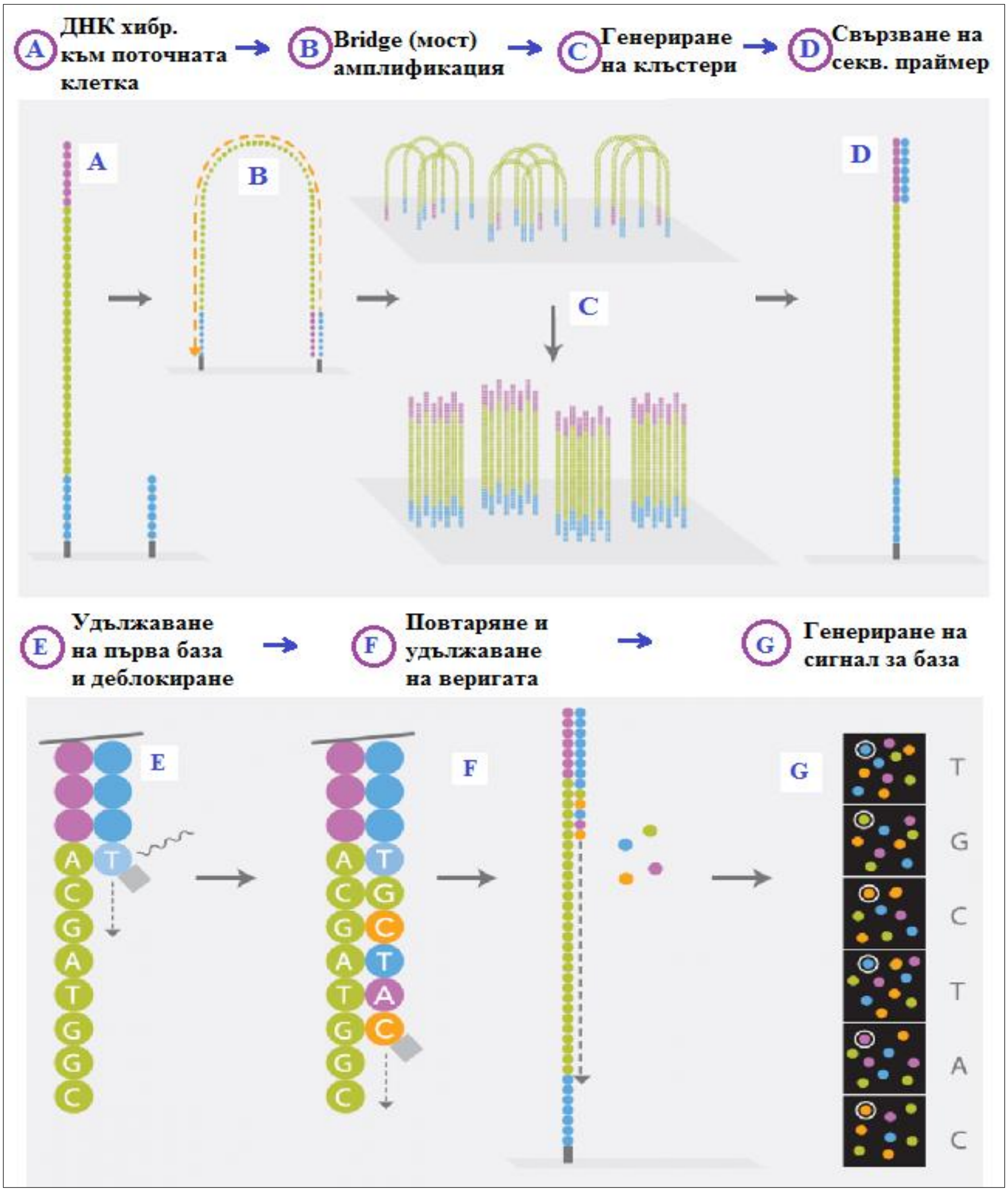
Технологиите за секвениране претърпяха силен тласък в развитието си през последните двадесет години. Появата на секвенирането от ново поколение съществено промени пейзажа на геномната медицина, превъзхождайки класическото секвениране по Сангер по много показатели - бързина (в една реакция могат да се изследват целия геном, екзом или панел от голям брой гени), точност на резултата, скрининг на генома без необходимост от предварителна информация относно суспектната генетична аномалия. Технологиите, базирани на секвениране, са по-ефективни и се характеризират с по-голяма чувствителност от повечето други скринингови подходи, което им дава подобрена способност за откриване на аномалии, представляващи трудност за диагностициране с помощта на алтернативни техники (20). NGS е в състояние да генерира бързо и икономически обосновано големи количества информация за последователността на ДНК.

NGS може да се приложи за секвенционен анализ на всяка част от генома, включително целия геном, отделни екзони и други региони, представляващи интерес (196-198). Повечето технологии за NGS се основават на принципа „секвениране чрез синтез“ (Sequencing-By-Synthesis – SBS), който позволява многократно увеличение на секвенционния капацитет (надвишава една терабаза) (199).

HighSeq и MiSeq платформите на Illumina използват секвенционна техника, базирана на флуоресцентно белязани терминални нуклеотиди. Използват се и ДНК библиотеки, които се амплифицират чрез мостов PCR. За тази цел геномната ДНК се фрагментира, краищата се поправят, и към 3‘-края на всеки фрагмент се добавят поли-А краища чрез Klenow ДНК полимераза (200). Полиаденилираните опашки служат за добавяне на частично комплементарни адаптери към двата края на двойноверижните фрагменти. Библиотеката се селектира спремо дължината на фрагментите и се поставя във flow клетка, за да се извърши мостовата амплификация (201). Използват се два характерни олигонуклеотидни праймера, forward и reverse, комплементарни на лигираните към библиотеките адаптери (202). Праймерите са свързани с 5‘-края си към повърхността на flow клетката чрез гъвкави линкери, така че амплифицираните от даден ДНК фрагмент молекули остават групирани в клъстер от около 1000 клонални ампликона. Преди самото секвениране ампликоните се линеализират и към 3‘-краищата се добавят секвенционни праймери. Тогава към flow клетката се добавят серия реактиви и започва етапът на „секвениране чрез синтез“.

Секвенционният етап е цикличен, като всеки цикъл представлява удължаване на новосинтезираната верига със само един нуклеотид. Използваните от Illumina нуклеотиди са модифицирани по два начина. Първо, всяка от четирите бази е свързана със специфичен флуорохром, което не изисква да бъдат добавяни към flow клетката поотделно (203). Второ, базите наподобяват дидезоксирибонуклеотидите, използвани при Сангер секвенирането, но те са „обратими терминатори“ - 3‘-хидроксилният остатък е блокиран от разцепваща се фракция, която не позволява инкорпорирането на повече от една база към новата верига (202). Затова всеки цикъл се записва самостоятелно и секвенирането може да продължи преди терминиращият край да се разцепи от нуклеотида и да се разкрие хидроксилната група (фиг. 15) (204).

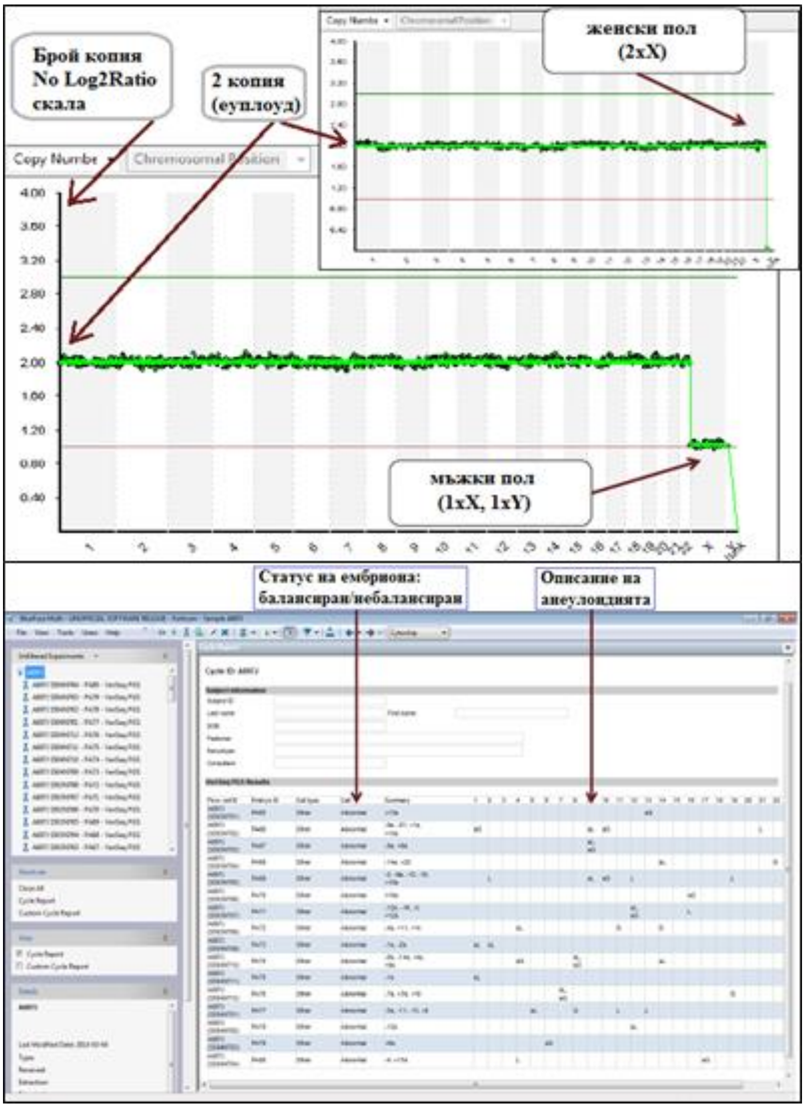
*Фиг. 15. Хибридизация на ДНК фрагментите, мостова амплификация, генериране на клъстери, свързване на секвенционни праймери, удължаване на ДНК веригата и генериране на сигнал:*




(снимка – Illumina, 2016)

След приключване на разчитането на базите, автоматично се включва MiSeq Reporter софтуерът за анализ и започва първичният анализ на получените секвенции от самия секвенатор (фиг. 16). Софтуерът извършва демултиплексиране и разпределяне на секвенциите за всеки един от пациентите в отделна директория. Освен това получените секвенции се подравняват с референтния човешки геном (версия GRCh37) и несъответствията се отчитат като варианти. Данните от всяко секвениране могат да се запазят в облака на Illumina - BaseSpace, като това позволява впоследствие да се извършват различен тип допълнителни анализи на други платформи.

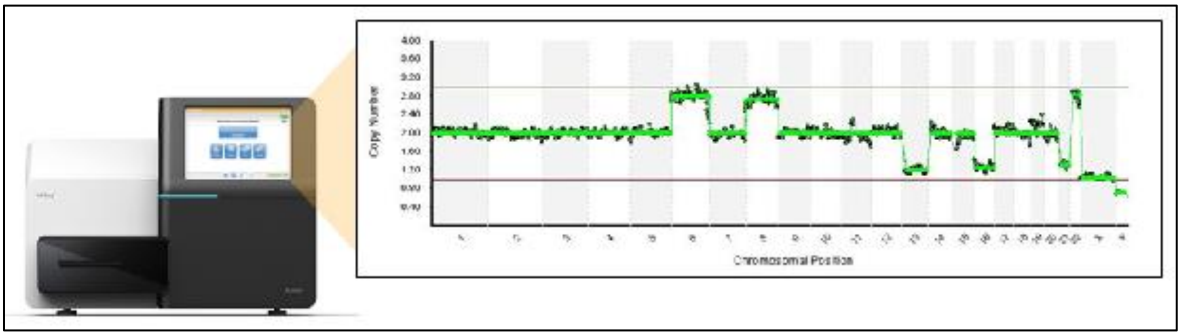
*Фиг. 16. Анализ на секвенционните данни от MiSeq Reporter:*




(схема – Illumina, 2016)

Понастоящем NGS техниката има широко приложение като метод за предимплантационен тест на ембриони поради високата чувствителност и малко необходимото количество ДНК проба (около 1 ng), което може да се получи при биопсия на бластомер или трофектодерм (Фиг. 17). Методът е сравнително бърз, като резултатите могат да са готови в рамките на 12 часа. Редица проучвания показват, че NGS подобрява процента на осъществяване на биохимична бременност в сравнение с array CGH в единични размразени еуплоидни ембриони (15.1% срещу 8.7%), а също и степента на имплантация (71,6% срещу 64,6%) (205).

*Фиг. 17. PGT с NGS метод, показващ небалансиран ембрион от мъжки пол с тризомия на 6-та, 8-ма и 22-ра хромозоми и монозомия на 13-та, 16-та и 21-ва хромозоми:*




(снимки – Illumina, генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“, 2019)

## X. Обобщение

Успехът от PGT е в пряка зависимост от успеваемостта на ин витро клиниките, в този смисъл PGT трябва да се прилага само в най-добрите ин витро клиники след изчерпателна медико-генетична консултация. При реализиране на бременност се препоръчва инвазивна пренатална диагноза за валидиране на резултата от PGT.

При деца родени след ин витро процедура с PGT не е установена по-висока честота на вродени аномалии в сравнение с контролна популация.

Благодарение на техническия прогрес при асистираната репродукция и геномните технологии, PGT има потенциала да се превърне в изключително важно оръжие в борбата ни с генетичните заболявания, като в бъдеще може да се окаже ефикасен метод дори за елиминиране на редица наследствени болести от общата популация. PGT е ефективен начин за увеличаване на шанса за раждане на здраво дете. Той е толкова по-малко травмиращ от аборта, че неминуемо ще се превърне във важен подход при превенцията на генетични болести и раждането на увредени деца.

В допълнение PGT увеличава шансовете за забременяване с нормален ембрион, скъсява времето за постигане на бременност и намалява риска от аборт. От друга страна се явява и икономически ефективен подход, тъй като редуцира броя на неуспешните трансфери и елиминира необходимостта от прекъсване на желана бременност по медицински индикации.

# ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

## I. Цел

Целта на настоящата дисертация е да се изследват предимплантационни човешки ембриони чрез цялостен геномен скрининг с микрочипова сравнителна геномна хибридизация и секвениране от ново поколение за разкриване на геномни нарушения.

## II. Задачи

1. Да се разработят и оптимизират ефективни протоколи за:
   - Изолиране и амплифициране на ДНК от единични трофектодермални клетки;
   - Цялостен геномен скрининг с микрочипова сравнителна геномна хибридизация на предимплантационни човешки ембриони за разкриване на геномни нарушения;
   - Цялостен геномен скрининг със секвениране от ново поколение на предимплантационни човешки ембриони за разкриване на геномни нарушения;
2. Да се анализират причините за насочване на пациенти за провеждане на предимплантационен генетичен тест (PGT);
3. Да се определи честотата и типа на геномните нарушения в предимплантационни човешки ембриони;
4. Да се анализира разпределението на типовете мутации в предимплантационни ембриони при фамилни хромозомни преустройства;
5. Да се определи ролята на възрастовия фактор за възникване на анеуплоидии в човешки предимплантационни ембриони;
6. Да се установи честотата на биохимични бременности, спонтанни аборти и живо родени след PGT;
7. Да се разработят критерии за трансфер на приоритетни ембриони съобразно генетичния им статус;
8. Да се създаде електронна база данни, съдържаща клинични данни за всеки пациент.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

***Участници в проучването***

Основната група пациенти е съставена от 185 двойки с репродуктивни неблагополучия. При по-голямата част от пациентите е извършен постнатален хромозомен анализ. Възрастта на изследваните лица от женски пол е 26 до 45, като средната възраст е 35,5 години.

Критериите за включване на двойките в проучването са доказани балансирани хромозомни преустройства, хромозомен дефект на предишно дете в семейството, напреднала възраст на майката, нежелание за селективен аборт, спонтанни аборти, несполучливи предишни ин витро опити или при повтарящи се случаи на ембриони с лошо качество.

Участниците са запознати със същността на изследването от лекар акушер-гинеколог или генетик и са подписали информирано съгласие за участие.

Основната част от пациентите за настоящото проучване са набрани от Болница за женско здраве МБАЛ „Надежда“ в град София.

***Биологични проби***

На по-голямата част от участващите двойки е извършен постнатален хромозомен анализ с цел да се установи дали са носители на редки балансирани хромозомни преустройства. От пациентите е взета венозна кръв чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. За изготвяне на лимфоцитни култури кръвта е събирана във вакутейнери с Li-Heparine (4 ml). Кръвта е взета до един час след нахранване (във връзка с постпрандиалната левкоцитоза) и съхранявана на +4ºC до транспортирането в лабораторията. Посяването на лимфоцитни култури е извършвано в рамките на същия ден или не по-късно от 24 часа след вземане на кръвта. При провеждането на експериментите са съблюдавани аспектите на добрата лабораторна практика за безопасна работа с биологичните агенти – ръкавици, очила, ламинарни боксове, отделни стаи за ДНК изолиране, стерилни камери, стерилни съдове, специални контейнери за отпадъците.

От 185 двойки са изследвани общо 497 ембриона от 231 ин витро цикъла. Трофектодермалната биопсия е извършвана на стадий бластоциста на 5-6 ден след оплождането.

***Етапи на генетичния анализ:***

- Подготовка за ин витро оплождане;
- Получаване на яйцеклетки чрез пункция на фоликулите;
- Вземане на сперматозоиди;
- Оплождане на яйцеклетките от сперматозоидите чрез IVF/ICSI;
- Биопсия на трофектодерм;
- Изолиране на ДНК от трофектодерма;
- Намножаване (амплифициране) на ДНК;
- ДНК анализ чрез микрочипов анализ или новогенерационно секвениране;
- Трансфер на селектираните ембриони в матката. Балансираните/нормалните ембриони, които не се използват, са замразявани. В зависимост от желанието на семейството дефектните ембриони са унищожени, замразени или дарени за научни цели.

***Използвани методи:***

В настоящата работа беше приложена комбинация от цитогенетични, молекулно-цитогенетични и молекулни методи:

1. ***Конвенционален цитогенетичен метод на пациенти за търсене на хромозомна патология;***
2. ***PGT с aCGH базирани ДНК микрочипове:***
    - Изолиране на ДНК от трофектодермални клетки чрез SurePlex протокол с кит SurePlex DNA Amplification System;
    - Оценка на качеството и количеството на тестваната ДНК;
    - Сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове;
    - Скениране на микрочипове;
    - Софтуерен анализ на получените резултати;
    - Критерии за отчитане на резултатите от експеримента.
3. ***Новогенерационно секвениране (секвениране от ново поколение):***
    - Изолиране на ДНК от трофектодермални клетки чрез SurePlex протокол с кит SurePlex DNA Amplification System;
    - Приготвяне на библиотеки за секвениране;

- Секвениране с кит VeriSeq (Illumina, USA);
- Софтуерен анализ на получените резултати;
- Критерии за отчитане на резултатите от експеримента.

## I. Конвенционален цитогенетичен метод

*<u>Реактиви:</u>* Lymphochrome (готова комплексна среда за култивиране на лимфоцити от периферна кръв); стерилен филтриран колцемид с концентрация 10μg/ml; 0,75 моларен хипотоничен разтвор на KCl; пресен фиксатор от метанол и ледена оцетна киселина в съотношение 3:1 на -20°C.

*<u>Апаратура</u>:* стерилен ламинарен бокс L226 Workstation (K systems); центрофуга Centrifuge 5810R (Eppendorf); устройство за разбъркване Vortex-Genie 2 (Scientific Industries); термостат Galaxy 170R на 37°C (New Brunswick).

*<u>Техника</u>:* техниката на рутинния цитогенетичен анализ, провеждан на краткосрочни лимоцитни култури, включва няколко основни етапа: 1) поставяне на клетъчни култури от цялостна кръв; 2) обработка на културите; 3) изготвяне на микроскопски препарати; 4) оцветяване на препаратите; 5) микроскопски анализ.

### 1. Поставяне и обработка на клетъчни култури от цялостна кръв

За култивиране се предпочита прясно взета венозна кръв, но при съхранение до 5 дни при 4°C също може успешно да се култивира. Кръвта се взима в епруветка с Li- или Na-хепарин или с Na-цитрат като антикоагулант. Средата за култивиране (Lymphochrome) се разлива по 5 ml в стерилни флакони за култивиране. За всеки пациент се посява по 1 култура, като се работи в стерилен ламинарен бокс L226 Workstation (K systems). Във всеки флакон се добавя по 0,5 ml кръв.

- Инкубира се на 37°C за 68 - 72 часа;
- Между 68 и 72 час към културата се добавя по 0,05 ml колцемид;
- Инкубира се за 20 min в термостат на 37°C;
- Културата се прехвърля в центрофужна епруветка;
- Центрофугира се за 10 min на 1200 оборота;
- Отпипетира се надстоящата течност;
- Утайката се разбива;
- Добавят се 5 ml предварително темпериран на 37°C хипотоничен разтвор на KCl;
- Инкубира се 10 min в термостат при 37°C;
- Центрофугира се за 10 min на 1200 оборота;
- Отпипетира се супернатанта, утайката се разбива и се добавят 5 ml пресен студен фиксатор;

- Горните две стъпки се повтарят още два пъти. Центрофугира се за 10 min на 1200 оборота;
- Отпипетира се супернатанта;
- Утайката се ресуспендира в малко количество пресен фиксатор и се съхранява на -20°C;

**2. Изготвяне на микроскопски препарати**

*<u>Апаратура</u>:* нагревателна плоча VMS-C10 (VMR Advanced).

*<u>Техника</u> (накапване на фиксираната лимфоцитна суспензия върху предметни стъкла):*

- Предметните стъкла се обезмасляват предварително за 24 часа в абсолютен алкохол, изплакват се и се охлаждат в дестилирана вода до 4°C;
- За накапване се използва охладена клетъчна суспензия. Преди накапването епруветките може да се оставят за 30 min във фризер – за по-добро фиксиране и разпръсване на хромозомите;
- Накапването се прави от височина 25 - 30 cm на хоризонтално разположени студени, мокри предметни стъкла;
- Стъклата леко се отцеждат и се сушат на въздух при стайна температура, наклонени под ъгъл 60°;
- Всеки препарат се надписва: амбулаторен номер на пациента, година, номер на посявката, номер на стъклото, абревиатура на оцветителната техника;
- Изсушените препрати се поставят за 30 - 40 min на термостатна плоча, нагрята до 80°C;
- Оцветяването започва след като препаратите се охладят до стайна температура.

**3. Оцветяване на препаратите с GTG – техника**

*<u>Апаратура</u>:* светлинен микроскоп BX51 с увеличение 1000 пъти (Olympus)

*<u>Реактиви</u>:* PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.92 g $Na_2HPO_4$, 0.2 g $KH_2PO_4$, 1000 ml $dH_2O$), трипсин, буфер $KH_2PO_4$ (9,53 g $KH_2PO_4$, 1000 ml $dH_2O$), буфер $Na_2HPO_4$ (9,93 g $Na_2HPO_4$, 1000 ml $dH_2O$).

*<u>Техника</u> (приготвяне на батерията за оцветяване):*

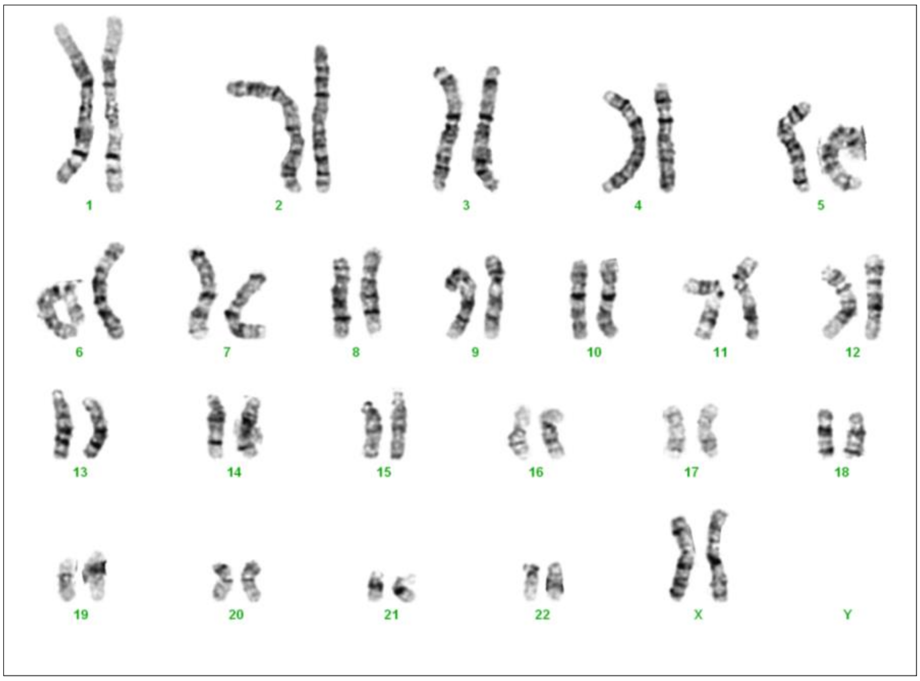
- *I-вата кювета* (стайна температура): 15 mg трипсин в 75 ml PBS. Престой на препаратите: 1 - 2 min (времето на престой се определя емпирично).
- *II-рата кювета* (4°C): 75 ml PBS. Престой на препаратите: проплакване на стъклата

- *III-та кювета* (4°C, pH=6.8): 34 ml буфер $KH_2PO_4$, 41 ml буфер $Na_2HPO_4$, 3,5 ml боя на Gimsa (Merck). Престой на препаратите: от 3 до 4 min
- *IV-та кювета* (4°C): дестилирана вода. Престой на препаратите: проплакване на стъклата.
- Качеството на оцветяването се контролира на микроскоп. Оцветяват се както пресни препарати, така и препарати 7-ми ден. При експресно GTG оцветяване, препаратите се пекат на електрическа плоча при 80°C за 30-40 min.

**4. Микроскопски анализ**

За анализ се избират подходящи метафазни пластинки с добре разпръснати, непокриващи се хромозоми и отчетливо лентуване. При увеличение 1000 пъти всяка метафазна пластинка се анализира за бройни и структурни хромозомни аберации. При некомплицирани случаи се анализират 11 – 16 пластинки. При съмнение за мозаицизъм, броят на анализираните пластинки може да се увеличи до 100. Няколко пластинки се заснемани с устройство CV-M4+CL Progressive scan (Applied Imaging) и се кариотипират със софтуерна програма за автоматизиран анализ на метафазни хромозоми – CytoVision Version 3.93 на Applied Imaging (Фиг. 18).

*Фиг. 18. GTG лентувани метафазни хромозоми, софтуерна програма за автоматизиран анализ на метафазни хромозоми – Cytovision Version 3.93 на Applied Imaging – нормален женски кариотип 46,XX:*




(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“)

## II. Предимплантационен генетичен тест с aCGH базирани ДНК микрочипове

### 1. Изолиране на ДНК от трофектодермални клетки чрез SurePlex протокол с кит SurePlex DNA Amplification System за последващ микрочипов анализ

**_A. Подготовка на негативни контроли_**

**_B. Цялостна геномна амплификация: лизиране/екстракция на клетките_**

**_C. Цялостна геномна амплификация: преамплификационна процедура_**

**_D. Цялостна геномна амплификация: амплификационна процедура_**

SurePlex ДНК амплификационната система е включена в 24sure технологията и позволява амплификация на геномна ДНК от една или няколко клетки до количества, достатъчни за осъществяване на последваща хибридизация. SurePlex технологията се основава на случайна фрагментация на геномната ДНК и последваща амплификация с полимеразна верижна реакция чрез използване на съпътстващи универсални праймерни места (Фиг. 19, Табл. 1).

Поддържането на стерилни условия по време на амплификационната процедура е от изключително значение, тъй като замърсяванията могат също да бъдат амплифицирани и инкорпорирани в чипа. Поради тази причина е препоръчително процедурата да се извършва в стерилен ламинарен бокс с вертикален ламинарен поток с цел предотвратяване замърсяването на пробите.

Преди амплификацията е желателно клетките да бъдат промити в стерилен PBS, за да се минимализира неклетъчната контаминация.

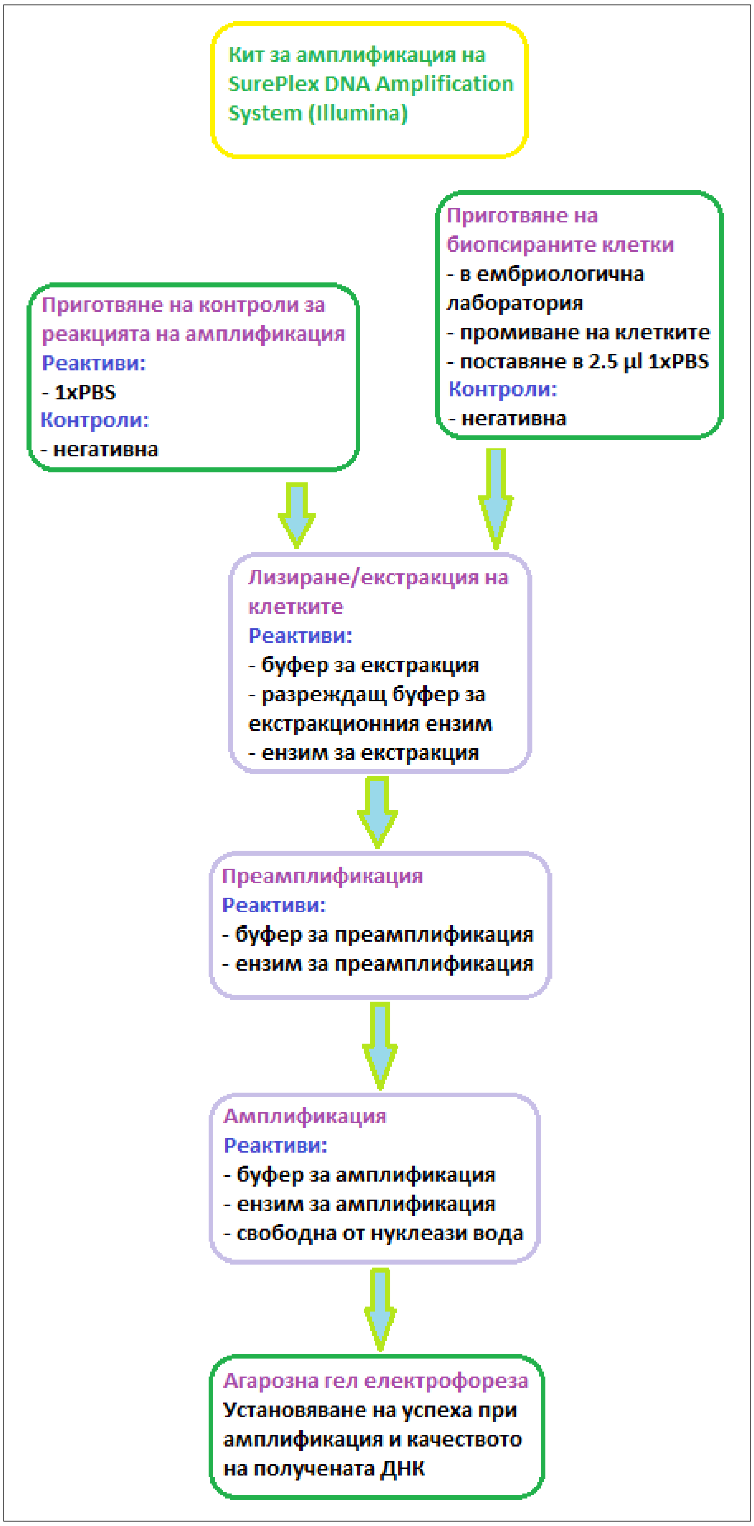
_Апаратура:_ стерилен ламинарен бокс L226 Workstation (K systems); центрофуга Mikro 220R (Hettich Zentrifugen); устройство за разбъркване Vortex-Genie 2 (Scientific Industries); термоциклер TC-4000 (Techne).

_Реактиви:_ стерилен 1xPBS (Cell Signaling Technologies 9808); кит SurePlex DNA Amplification System, включващ:

- буфер за екстракция на клетките (Cell extraction buffer);
- ензим за екстракция на клетките (Cell extraction enzyme;
- разреждащ ензима за екстракция на клетките буфер (Extraction enzyme dilution buffer);
- буфер за пре-амплификация (SurePlex pre-amp buffer);
- ензим за пре-амплификация (SurePlex pre-amp enzyme);

- буфер за ампификация (SurePlex amplification buffer);
- ензим за амплификация (SurePlex amplification enzyme);
- чиста от нуклеази вода (Nucleaser-free water).

*Фиг 19. Обща схема на изолиране и амплификация на ДНК:*




(схема – Illumina, 2016)

*Табл. 1. Схема на компонентите на кит SurePlex DNA Amplification System:*

| **Компонент** | **Обем** | **Начин на подготовка** |
|---|---|---|
| разреждащ ензима за екстракция на клетките буфер (Extraction enzyme dilution buffer) | 300 µl | Размразява се на лед |
| разреждащ ензима за екстракция на клетките буфер (Extraction enzyme dilution buffer) | 300 µl | Размразява се на лед |
| ензим за екстракция на клетките (Cell extraction enzyme) | 15 µl | Прехвърля се на лед преди употреба |
| буфер за пре-ампификация (SurePlex pre-amp buffer) | 275 µl | Размразява се на лед |
| ензим за пре-амплификация (SurePlex pre-amp enzyme) | 15 µl | Прехвърля се на лед преди употреба |
| буфер за ампификация (SurePlex amplification buffer) | 1.4 µl | Размразява се на лед |
| ензим за амплификация (SurePlex amplification enzyme) | 50 µl | Прехвърля се на лед преди употреба |
| чиста от нуклеази вода (Nuclease-free water) | 1.8 µl | Размразява се на лед |

(схема – Illumina, 2016)

*Техника*:

Клетките от ембрионите са получени от ембриологичната лаборатория на МБАЛ „Надежда“ в резултат на трофектодермална биопсия, извършена на ден 5-6 след оплождането на ембрионите. За всяка проба при преминаване от ембриологичната в генетичната лаборатория е изготвен приемно-предавателен протокол, на който са отбелязани дата и час на пристигане и приемане на пробата, данни на пациентите, чиито ембриони подлежат на изследване, номера на ембрионите, данни на ембриолога, извършил трофектодермалната биопсия. Трофектодермалните клетки са поставени в 2,5 µl разтвор на 1xPBS (Cell Signaling Technologies 9808) в 0,2 ml стерилни PCR епруветки (Eppendorf). Всяка партида проби пристига с негативна контрола от ембриологичната лаборатория (2,5 µl разтвор на 1xPBS (Cell Signaling Technologies 9808) в 0,2 ml стерилна PCR епруветка (Eppendorf)).

За амплифициране се предпочитат прясно биопсирани трофектодермални клетки, но при съхранение във фризер на -20$^0$C също може успешно да се осъществи амплификация.

***A. Подготовка на негативни контроли:***

Амплификационната процедура е извършена в стерилен ламинарен бокс с вертикален ламинарен поток L226 Workstation (K systems). Изготвя се негативна контрола на генетичната лаборатория, аналогична на негативната контрола, получена от ембриологичната лаборатория. Отрицателната контрола представлява 2,5 μl разтвор на 1xPBS (Cell Signaling Technologies 9808) в 0,2 ml стерилна PCR епруветка (Eppendorf). Чрез използването на две негативни контроли – една от ембриологичната и една от генетичната лаборатория, се осъществява двоен контрол на контаминацията и по-лесно може да бъде установено на коя стъпка е възникнало замърсяването.

***B. Цялостна геномна амплификация: лизиране/екстракция на клетките:***

Епруветките с пробите и контролите се центрофугират на 200x$g$ за 3 минути на 4$^0$C. Към всяка проба и контрола се добавят по 2,5 μl буфер за екстракция на клетките (Cell extraction buffer). Пробите и контролите се съхраняват на 4$^0$C. На лед се приготвя се мастер микс екстракция на клетките (Табл. 2):

*Табл. 2. Схема на екстракционния микс:*

| **Реактиви за екстракционния микс** | **Количество на една проба** | **Количество на пет проби** |
|---|---|---|
| разреждащ ензима за екстракция на клетките буфер (Extraction enzyme dilution buffer) | 4.8 μl | 24 μl |
| ензим за екстракция на клетките (Cell extraction enzyme) | 0.2 μl | 1 μl |
| **Общ обем** | **5 μl** | **25 μl** |

(схема – Illumina, 2016)

Миксът се разбърква добре на вортекс и се центрофугира на пулс. Към всяка от пробите и контролите се прибавят по 5 μl от прясно приготвения микс за клетъчна екстракция. Центрофугира се за кратко и се инкубира в термоциклер на следната програма (Табл. 3.):

*Табл. 3. PCR програма за лизиране/екстракция на клетките:*

| | | |
|---|---|---|
| **1 цикъл** | $75^0C$ | 10 min |
| **1 цикъл** | $95^0C$ | 4 min |
| **1 цикъл** | Стайна температура | hold |

(схема – Illumina, 2016)

Винаги се използва термоциклер с предварително загрят капак.

***C. Цялостна геномна амплификация: преамплификационна процедура:***

Приготвя се мастер микс от преамплификационните реактиви (Табл. 4):

*Табл. 4. Схема на преамплификационния микс:*

| **Реактиви за преамплификационен микс** | **Количество на една проба** | **Количество на пет проби** |
|---|---|---|
| буфер за пре-амплификация (SurePlex pre-amp buffer) | 4.8 µl | 24 µl |
| ензим за пре-амплификация (SurePlex pre-amp enzyme) | 0.2 µl | 1 µl |
| **Общ обем** | **5 µl** | **25 µl** |

(схема – Illumina, 2016)

Миксът се разбърква добре на вортекс и се центрофугира на пулс. Към всяка от пробите и контролите се прибавят по 5 µl от прясно приготвения преамплификационен микс. Центрофугира се за кратко и се инкубира в термоциклер на следната програма (табл. 5):

*Табл. 5. PCR програма за преамплификационна процедура:*

| | | |
|---|---|---|
| **1 цикъл** | $95^0C$ | 2 min |
| **12 цикъла** | $95^0C$ | 15 sec |
| | $15^0C$ | 50 sec |
| | $25^0C$ | 40 sec |
| | $35^0C$ | 30 sec |
| | $65^0C$ | 40 sec |
| | $75^0C$ | 40 sec |

| | | |
|---|---|---|
| **1 цикъл** | $4^0C$ | hold |

(схема – Illumina, 2016)

***D. Цялостна геномна амплификация: амплификационна процедура:***

Продуктите от реакцията се оставят на лед. Приготвя се мастер микс от амплификационните реактиви (Табл. 6):

*Табл. 6. Схема на амплификационния микс:*

| **Реактиви за амплификационен микс** | **Количество на една проба** | **Количество на пет проби** |
|---|---|---|
| буфер за амплификация (SurePlex amplification buffer) | 25 µl | 125 µl |
| ензим за амплификация (SurePlex amplification enzyme) | 0.8 µl | 4 µl |
| чиста от нуклеази вода (Nucleaser-free water) | 34.2 µl | 171 µl |
| **Общ обем** | **60 µl** | **300 µl** |

(схема – Illumina, 2016)

Миксът се разбърква добре на вортекс и се центрофугира на пулс. Към всяка от пробите и контролите се прибавят по 60 µl от прясно приготвения амплификационен микс. Епруветките се разбъркват чрез обръщане, след което се центрофугират за кратко. Инкубира се в термоциклер на следната програма (табл. 7):

*Табл. 7. PCR програма за амплификационна процедура:*

| | | |
|---|---|---|
| **1 цикъл** | $95^0C$ | 2 min |
| **14 цикъла** | $95^0C$ | 15 sec |
| | $65^0C$ | 1 min |
| | $75^0C$ | 1 min |

(схема – Illumina, 2016)

Получените продукти се подлагат непосредствено на хибридизация или се съхраняват на $-20^0C$.

**2. Оценка на качеството и количеството на тестваната ДНК**

Оценка на качеството и количеството на тестваната ДНК беше направена чрез хоризонтална нисковолтова агарозна гел електрофореза. Хоризонталната нисковолтова агарозна гел електрофореза дава възможност ДНК фрагментите да се разделят според заряда и молекулната си маса. Затова тази техника се използва за определяне на количеството и качеството на ДНК. Разтвореният в агарозния гел етидиев бромид позволява визуализирането на ДНК под действието на UV- светлина (Фиг. 11).

*Апаратура:* нагревателен уред VMS-C10 (VMR Advanced) с магнитна бъркалка за разтапяне на агарозата, нивелирана масичка за изливане на гела, апарат за хоризонтална електрофореза (CS-300V, Cleaver), пластмасова вана за изливане на агарозния гел със стартови гребени, токоизправител (CS Cleaver), UV - трансилюминатор с дължина на вълната 315 nm (Mini BIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems).

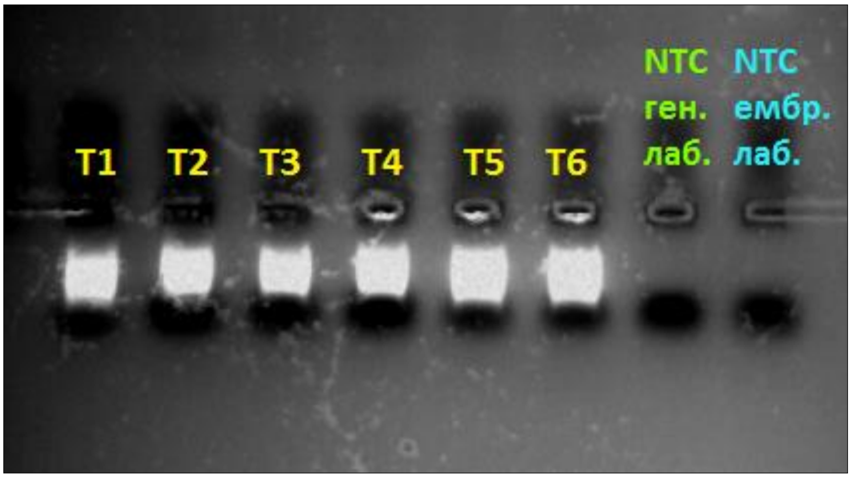
*Реактиви:* 10×TBE електрофоретичен буфер (pH 8.0, 90 mM Tris-HCl, 90 mM борна киселина, 1 mM $Na_2EDTA$), 1% агароза (Agarose, Genaxxon) в 1×TBE електрофоретичен буфер, 10 mg/ml етидиев бромид (AppliChem), разтвор за нанасяне на пробите (6x) (Gel Loading Dye Blue 6x, BioLabs).

*Техника:*

- Върху пластмасова ваничка за изливане на гел се поставя стартовия гребен.
- Приготвя се 1% агарозен гел: 1 g агароза в 100 ml 1×TBE буфер.
- Приготвената смес се вари на нагревателен уред с магнитна бъркалка до пълното стапяне на агарозата.
- Изчаква се температурата да спадне до 60-65°C, след което се добавят 7 μl етидиев бромид.
- Гелът се излива във ваничката и се изчаква до пълното му полимеризиране.
- Приготвя се микс за гела: 5 μl ДНК в 3 μl син разтвор за нанасяне на пробите.
- Електрофоретичната вана се напълва с 1×TBE буфер така, че да се покрие изцяло гела (около 400 ml).
- Под буфера в стартовите ямки на агарозния гел се накапват по 8 μl от микса за всяка проба.
- Разделянето се извършва при подавано напрежение от 130 V/cm.
- Гелът се оставя да тече в продължение на 15 min, след което се заснема (фигура 20).
- Фрагментите се визуализират с UV при 315 nm дължина на вълната.

*Фиг. 20. Електрофоретична оценка на качеството на изолираната ДНК.*

*Изследваната амплифицирана ДНК се визуализира като ясно флуоресциращи плътни ивици в гела – трофектодерм номера от 1 до 6 (T1, T2, T3, T4, T5 и T6). На стартовете, в които са накапани двете контроли (2.5 µl 1xPBS от генетичната и ембриологичната лаборатория), не се наблюдава флуоресценция – това означава, че е няма замърсяване с ДНК.*




(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“)

3. **Сравнителна геномна хибридизация върху aCGH базирани ДНК микрочипове**

**A. *Белязане на пробата***

**B. *Хибридизация***

**C. *Промиване***

В настоящата работа бяха използвани микрочипови платформи – 24 sure v3 и 24 sure $_{+}$ (Illumina). Принципът се състои в конкурентна хибридизация между белязани с различни флуоресцентни багрила (Cy3 и Cy5) тест- и контролна ДНК с фиксирани върху предметни стъкла ДНК секвенции (BAC - клонове).

<u>Апаратура:</u>

- Лазерен скенер DNA Microarray Scanner G2502 C (Agilent Technologies);
- Хибридизационна печка модел 777 (SciGene);
- Водна баня Hybex Microsample Incubator (SciGene);
- Вортекс Vortex-Genie 2 (Scientific Industries);
- Центрофуга Mikro 220R (Hettich Zentrifugen);

- Термоциклер TC-4000 (Techne);
- Термостат Galaxy 170R на 37°C (New Brunswick);
- Евапораторна центрофуга miVac DUO concentrator (GeneVac);
- Плот за разбъркване с магнитни бъркалки Stirrer SB 161-3 (Stuart);
- Стъклени кювети с размер 120/120/75 mm, в комплект с метални неръждаеми държатели за стъкла, Solmedia ST1100.

*Реактиви и консумативи:*

- Комерсиална мъжка и женска контролна ДНК (SureRef reference male/female DNA, Illumina);
- Кит за флуоресцентно белязане и хибридизация на ДНК, съдържащ: реакционен буфер; рандом праймери; Cy3 dCTP (Deoxycitosine Triphosphate); Cy5 dCTP (Deoxycitosine Triphosphate); Klenow ензим; хибридизационен буфер с 10% декстран (24 Sure Labelling, Illumina);
- Human Cot DNA (Illumina);
- Разтвори за промивка на хибридизиралите чипове, приготвени с 20xSSC буфер (Genaxxon), Tween20 (Calbiochem) и дестилирана вода;
- Микрочипова платформа 24 sure (Illumina, BAC – микрочипове, версия v 3.0, оптимална резолюция 20Mb, но резолюцията може да достигне около 10 Mb, за отчитане на промените в броя копия на 2909 секвенции от целия геном, покриващи всички 24 хромозоми със средна плътност 1 клон/1 Mb. Микрочиповете имат две отделни полета за хибридизация, даващи възможност за едновременен анализ на две проби върху един чип;
- Микрочипова платформа 24 sure + (Illumina, BAC – микрочипове, версия 1.0, резолюция 2-10 Mb, за изследване на промените в броя копия и големи субхромозомни структурни дисбаланси на 4834 секвенции от целия геном, покриващи всички 24 хромозоми със средна плътност 1 клон/600 Kb. Микрочиповете имат две отделни полета за хибридизация, даващи възможност за едновременен анализ на две проби върху един чип;
- Покривни стъкла с размери 22x22 mm (Deltalab);
- Шаблони за позициониране на чиповете при залепянето на покривните стъкла (Illumina);
- Хибридизационна камера;

- Формамид (Genaxxon).

*<u>Техника:</u>* включва няколко основни етапа:

- белязане на пробата;
- комбиниране на белязаните проби;
- хибридизация;
- промиване на хибридизиралите микрочипове;
- сканиране на микрочиповете;
- софтуерен анализ на данните.

***A. Белязане на пробата***

Белязането се осъществява на принципа на nick транслацията. Използват се рандом праймери за белязане на тестваната и контролната ДНК с различни флуорохроми, които имат различен емисионен спектър. При белязането на ДНК е важно да се работи на лед, а пробите да се пазят от пряка светлина. Реактивите се разбъркват на вортекс и се центрофугират за кратко. Приготвя се следния микс за белязане за една реакция (табл. 8):

*Табл. 8. Схема на микс за белязане (Illumina, 2016):*

| **Компонент** | **Cy3 микс за белязане** | **Cy5 микс за белязане** |
|---|---|---|
| Реакционен буфер (Reaction buffer) | 5 µl | 5 µl |
| Разтвор на праймери (Primer solution) | 5 µl | 5 µl |
| dCTP микс за белязане (dCTP-labelling mix) | 5 µl | 5 µl |
| Cy3 dCTP | 1 µl | - |
| Cy5 dCTP | - | 1 µl |
| SureRef | - | 8 µl |
| Общо | 16 µl | 24 µl |

(схема – Illumina, 2016)

Приготвя се аликвот от 16 µl от Cy3 микс за белязане за всяка получена проба, към който се прибавят 8 µl изолирана ДНК от всяка проба. Приготвят се аликвоти от 24 µl от Cy5 микса за белязане, равни на броят на изследваните проби (фиг. 21).

*Фиг. 21. Смесване на ДНК-те със сместа за белязане:*


(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“)

Получените реакционни смеси се инкубират за 5 min на 94°C в термоциклер с предварително загрят капак, след което веднага се прехвърлят на 4°C за 5 min, за да се денатурира ДНК. Към всяка проба се прибавя по 1 µl Klenow ензим, пробите се разбъркват и се центрофугират за кратко. Пробите и контролите се инкубират в термостат Galaxy 170R (New Brunswick) за 2-4 часа на 37°C. При необходимост инкубирането може да се увеличи до 18 часа. След като пробите се извадят от термостата, се поставят на лед.

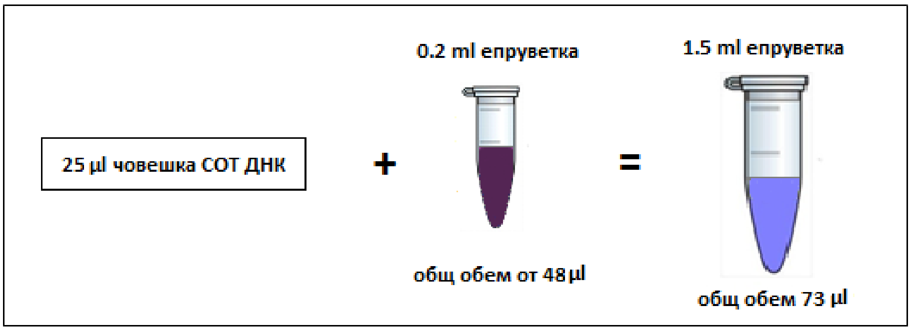
**B. *Хибридизация***

Всяка белязана с Cy3 проба (24 µl) се комбинира с белязана с Cy5 контрола (24 µl), като се получава общ обем от 48 µl (фиг. 22). Сместа трябва да има отчетливо виолетов цвят. Смесените тествана и контролна ДНК хибридизират върху микрочипа на принципа на конкурентното свързване.

*Фиг. 22. Комбиниране на тестваната и контролната ДНК:*


Към всяка проба, съдържаща комбинирани белязани с Cy3/ Cy5 ДНК (48 µl), се добавят 25 µl човешка Cot ДНК и се получава обща смес от 73 µl (фиг. 23). Човешката Cot ДНК е получена от човешка плацента и е богата на повторени последователности. Използва се за блокиране на крос-хибридизацията с човешки повторени секвенции.

*Фиг. 23. Добавяне на 25 µl човешка Cot ДНК към комбинацията от белязани с Cy3/ Cy5 ДНК (48 µl):*




След вортексиране и центрофугиране пробите се слагат в предварително загрята на $75^{0}$C евапораторна центрофуга с отворени капачки. Центрофугира се за 30 min на $75^{0}$C, за което време течността се изпарява и се получава суха утайка с отчетливо виолетов цвят на дъното на епруветките.

Хибридизационият буфер предварително се загрява на $75^{0}$C за 15 min в термоциклер, за да се намали вискозитета му. Към всяка ДНК-утайка се добавят по 21 µl от него. Разбърква се до видимо разтваряне на утайката. Сместа се инкубира за 10 min на $75^{0}$C до пълното разтваряне на утайката. Денатурацията може да се удължи с още 10 min при необходимост.

Подготвя се хибридизационната камера. В пластмасова непрозрачна кутия се поставя лигнин и се напоява с 4 ml 2xSSC/50% формамид.

Накапване на хибридизационната смес върху микрочиповете. Хибридизационната смес се охлажда на стайна температура и в центъра на покривното стъкло с размери 22x22 mm се накапват 19 µl. Ръководейки се по матрица (шаблон с размерите и очертанията на двете полета на микрочипа), микрочипът се залепя върху покривното стъкло като се внимава да не се образуват мехури (фиг. 24).

*Фиг. 24. Накапване на 19 µl хибридизационна смес в центъра на покривно стъкло с размери 22x22 mm, ръководейки се по матрица за двете полета на микрочипа:*

(снимка – генетична лаборатория МБАЛ „Надежда“)

Микрочиповите стъкла се оставят от 3 до 16 часа в хибридизационна камера в предварително подгрята до 47°C печка.

**_C. Промиване_**

Хибридизиралите чипове се промиват за отстраняване на несвързаната белязана ДНК. След приключване на хибридизацията покривните стъкла се отлепят от микрочипа в кювета с 2xSSC/0,05% Tween 20 буфер на стайна температура. Микрочиповете се поставят в метален държател и се изплакват последователно в предварително подготвените буфери при непрекъснато разбъркване. Предварително се приготвят се съответни разтвори (Табл. 9).

*Табл. 9. Необходими разтвори за промиването на хибридизиралите BAC-микрочипове:*

| **№** | **Буфер** | **Обем** | **T°C** | **Шейкър** | **Време** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | 2xSSC/0,05% Tween 20 | 400 ml | Стайна температура | Да | 10 min |
| 2. | 1xSSC | 400 ml | Стайна температура | Да | 10 min |
| 3. | 0,1xSSC | 400 ml | 60°C | Да | 5 min |
| 4. | 0,1xSSC | 400 ml | Стайна температура | Да | 1 min |

(схема – Illumina, 2016)

Изсушаване на микрочиповете. Микрочиповете се поставят с баркода нагоре в епруветки от 50 ml и се центрофугират на 170 G за 3 min. По този начин се предотвратява изсъхването на капчици върху активната повърхност на чипа, които могат да доведат до артефакти по време на сканирането.

Микрочиповете могат да се съхраняват за определено време в оригиналната им кутийка на тъмно и сухо място.

**4. Сканиране на микрочиповете**

Препоръчително е микрочиповете да се сканират същия ден, защото багрилата, особено Cy5, много бързо се разрушават под действието на атмосферния озон и светлината. Микрочиповите платформи 24 sure v3 и 24 sure + (Illumina) бяха сканирани на двуканален лазерен скенер, DNA Microarray Scanner G2502 C (Agilent Technologies) с 532 nm дължина на вълната за зеления лазер (която отчита Cy3 сигнала) и 635 nm за червения лазер (която отчита Cy5 сигнала).

Прескениране. Микрочиповите стъкла на 24 sure v3 и 24 sure $_+$ (Illumina) имат по две хибридизационни полета. По време на прескенирането се получава нискорезолютивен образ, на който се идентифицират хибридизационните полета и прилежащият баркод.

Високорезолютивно скениране. При ползването на този тип скенер - DNA Microarray Scanner G2502 C (Agilent Technologies), е препоръчително да се приложи високорезолютивно скениране от порядъка на 5µm. След сканирането полученият образ се разделя на две отделни полета с помощта на Image Viewer софтуер на BlueGnome (Illumina). Получените образи се анализират със софтуерна програмата BlueFuse Multi Version 4.3 (Illumina).

**5. Софтуерен анализ на данните**

Всички данни бяха обработени с програма BlueFuse Multi version 4.3, (Illumina). При анализа репликите на чипа се дефинират автоматично от софтуера. Флуоресцентните интензитети на всички реплики се калкулират след автоматично елиминиране на локалния фон, като нормализацията на интензитетите на Cy3 и Cy5 се извършва спрямо целия набор от реплики върху чипа. Калкулира се съотношението Cy3/Cy5 (при тест – ДНК, белязана със Cy3) и се взема средната стойност на това съотношение от репликите за всеки клон.

**6. Критерии за отчитане на резултатите от експеримента.**

При обработка на данните се генерира графика за всяка тествана ДНК, като абцисата показва хромозната позиция, на хибридизиралите белязани клонове, а ординатата показва логаритмичното съотношение $\log_2$ между интензитетите на флуоресценция на Cy5 белязаните към Cy3 белязаните клонове, съобразно позицията им в микрочипа. $\mathrm{Log}_2$ - стойности на флуоресцентното съотношение между +0.3 и -0,3 отразяват нормален брой копия. Стойности над +0,3 са отчитани като генетични допълнения/дупликации и съответно под -0.3 като загуби (делеции) (Фиг.).

*QC (Quality control) - контрол на качеството.* Софтуерът дава възможност за оценка на качеството на хибридизация, промивка и достоверност на получените резултати.

*DLR fused (Derivative log Ratio fused).* Стойностите на DLR fused трябва да са по-ниски от < 0.20. DLR fused показва съотношението на нормализираните необработени данни.

*SD на автозомите*. Референтни граници 0.07-0.17. SD отразява разпределението на log2 съотношенията на всички клонове от чипа, върху нормализирани, но не обработени данни.

*SBR Референтни граници 5 – 20.* Представлява съотношение между силата на сигнала и фоновия шум за двете багрила поотделно.

## III. Предимплантационен генетичен тест с новогенерационно секвениране

Появата на методите за т. нар. секвениране от ново поколение (новогенерационно секвениране, NGS) предоставя възможност за едновременно „прочитане“ на големи набори от гени и дори цели геноми. При NGS анализ на ДНК от единична клетка/клетки се спазва следният алгоритъм (фиг. 25):

*Фиг. 25. Последователност на стъпките при секвениране от ново поколение:*

| ДНК амплификация | Приготвяне на библиотеки | Секвениране | Анализ на данни | Получаване на доклад |
|---|---|---|---|---|
| Екстракция и амплификация на ДНК, използвайки SurePlex DNA Amplification Kit | Приготвяне на библиотеки за секвениране на MiSeq система, използвайки VeriSeq PGS Kit - MiSeq | Стартиране на MiSeq апарата. Добавяне на библиотека към готов за ползване клетъчен поток | MiSeq системата демултиплицира пробите и подрежда разчетените данни към генома | Данните се анализират с BlueFuse Multi софтуер. Генерира се доклад |

(схема – Illumina, 2016)

1. **Изолиране и амплификация на ДНК от трофектодермални клетки чрез SurePlex протокол с кит SurePlex DNA Amplification System за последващо новогенерационно секвениране**

**A. *Приготвяне на контроли***

**B. *Амплификация на ДНК***

ДНК амплификацията се извършва с кит SurePlex DNA Amplification System (Illumina), аналогично на ДНК амплификацията, необходима за микрочиповия анализ (виж точка II), като разлика има в използваните контроли.

**A. *Приготвяне на контроли***

- <u>*Консумативи*</u>
- 20x PBS (разрежда се до 1x със свободна от нуклеази вода) (Cell Signaling Technologies);
- Геномна контролна ДНК (Promega);
- PCR епруветки (0.2 ml, с тънки стени, завъртаща се капачка);
- Микроцентрофужни епруветки (1.5 ml, завъртаща се капачка) (Sarstedt).

<u>*Реактиви:*</u>

- 1x PBS 805 µl;

- Геномна ДНК (100ng/µl) 5 µl.

<u>*Стартови материали за приготвяне на пробата:*</u>

- Клетка/клетки в 2.5 µl 1x PBS, поставени в 0.2 ml епруветки;
- Позитивна контрола 1: 15 pg геномна ДНК в 2.5 µl 1x PBS;
- Позитивна контрола 2: 60 pg геномна ДНК в 2.5 µl 1x PBS;
- Негативна контрола: 2.5 µl 1x PBS (0.2 ml епруветки);
- Негативна контрола: 2.5 µl буферна контрола (0.2 ml епруветки).

Амплификационната процедура е извършена в стерилен ламинарен бокс с вертикален ламинарен поток L226 Workstation (K systems). Надписват се 4 стерилни епруветки от 1.5 ml и се приготвят следните контроли (Табл. 10):

*Табл. 10. Контроли за амплификационната процедура – негативна контрола и разреждане на геномната ДНК (стоков разтвор):*

| **Контрола** | **Описание** | **Количество 1x PBS** | **Количество геномна ДНК (стоков разтвор)** |
|---|---|---|---|
| 1 | 1x PBS негативна контрола | 100 µl | няма |
| 2 | 2.5 ng/µl позитивна контрола | 195 µl | 5 µl от 100 ng/µl стоков разтвор |
| 3 | 25 pg/µl позитивна контрола | 495 µl | 5 µl от 2.5 ng/µl (от епруветка 2) |
| 4 | 6.25 pg/µl позитивна контрола | 15 µl | 5 µl от 25 pg/µl (от епруветка 3) |

(схема – Illumina, 2016)

<u>*Описание на приготвяне на контролите*</u>

Прибавя се 1x PBS към всяка епруветка спрямо количествата, показани в горепосочената таблица:

- Прибавят се 5 µl женска геномна ДНК към епруветка 2 и се разбърква;
- Разреждат се 5 µl от епруветка 2 в епруветка 3 и се разбърква;
- Разреждат се 5 µl от епруветка 3 в епруветка 4 и се разбърква.

В стерилен бокс се надписват 3 стерилни 0.2 ml PCR епруветки с плоски капачки и се приготвят (табл. 11):

*Табл. 11. Позитивни контроли за амплификационната процедура – разреждане от контролните епруветки:*

| PCR епруветка | Означение на капачката | Съдържание |
|---|---|---|
| 1 | 15.6 позитивна контрола | 2.5 μl от контролна епруветка 4 (6.25 pg/μl позитивна контрола) |
| 2 | 62.5 позитивна контрола | 2.5 μl от контролна епруветка 3 (25 pg/μl позитивна контрола) |
| 3 | негативна контрола | 2.5 μl от контролна епруветка 1 (1x PBS) |

(схема – Illumina, 2016)

Поставят се по 2.5 μl от контролите в PCR епруветки. Контролите се съхраняват на лед до момента на използването им.

### ***B. Амплификация на ДНК***

Следващите стъпки на екстракция/лизиране на клетките, преамплификация и амплификация се извършват аналогично на на ДНК амплификацията, необходима за микрочиповия анализ с SurePlex DNA Amplification System (Illumina) (виж точка II). Разликата е в използваните контроли (фиг. 26).

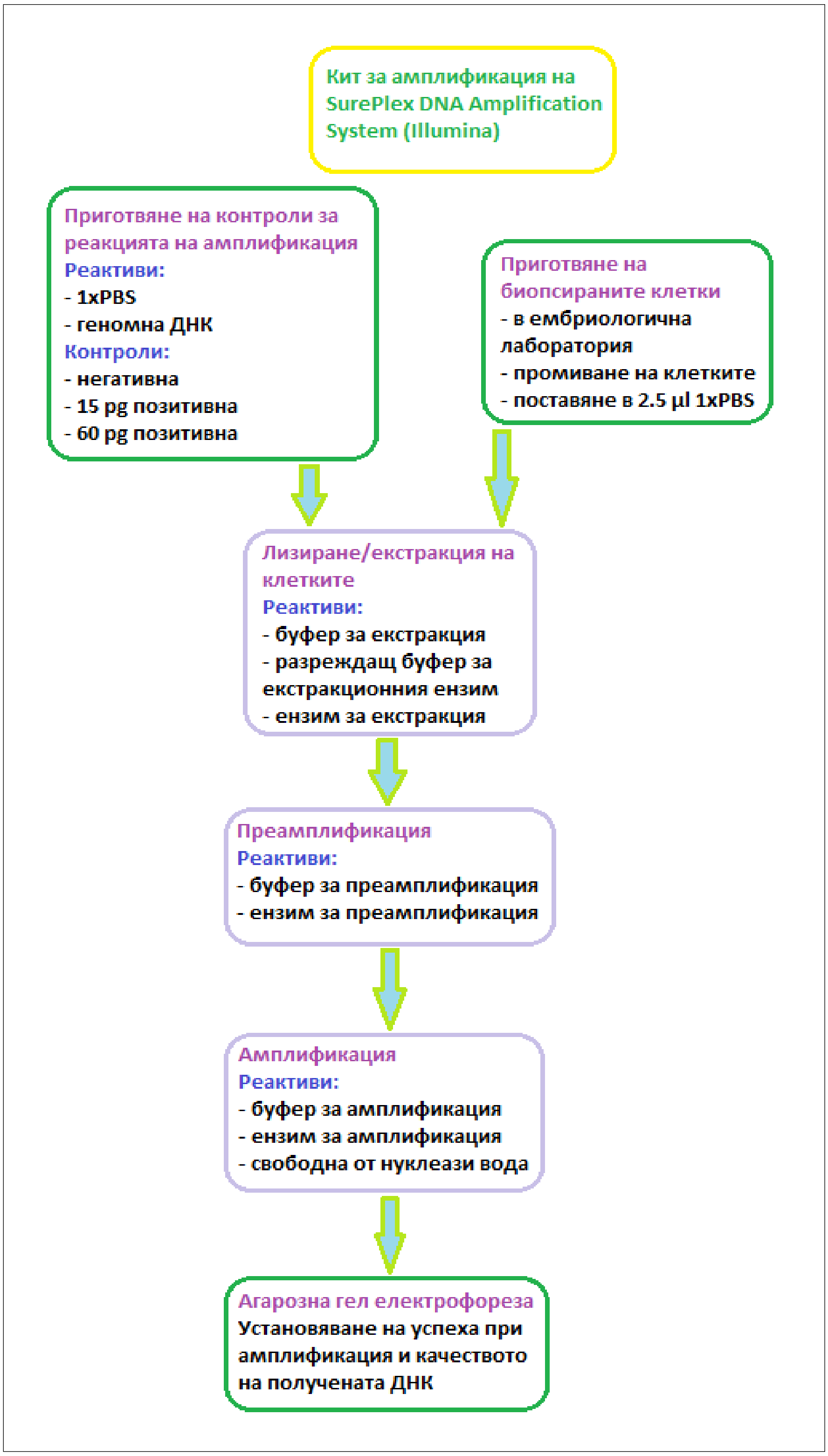
При амплификацията, предшестваща микрочиповия анализ, има две негативни контроли:

- негативна контрола 1, състояща се от 2.5 μl 1x PBS, приготвена в ембриологичната лаборатория;
- негативна контрола 2, състояща се от 2.5 μl 1x PBS, приготвена в генетичната лаборатория.

При амплификацията, предшестваща секвенирането от ново поколение, има три контроли (една негативна и две позитивни):

- негативна контрола, състояща се от 2.5 μl 1x PBS;
- 15.6 позитивна контрола;
- 62.5 позитивна контрола.

*Фиг. 26. Обща схема на изолиране и амплификация на ДНК:*




(схема – Illumina, 2016)

## 2. Приготвяне на библиотеки за секвениране

За приготвяне на библиотеката за секвениране, е следван протоколът VeriSeqTM PGS

Library Preparation, който позволява бързо и лесно приготвяне на библиотека (фиг. 27).

***<u>Последователност на лабораторния протокол:</u>***

**A.** ***Разреждане на пробите и контролите до необходимата концентрация:***

**a.** *Приготвяне на 1/10 разреждане на SurePlex пробите и контролите;*

**b.** *Измерване количеството на пробите (квантификация) – с Qubit метод;*

**c.** *Довеждане на пробите до концентрация от 0.2 ng/μl;*

**B.** ***Тагментация;***

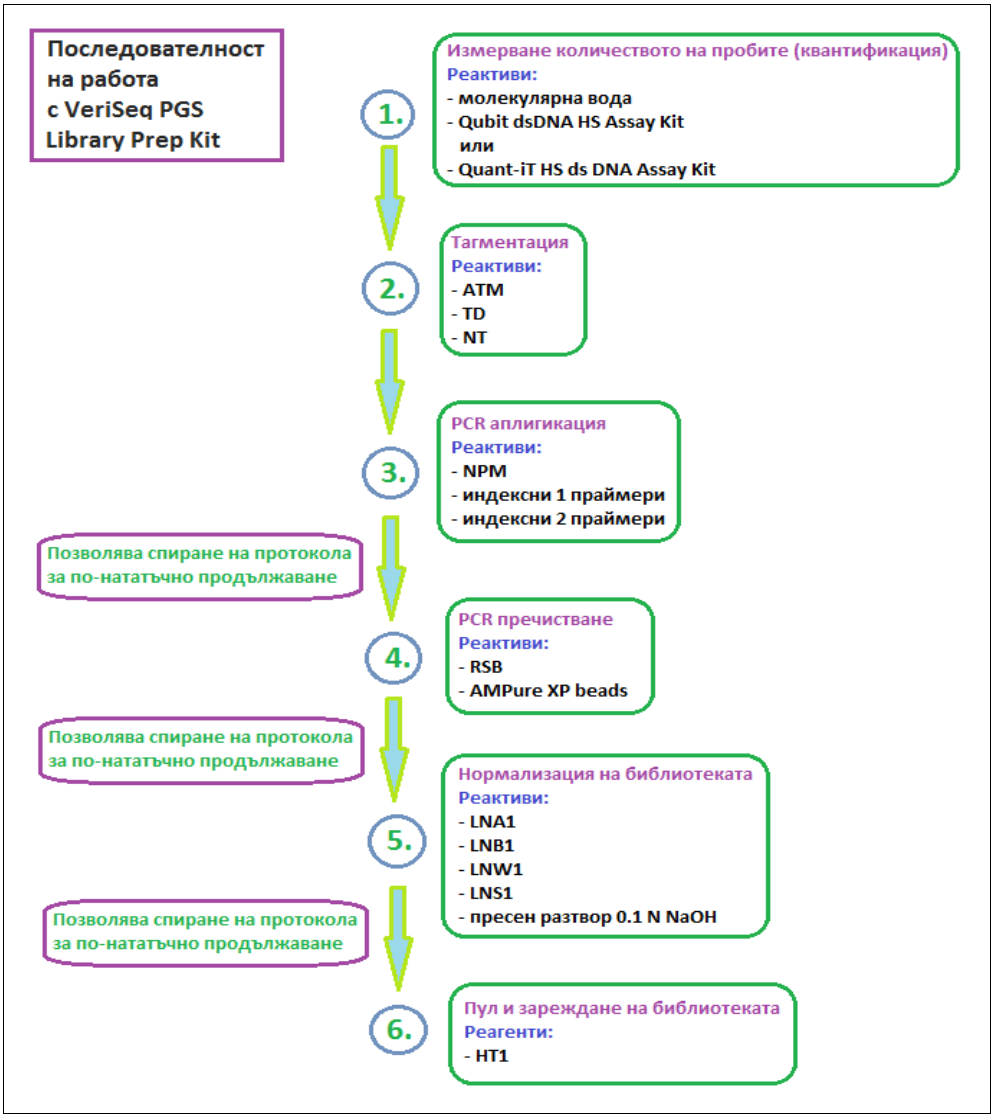
**C.** ***Амплифициране на тагментираната ДНК;***

**D.** ***Пречистване след PCR;***

**E.** ***Нормализиране на библиотеките;***

**F.** ***Пул библиотеки за MiSeq система.***

*Фиг. 27. Последователност на работа с VeriSeq PGS Library Prep Kit:*




(схема – Illumina, 2016)

A. ***Разреждане на пробите и контролите до необходимата концентрация:***

a. ***Приготвяне на 1/10 разреждане на SurePlex пробите и контролите;***

- Вортексиране на всяка проба и контрола;
- Центрофугиране на 280 × g за 1 минута;
- В нова PCR плака се прибавят 45 μl молекулярна вода към необходимите ямки;
- Прибавя се 5 μl проба или контрола към ямките, съдържащи молекулярна вода;
- Плаката се запечатва и се вортексира за кратко, за да се миксира;
- Центрофугиране на 280 × g за 1 минута;
- Оставя се на лед за следващия етап.

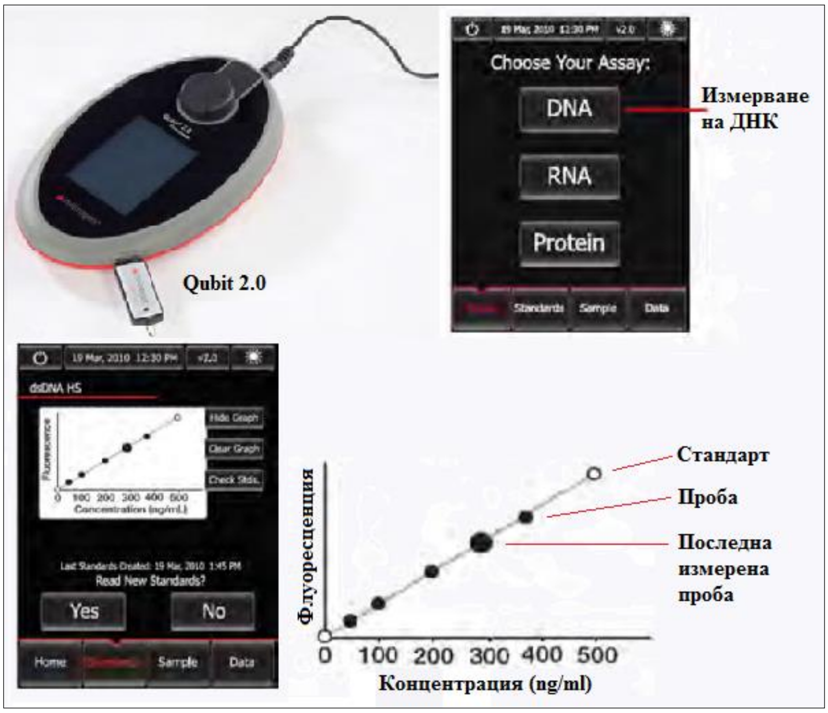
b. ***Измерване количеството на пробите (квантификация) – с Qubit метод***

*Реактиви и апаратура за формат с епруветки Qubit dsDNA HS Assay Kit:* Qubit Assay епруветки (1 епруветка на проба и стандарт); Qubit 2.0 флуорометър; адхезивно PCR фолио за запечатване на плаки.

- Приготвя се съответният брой прозрачни епруветки от 0.5 μl за стандартите и пробите. Епруветките се надписват;
- Приготвя се необходимото количество Qubit работен разтвор чрез разреждане на Qubit dsDNA HS реагент в Qubit dsDNA HS буфер в съотношение 1:200. Нормално се изисква 190 μl работен разтвор към всяка проба и стандарт. При нужда обемът в епруветките се наглася до общ обем 200 μl чрез добавяне на 180–199 μl работен разтвор или 1-20 μl разредена 1/10 SurePlex проба. Например за 8 проби, заедно с двата стандарта, са необходими 10x200 μl (2000 μl) работен разтвор ( по ~200 μl на епруветка), следователно 10 μl от Qubit реагент се разтварят в 1990 μl Qubit буфер;
- Прибавя се 10 μl от разредените 1/10 SurePlex проби и 190 μl работен разтвор към всяка епруветка. За кратко се вортексира. чрез добавяне на 180–199 μl работен разтвор;
- За да се калибрира Qubit флуорометърът, се прибавят 10 μl от всеки стандарт към 190 μl работен разтвор към всяка епруветка. За кратко се вортексира;
- За оптимална флуоресценция епруветките се инкубират 2 минути;
- Qubit флуориметърът изисква два стандарта, вкарани в апарата в точно определен ред – първо стандарт 1, след това стандарт 2. Апаратът позволява нова калибрация или ползване на предишна калибрация;

- Пресмята се концентрацията на всяка 1/10 разредена SurePlex проба. Измерването на самата проба отнема ~3 секунди; между измерванията на една и съща проба (при нужда), трябва да се изчаква ~30 секунди за еквилибрация;
- Резултатите се визуализират на екрана на апарата, като стойността представлява концентрацията на разредената проба. След това на апарата се пресмята концентрацията на оригиналната проба, като се въвежда обемът на прибавената 1/10 разредена SurePlex проба към работния разтвор (от 1–20 µl);
- Мерните единици се превръщат от µl в ng/µl, като е важно за правилно пресмятане да се въведе обемът на прибавената 1/10 разредена SurePlex проба (от 1–20 µl);
- Измерените концентрации на пробите се съпоставят със стойностите на VeriSeq PGSMiSeq QC Assessment Guide (фиг. 28).

*Фиг. 28. Qubit 2.0 флуориметър, начален екран и стандарти с проби:*




(снимка – Invitrogen, 2010)

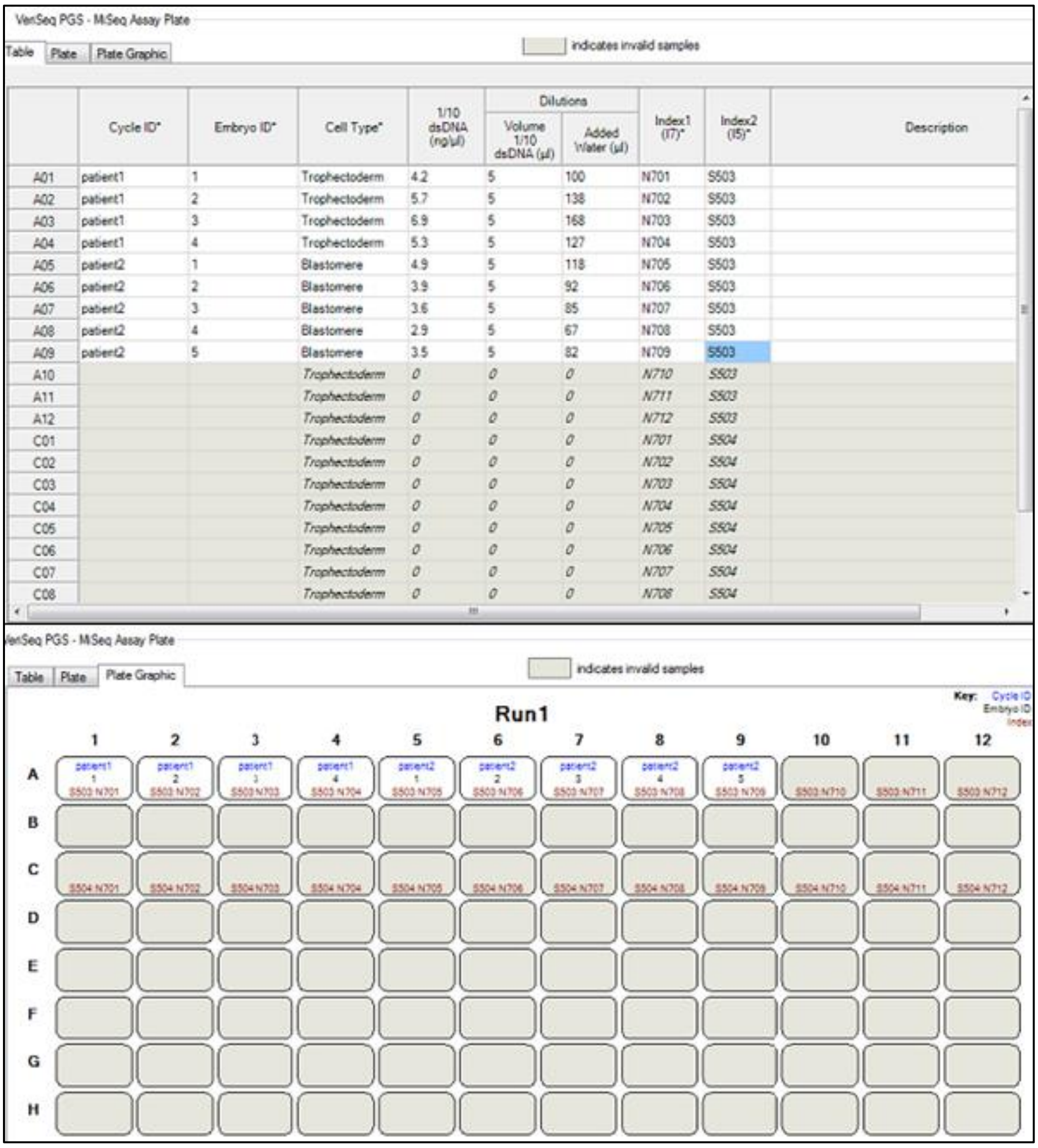
### c. *Довеждане на пробите до концентрация от 0.2 ng/µl*

- Използва се BlueFuse Workflow Manager, за да се калкулира концентрацията и да се създаде MiSeq и BlueFuse съвместима работна бланка (Worksheet и Sample sheet) (фиг. 29). Калкулираните dsDNA концентрации (ng/µl) на разредените 1/10 SurePlex sample проби се въвеждат в колоната 1/10 dsDNA (ng/ul) на VeriSeq

PGS–MiSeq Assay Plate;

- BlueFuse Workflow Manager калкулира молекулярната вода, необходима за приготвянето на 5 µl разредена проба с крайна концентрация от 0.2 ng/µl;
- Спрямо изчисленията на BlueFuse Workflow Manager се прибавя необходимото количество молекулярна вода към нова PCR плака;
- Към PCR плаката с молекулярна вода се прибавят по 5 µl от всяка 1/10 разредена SurePlex проба в съответстващата ямка;
- PCR плаката се вортексира и след това се центрофугира на 280 × g за 1 минута;
- Оставя се на лед за следващия етап.

*Фиг. 29. Бланка, създадена на BlueFuse Workflow Manager – в табличен вид и като схема на плаката:*



VeriSeq PGS - MiSeq Assay Plate

Table | Plate | Plate Graphic

indicates invalid samples

| | Cycle ID* | Embryo ID* | Cell Type* | 1/10 dsDNA (ng/µl) | Dilutions | | Index1 (I7)* | Index2 (I5)* | Description |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Volume 1/10 dsDNA (µl) | Added Water (µl) | | | |
| A01 | patient1 | 1 | Trophectoderm | 4.2 | 5 | 100 | N701 | S503 | |
| A02 | patient1 | 2 | Trophectoderm | 5.7 | 5 | 138 | N702 | S503 | |
| A03 | patient1 | 3 | Trophectoderm | 6.9 | 5 | 168 | N703 | S503 | |
| A04 | patient1 | 4 | Trophectoderm | 5.3 | 5 | 127 | N704 | S503 | |
| A05 | patient2 | 1 | Blastomere | 4.9 | 5 | 118 | N705 | S503 | |
| A06 | patient2 | 2 | Blastomere | 3.9 | 5 | 92 | N706 | S503 | |
| A07 | patient2 | 3 | Blastomere | 3.6 | 5 | 85 | N707 | S503 | |
| A08 | patient2 | 4 | Blastomere | 2.9 | 5 | 67 | N708 | S503 | |
| A09 | patient2 | 5 | Blastomere | 3.5 | 5 | 82 | N709 | S503 | |
| A10 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N710 | S503 | |
| A11 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N711 | S503 | |
| A12 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N712 | S503 | |
| C01 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N701 | S504 | |
| C02 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N702 | S504 | |
| C03 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N703 | S504 | |
| C04 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N704 | S504 | |
| C05 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N705 | S504 | |
| C06 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N706 | S504 | |
| C07 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N707 | S504 | |
| C08 | | | Trophectoderm | 0 | 0 | 0 | N708 | S504 | |



(схема – Illumina, 2016)

### *B. Тагментация*

Първата стъпка от процеса на приготвяне на библиотеката е тагментацията (тагване/маркиране + фрагментация). SurePlex амплификационният продукт се тагментира от VeriSeq PGS транспозоми, които начупват на случаен принцип геномната ДНК на фрагменти, добавяйки адапторни секвенции в двата края на всеки от тях (табл. 12).

*Консумативи:*

- ATM (Ампликон Тагмент Микс);
- TD (Тагментиращ DNA буфер);
- NT (Неутрализиращ тагментацията буфер);
- SurePlex амплификационен продукт (разреден до концентрация 0.2 ng/μl);
- 96-ямкова PCR плака;
- Адхезивно запечатващо PCR фолио;
- PCR 8-епруветкови стрипове.

*Приготвяне:*

*Табл. 12. Схема на реактивите за тагментация на библиотеки:*

| **Реактив** | **Начин на съхранение** | **Инструкции** |
|---|---|---|
| ATM | -25°C до -15°C | Оставя се да се размрази на лед за 20 минути. Обръща се, за да се размеси и се центрофугира на пулс. |
| TD | -25°C до -15°C | Оставя се на стайна температура за 30 минути. Вортексира се и се центрофугира за кратко. |
| NT | 2°C до 8°C | Оставя се на стайна температура за 30 минути. Вортексира се и се центрофугира за кратко. |

(схема – Illumina, 2016)

*Процедура на тагментация*

- Надписва се нова VTA PCR плака (VeriSeq Tagment Amplicon Plate);
- Пресмята се общият обем на TD за всички реакции. С многоканална пипета и резервоар обемът се разделя по равно на стените на PCR 8-епруветковия стрип;
- Към всяка ямка се прибавя по 10 μl TD буфер;
- Към ямките с TD буфер се прибавя по 5 μl ATM;

- Към всяка ямка се прибавя по 5 μl SurePlex амплификационен продукт (разреден до 0.2 ng/μl);
- Разбърква се на 1,800 rpm за 1 минута (на шейкър);
- Центрофугира се на 280 × g за 1 минута;
- Проверява се дали всяка ямка съдържа по 20 μl. Записват се всички различни от това количество обеми;
- VTA PCR плаката се поставя веднага в термоциклер със загрят капак и се стартира следната програма:
  - 55°C за 5 минути;
  - Hold на 10°C;
- За да се предотврати прекалена тагментация, се преминава веднага към следващата стъпка.

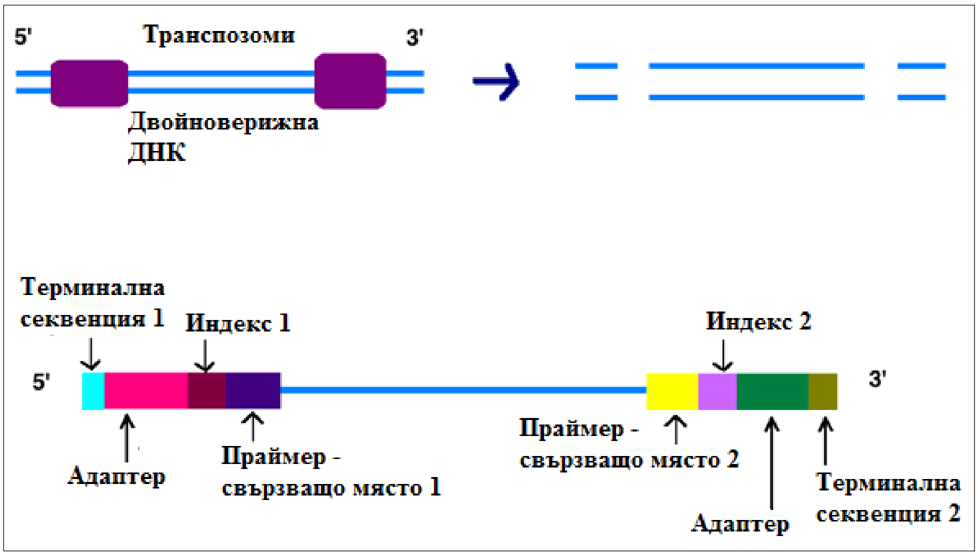
*Неутрализиране на тагментираната SurePlex ДНК:*

- Пресмята се общият обем NT буфер, необходим за всички реакции. С многоканална пипета обемът се разделя еднакво в ямките на PCR 8-епруветковия стрип от горния етап;
- Прибавя се по 5 μl NT буфер към всяка ямка;
- Разбърква се на 1,800 rpm за 1 минута;
- Центрофугира се на 280 × g за 1 минута;
- Проверява се дали всяка ямка съдържа по 25 μl. Записват се всички различни от това количество обеми;
- Инкубира се на стайна температура за 5 минути;
- Веднага се преминава към следващата стъпка.

***C. Амплифициране на тагментираната ДНК***

При тази стъпка тагментираната ДНК се амплифицира, като се използва PCR програма с ограничен брой цикли. PCR стъпката намножава тагментираните ДНК фрагменти, като освен това добавя към краищата им уникална за всяка проба, комбинация от индекси - индекс 1 (i7) и индекс 2 (i5) адаптори (табл. 11, фиг. 30).

*Фиг. 30. Тагментация от VeriSeq PGS транспозоми, които начупват на случаен принцип геномната ДНК на фрагменти и добавят адапторни секвенции в двата края на всеки от тях:*




(снимка – Illumina, 2016)

Използва се цялото количество тагментирана ДНК, за да се подсигурят секвенционни резултати с високо качество. Подбира се уникална комбинация от индексови праймери i7 (N701, N702, N703… N712) и i5 (S503 и S504) за всяка проба от една секвенционна реакция. Всеки индекс се състои от 8 нуклеотида, които служат като баркод за всички секвенции на даден пациент. По време на секвенирането базите гуанин (G) и тимин (T) се отчитат със зелен лазер, а аденин (A) и цитозин (C) - с червен лазер. Двойките индекси за пробите, които впоследствие ще се комбинират в един пул, се избират така, че на всяка една от осемте позиции на индекс i7 и i5 да има поне един нуклеотид, четен от другия лазер (фиг. 31).

*Фиг. 31. Подход при избора на индекси за пробите: поддържане на цветови баланс при лазерното отчитане на базите за всяка индексова позиция и съвместимост на i(7) праймери:*

| Проба | Добре подбран индекс 1 | | Недобре подбран индекс 1 | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 701 | TAAGGCGA | 702 | CGTACTAG |
| 2 | 702 | CGTACTAG | 703 | AGGCAGAA |
| 3 | 704 | TCCTGAGC | 711 | AAGAGGCA |
| | | √ √ √ √ √ √ √ √ | | x √ x x √ x x √ |

*Легенда:*
√ - наличие на сигнал в двата цвята (червено и зелено)
x - липсва сигнал в единия цвят

| Праймерна съвместимост на i(7) праймери: |
|---|
| i701, i702, i703 и i704 |
| i703, i704, i705 и i706 |
| i705, i706, i707 и i708 |
| i707, i708, i709 и i710 |
| i709, i710, i711 и i712 |

(снимка – Illumina, 2016)

*Консумативи и апаратура:*

- NPM (Nextera PCR мастър микс);
- Индекс 1 праймери (N701 до N712);
- Индекс 2 праймери (S503 и S504);
- TruSeq индекс приставка за плака;
- Адхезивно запечатващо PCR фолио;
- Капак за запечатване на плака. (табл. 13)

*Приготвяне:*

*Табл. 13. Реактиви за намножаване на тагментираните ДНК фрагменти:*

| **Реактив** | **Начин на съхранение** | **Инструкции** |
|---|---|---|
| NPM | -25°C до -15°C | Размразява се на лед за 20 минути. Епруветката се обръща, за да се разбърка. Центрофугира се за кратко, като се използва 1.7 ml<br>епендорфка. |
| Индекс адаптори (i5 и i7) | -25°C до -15°C | Размразява се на стайна температура за 20 минути. Епруветката се обръща, за да се разбърка. Центрофугира се за кратко, като се използва 1.7 ml |

(схема – Illumina, 2016)

Следната PCR програма се създава на термоциклер с предварително загрят до 100°C капак:

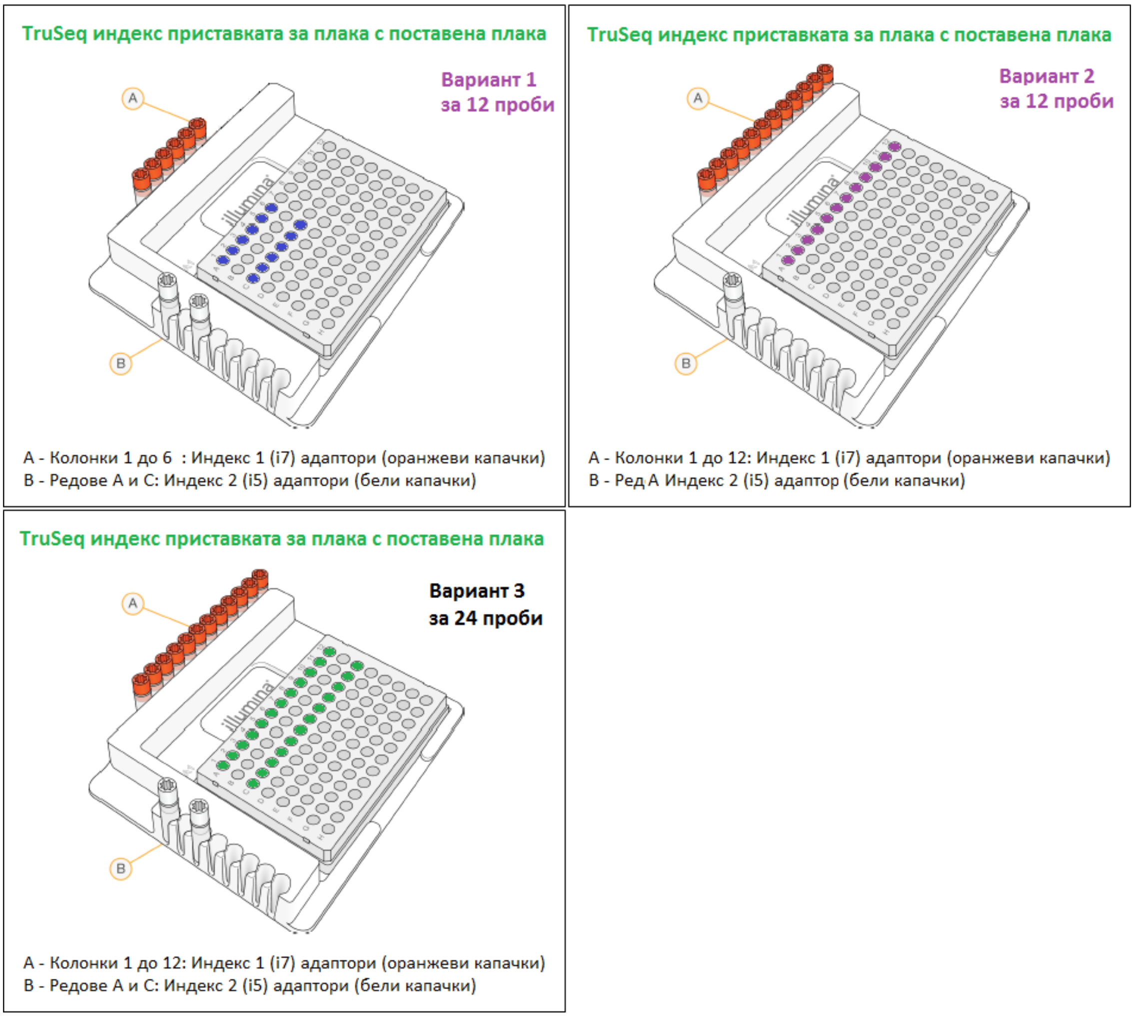
- 72°C за 3 минути
- 95°C за 30 секунди
- 12 цикъла по:
- 95°C за 10 секунди
- 55°C за 30 секунди
- 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Изчакване на 4°C

*Процедура:*

- Принтира се бланка за плака, като се използва BlueFuse Workflow Manager;

- Индекс праймерите се подреждат в TruSeq индекс приставката за плака, както следва (фиг. 32):
    - Индекс 1 адаптори (i7): N701–N712 в колонки 1–12;
    - Индекс 2 адаптори (i5): S503 на ред А и S504 на ред С.
- За 12 проби има два варианта на подредба на праймерите:
    - 6(i7) x 2(i5); когато започне секвенирането, реакцията се означава с “dual index”;
    - 12(i7) x 1(i5); когато започне секвенирането, реакцията се означава с “single index”;
- За 24 проби има един вариант на подредба на праймерите:
    - 12(i7) x 2(i5); когато започне когато започне секвенирането, реакцията се означава с “dual index”:

*Фиг. 32. Подредени в TruSeq индекс приставката за плака индекс праймери:*




(снимка – Illumina, 2016)

- В TruSeq индекс приставката се поставя нова плака;
- Спрямо означението за индекс праймерите (фиг. 36) се прибавя следното количество:
    - 5 µl индекс 1 адаптори в колонки 1–12;
    - 5 µl индекс 2 адаптори на ред A и на ред C;
- Прибавят се 15 µl NPM към всяка ямка;
- Разбърква се на 1,800 rpm за 1 минута;
- Центрофугира се на 280 × g за 1 минута;
- Проверява се дали всяка ямка съдържа по 50 µl. Записват се всички различни от това количество обеми;
- Поставя се в термоциклер на предварително въведената горепосочена програма;
- След този етап запечатаната плака може да бъде съхранена на -25°C до -15°C за максимум 7 дена.

***D. Пречистване след PCR***

На тази стъпка се използват AMPure XP beads (пречиствателна мъниста) за пречистване на ДНК библиотеката и разделяне по размер, като се елиминират нежеланите реагенти от PCR реакцията от пула - къси фрагменти и праймери (табл. 14, фиг. 33).

*Реактиви:*

- RSB (Resuspension Buffer, ресуспендиращ буфер);
- AMPure XP beads (пречиствателна мъниста);
- 96-ямкова плака с дълбоки ямки;
- 96-ямкова PCR плака;
- 50 ml конични епруветки;
- Адхезивно запечатващо PCR фолио;
- Абсолютен етилов алкохол (EtOH) (за да се приготви пресен 80% EtOH);
- Молекулярна вода.

*Приготвяне:*

*Табл. 14. Реактиви за пречистване след PCR:*

| **Реактив** | **Начин на съхранение** | **Инструкции** |
|---|---|---|
| RSB | -25°C до -15°C | Размразява се и се оставя за 30 минути на |

| | | |
|---|---|---|
| | | стайна температура. |
| AMPure XP beads | 2°C до 8°C | Оставя се за 30 минути на стайна температура. |

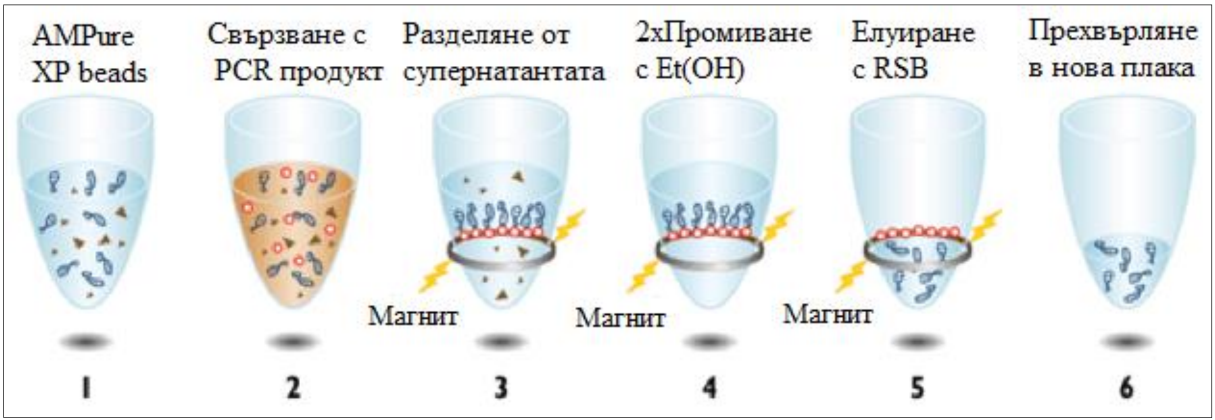
(схема – Illumina, 2016)

- AMPure XP beads се вортексират до пълното им разбъркване;
- Приготвя се пресен 80% EtOH от абсолютен етилов алкохол.

*Процедура:*

- VTA плаката се центрофугира на 280 × g за 1 минута, за да се събере кондензацията;

*Фиг. 33. AMPure XP beads (пречиствателна мъниста) за пречистване на ДНК библиотеката – схема на пречистване:*




(снимка – Beckman Coulter, 2019)

- Прибавят се 45 µl AMPure XP beads към всяка ямка на нова дълбоко ямкова плака;
- 45 µl PCR продукт от VTA плаката се добавя към дълбоко ямковата плака, съдържаща пречиствателната мъниста;
- Ако PCR продуктът е по-малко от 45 µl, обемът на AMPure XP beads се съобразява с обема на продукта в съотношение 1:1;
- Разбърква се на 1800 rpm за 1 минута;
- Инкубира се на стайна температура за 5 минути. Плаката не се клати;
- Центрофугира се на пулс, за да се съберат капките. Не се центрофугира прекалено дълго, за да не агрегират мънистата;
- Дълбоко ямковата плака се поставя на магнитна поставка и се изчаква 2 минути, докато течността се избистри;
- През следващите стъпки плаката се държи на магнитната поставка;

- С многоканална пипета, настроена на 95 μl, се премахва цялата супернатанта от всички ямки;
- Извършва се двукратно промиване в следния ред:
    - Използвайки многоканална пипета се добавят 200 μl прясно приготвен 80% EtOH към всяка ямка, пипетирани от срещуположната на агрегиралите мъниста страна. Мънистата не се ресуспендира;
    - Плаката се инкубира на магнитната поставка за 30 секунди;
    - Веднага се премахва и изхвърля супернатантата от всяка ямка;
- С помощта на фини типчета с многоканална пипета се премахва остатъкът от етанол;
- Плаката се оставя за сушене за 15 мин на стайна температура, докато мънистата са напълно сухи;
- Към всяка ямка се добавят 50 μl RSB;
- Плаката се маха от магнитната поставка;
- Разбърква се на 1800 rpm за 1 минута;
- Центрофугира се на 280 x g за 1 минута;
- Отново се поставя за 2 мин на магнитната поставка, докато се избистри течността;
- Прехвърлят се 45 μl от от супернатантата във всяка ямка, в нова PCR плака;
- След този етап запечатаната плака може да бъде съхранена на -25°C до -15°C за максимум 7 дена.

***E. Нормализиране на библиотеките***

При тази стъпка се нормализира количеството на всяка библиотека, за да се осигури по-уеднаквено библиотечно представяне в библиотечния пул (табл. 15).

*Консумативи:*

- LNA1 (Library Normalization Additives 1, добавки);
- LNB1 (Library Normalization Beads 1, мъниста);
- LNW1 (Library Normalization Wash 1, буфер за промиване);
- LNS1 (Library Normalization Storage Buffer 1, буфер за съхранение);
- 10 N NaOH (за приготвяне на пресен 0.1 N NaOH);
- 96-ямкова плака с дълбоки ямки;
- 96-ямкова PCR плака;
- 15 ml конични епруветки;

- Адхезивно запечатващо PCR фолио;
- Молекулярна вода.

<u>*Приготвяне:*</u>

*Табл. 15. Консумативи за нормализиране на библиотеки:*

| **Реактив** | **Начин на съхранение** | **Инструкции** |
|---|---|---|
| LNA1 | -25°C до -15°C | Приготвя се в камина. Размразява се и се оставя за 30 минути на стайна температура. При необходимост може да се размрази на водна баня при 20°C to 25°C. Вортексира се, като се наблюдава на светлина дали преципитатът се е разтворил добре. |
| LNW1 | -25°C до -15°C | Размразява се и се оставя за 30 минути на стайна температура. |
| LNB1 | 2°C до 8°C | Оставя се за 30 минути на стайна температура. Вортексира се за минимум 1 минута, след което се обръща за ресуспендиране. |
| LNS1 | 2°C до 8°C | Оставя се за 30 минути на стайна температура. |

(схема – Illumina, 2016)

- Приготвя се 0.1 N NaOH, както следва:
    - Прибавят се 9.9 ml молекулярна вода към 15 ml конична епруветка;
    - Прибавят се 0.1 ml от 10 N NaOH (1/100 разреждане);
    - Вортексира се за разбъркване.

<u>*Процедура:*</u>

- В нова епруветка се приготвя смес от LNA1/LNB1 спрямо броя на реакциите (табл. 16):

*Табл. 16. Приготвяне на микс за нормализиране на библиотеки:*

| **Реактив** | **1 реакция** | **12 реакции** | **24 реакции** |
|---|---|---|---|
| LNA1 | 36.8 µl | 550 µl | 1100 µl |
| LNB1 | 8.2 µl | 100 µl | 200 µl |

(схема – Illumina, 2016)

- Вортексира се до хомогенизиране на сместа LNA1/LNB1;

- Надписва се нова плака с дълбоко дъно като LNP (Library Normalization Plate – плака за нормализация на библиотека);
- Прехвърлят се по 45 µl LNA1/LNB1 микс във всяка ямка;
- Във всяка ямка се прибавят по 20 µl dsDNA, получена при PCR пречистването;
- Разбърква се на 1800 rpm за 30 минути;
- Центрофугира се на пулс, за да се съберат капките. Не се центрофугира прекалено дълго, за да не агрегират мънистата;
- Дълбоко ямковата плака се поставя на магнитна поставка и се изчаква 2 минути, докато течността се избистри;
- През следващите стъпки плаката се държи на магнитната поставка;
- С многоканална пипета се премахва цялата супернатанта от всички ямки;
- Извършва се двукратно промиване в следния ред:
    - Добавят се 45 µl LNW1 към всяка ямка;
    - Плаката се маха от магнитната поставка;
    - Разбърква се на 1800 rpm за 5 минути;
    - Центрофугира се за кратко на 280 × g;
    - Поставя се на магнитна поставка и се изчаква 2 минути, докато течността се избистри;
    - Премахва се и се изхвърля супернатантата от всяка ямка;
- Прибавят се по 30 µl 0.1 N NaOH към всяка ямка;
- Плаката се маха от магнитната поставка;
- Разбърква се на 1800 rpm за 5 минути;
- Съдържанието на ямките трябва да е добре ресуспендирано. Ако някои ямки не са ресуспендирани, се пипетира, за да се разбъркат и след това отново се развърква на шейкъра на 1800 rpm за 5 минути;
- Центрофугира се на 280 x g за 1 минута;
- Плаката се поставя на магнитна поставка и се изчаква 2 минути, докато течността се избистри;
- Прибавят се 25 µl LNS1 към всяка ямка на нова PCR плака;
- От супернатантата в LNP плаката се отпипетират 25 µl от всяка проба и се прехвърлят в новата PCR плака, съдържаща LNS1;
- Вортексира се и след това PCR плаката с LNS1 и супернатанта се цетрофугира на 280 × g за 1 минута;

- След този етап запечатаната плака може да бъде съхранена на -25°C до -15°C за максимум 7 дена.

### *F. Пул библиотеки за MiSeq системата*

Еднакви обеми от нормализирана библиотека са комбинирани, разредени в HT1 и температурно денатурирани, преди да се прехвърлят към поточната клетка за клъстър генериране и секвениране.

*Консумативи:*

- HT1 (Hybridization Buffer, хибридизационен буфер)
- l колба с лед;
- Адхезивно запечатващо PCR фолио;
- Eppendorf LoBind микроцентрофужни епруветки.

*Приготвяне:*

- MiSeq системата трябва да е готова за работа;
- Ако нормализираната библиотека е била замразена, се оставя да се размрази на стайна температура, и след това се вортексира;
- Приготвят се следните консумативи (табл. 17):

*Табл. 17. Схема на консумативи за пул библиотеки:*

| **Реактив** | **Начин на съхранение** | **Инструкции** |
|---|---|---|
| MiSeq реагентна касета | -25°C до -15°C | Размразява се във водна баня на стайна температура за 1 час или престоява на 2°C to 8°C до следващия ден. |
| HT1 | -25°C до -15°C | Размразява се на стайна температура. Оставя се на 2°C до 8°C. |

(схема – Illumina, 2016)

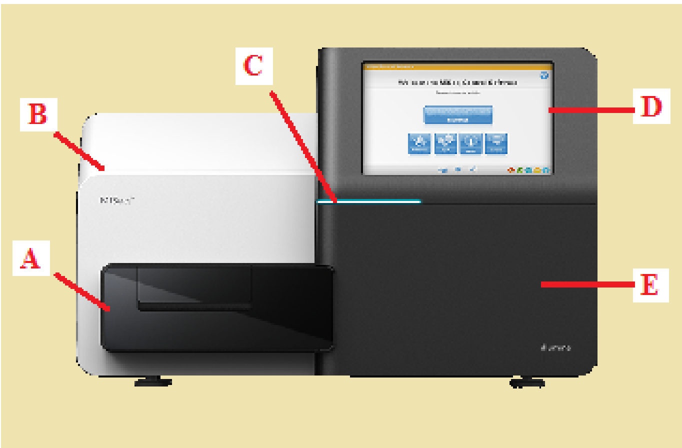
Следната пул програма се запазва на термоциклер с предварително загрят капак:

- 96°C за 3 минути
- 4°C за 5 минути
- Hold на 4°C

*Процедура:*

- Плаката се центрофугира на 280 × g за 1 минута;
- 5 µl от всяка нормализирана библиотека се поставят в една обща LoBind епруветка;
- Пул библиотеката се вортексира и центрофугира;
- 15 µl от пул библиотеката се прехвърля в нова PCR епруветка;
- Прибавят се 85 µl HT1;
- Обемът на PCR епруветката трябва да е 100 µl;
- Внимателно се вортексира и центрофугира сместа от пул/HT1;
- Веднага се поставя на препрограмирания термоциклер и се стартира пул програмата;
- 600 µl от HT1 се прехвърлят в друга чиста LoBind епруветка, която се оставя на ледена водна баня;
- Когато денатурацията завърши (PCR Пул програмата спре), веднага се прехвърлят 100 µl от денатуриран пул/ HT1 към LoBind епруветката с HT1 (която е била на ледена водна баня);
- Оставя се на мокър лед;
- Пул библиотеката се секвенира в MiSeq системата (фиг. 34).

*Фиг. 34. Апарат MiSeq с означения за различните компартменти:*




**A** - **Отделение за поточната клетка**
**B** - **Затворен оптичен модул** - съдържа оптични компоненти за визуализиране на поточната клетка
**C** - **индикаторна лампа за статуса на апарата**
**Син** - апаратът работи
**Оранжев** - внимание
**Зелен** - в готовност за нов run
**D** - **Touch Screen монитор**
**E** - **Reagent Compartment** - съдържа реагенти за протичането на run, буфер за миене и бутилка за отпадъци

(снимка – Illumina, 2016)

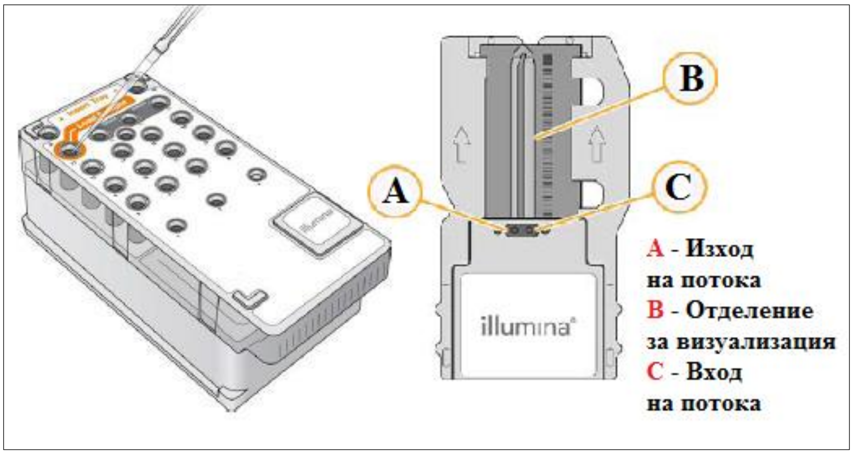
## 3. Секвениране

Последователността на работа с MiSeq се състои от стъпки на подготвяне на run-a, последвани от генериране на клъстери, секвениране на първоначалния анализ и вторичен анализ.

*Стъпки на подготвяне на run-a:*

- Приготвя се реагентна касета. MiSeq реагентната касета е еднократен консуматив, предварително зареден с генерирани клъстери и реактиви за секвениране;
- Преди започване на процеса библиотеките трябва да са заредени в реагентната касета в ямката, означена с оранжев цвят (фиг. 35). Използван е MiSeq Reagent Kit v2. Само по една пул библиотека може да се пуска за секвениране;
- От MCS екрана се избира бутон „Секвениране“ и се нагласят настройките за секвенирането;
- Поточната клетка се изплаква и се поставя на мястото си в MiSeq апарата. На нея се извършва клъстър генерирането и разчитането на базите;
- Поставят се също PR2 бутилката, съдържаща буфер за изплакване, и бутилката за отпадък;
- От получените в LoBind епруветкатата се накапват 600 μl в предварително размразената на лед реагентна касета, която съдържа необходимите реактиви за секвенирането;
- От контролния софтуер се дава начало на секвенирането.

*Фиг. 35. Реагентна касета с резервоар, в който се добавя приготвената библиотека от таргетни секвенции и поточна клетка, на която се извършва целият процес на секвениране:*



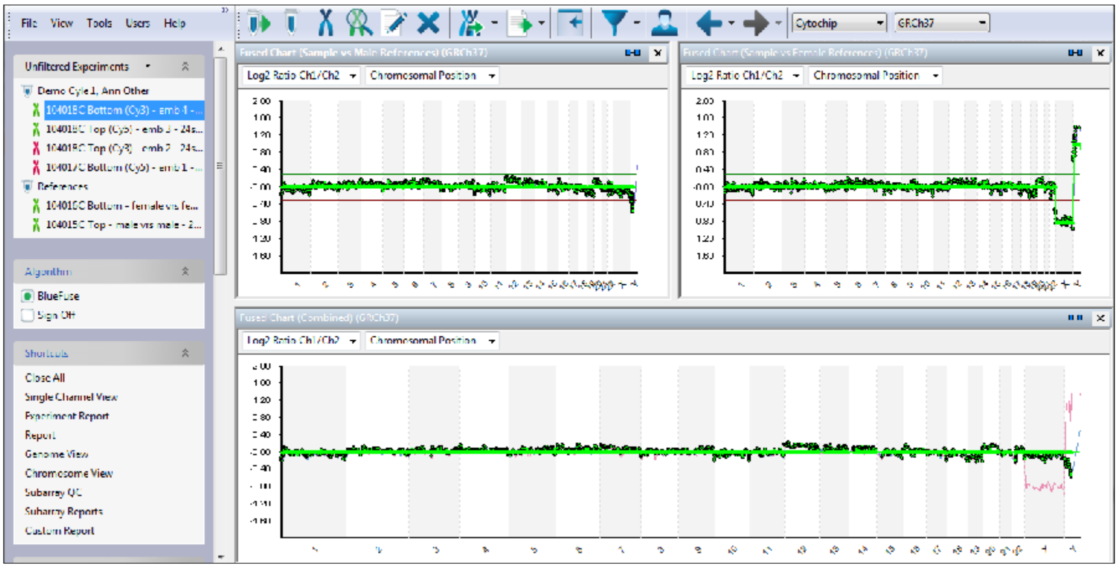

(снимка – Illumina, 2016)

Пробите, заредени в реагентната касета, се прехвърлят автоматично към поточната клетка в началото на процеса на клъстерно генериране. Реактивите навлизат в поточната клетка през входния порт, преминават зоната на визуализация и излизат през изходния порт. Отпадната течност, излизаща от поточната клетка, се събира в бутилката за отпадък.

### 4. Софтуерен анализ на получените данни

В настоящата работа след първичния анализ на получените секвенции от MiSeq Reporter софтуера за допълнителен анализ на получените данни е използвана програмата BlueFuse Multi version 4.3, (Illumina). Представени са примерни анализи на секвенционни данни от MiSeq Reporter и допълнителен анализ на секвенционните данни в BlueFuse Multi version 4.3 (фиг. 36).

*Фиг. 36. BlueFuse Multi version 4.3 за допълнителен анализ на секвенционните данни:*




(схема – Illumina, 2016)

### 5. Критериите за отчитане на резултата от експеримента

Данните от MiSeq се получават на две нива – ниво поточна клетка и ниво проба. Софтуерът дава възможност за оценка на качеството на хибридизация, промивка и достоверност на получените резултати - QC (Quality control, контрол на качеството).

*Aligned Reads (PF)*. Процентът на PF в идеален случай трябва да има стойности между 80 и 85%, но за приемливо се смята стойност над 70%. По-ниска стойност може да означава недостатъчно количество амплифицирана ДНК, контаминация в ДНК пробата или лошо качество на биопсията.

*Total Cluster Number.* Общият брой на кълстерите кореспондира с броя на позициите с дистинктивни ДНК молекули, детектирани на поточната клетка. Броят им трябва да е повече от 25 милиона, идеално - близо до 30 М. По-ниски нива не дават гаранция за точен анализ; по-високи нива са предпоставка за погрешно разчитане на секвенцията.

*Passing Filter.* От всички първоначални клъстери, които се формират върху поточната клетка, само част се смята за достатъчно достоверна за „downstream“ процесинг. Идеално филтърът на преминаване на клъстерите - “passing filter” (PF), трябва да достига поне 85% от нивото на всички клъстери. При по-ниски нива (например 75%) се индикира, че количеството на денатурирана библиотека е под необходимия оптимум.

*Добив (Yield, kb)* – трябва да е около 900,000 kb.

*Average Quality Score.* Осредненият контрол на качеството измерва сигурността на дадена база да се разпредели на съответна позиция. Q-score от 30 означава, че има 0.1% погрешно разпределени бази. Идеално стойността трябва да около 35, като минимална стойност – 30. Аналогични са стойностите за *Average Alignment Score* (осреднена стойност на подравняване).

*Number of Total Reads* (брой на всички прочитания). Идеално трябва да е около 1 милион, с минимална стойност – 700 хиляди.

*Number of Mapped Reads* – идеална стойност – 800 хиляди прочитания. По-ниски стойности индикират замърсяване в ДНК източника или недостатъчна ДНК амплификация.

*Number of Reads after Filtering* – идеална стойност е около 60% от всички прочитания, т.е. 600 хиляди прочитания.

*Overall Noise (DLR-Derivative Log Ratio)* – Идеални стойности са тези под 0.3. Нива над 0.4 показват ниско качество на ДНК пробата или проблеми при амплифицирането.

## РЕЗУЛТАТИ

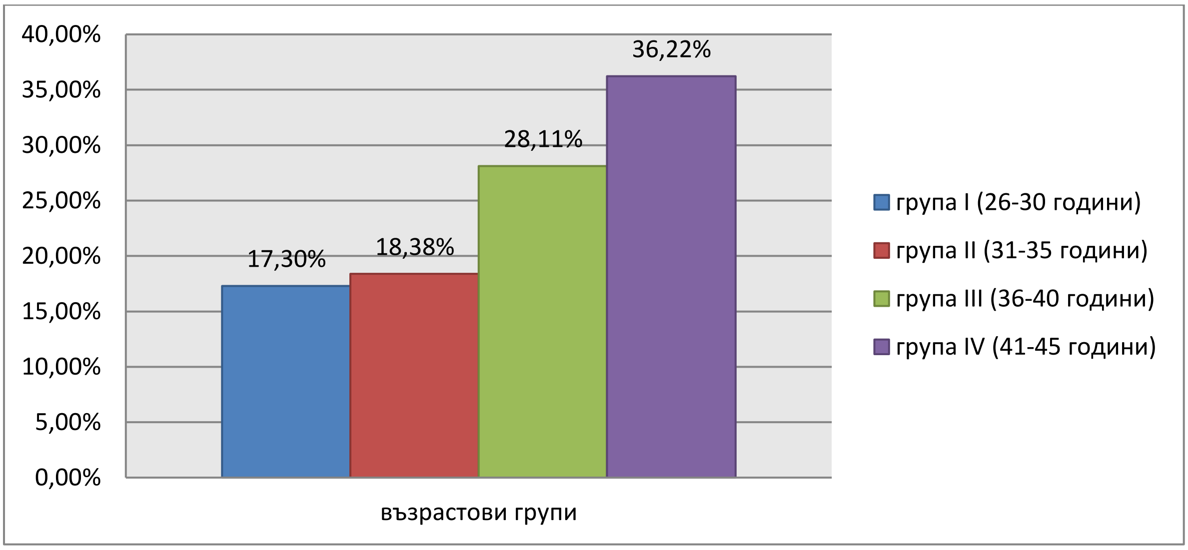
Първият етап от работата беше селекцията на пациенти с репродуктивни неблагополучия, подходящи за предимплантационен генетичен тест. Подборът на пациенти с репродуктивни неблагополучия беше проведен в МБАЛ „Надежда“ от лекари гинеколози, специалисти по асистирана репродукция и генетици. Създадена беше подробна електронна база данни, съдържаща клинични данни за всеки пациент. На по-голямата част от пациентите беше изготвена лимфоцитна култура за цитогенетичен анализ. Ембрионите на всички пациенти, които отговаряха на нашите критерии за включване в проучването, бяха изследвани с микрочипов CGH анализ и новогенерационно секвениране. След анализ на данните и подробна консултация с пациентите беше достигнато до решение кои ембриони са годни за трансфер.

### 1. Възраст на участниците

В настоящата разработка селекцията включваше група от 185 пациентки на възраст от 26 до 45 години със средна възраст 35.5 години. Пациентките бяха разделени в четири възрастови групи: група I се състоеше от пациентки на възраст между 26 и 30 години, група II – 31-35 години, група III – 36-40 години и група IV- 41-45 години.

Група I включваше 32 жени (17.30%), група II – 34 жени (18.38%), група III – 52 жени (28.11%). Най-голям процент от пациентките бяха на възраст между 41 и 45 години и попадаха в група IV – 67 пациентки (36.22%) (фиг.37).

*Фиг. 37. Възрастово разпределение на жените, участнички в проучването:*

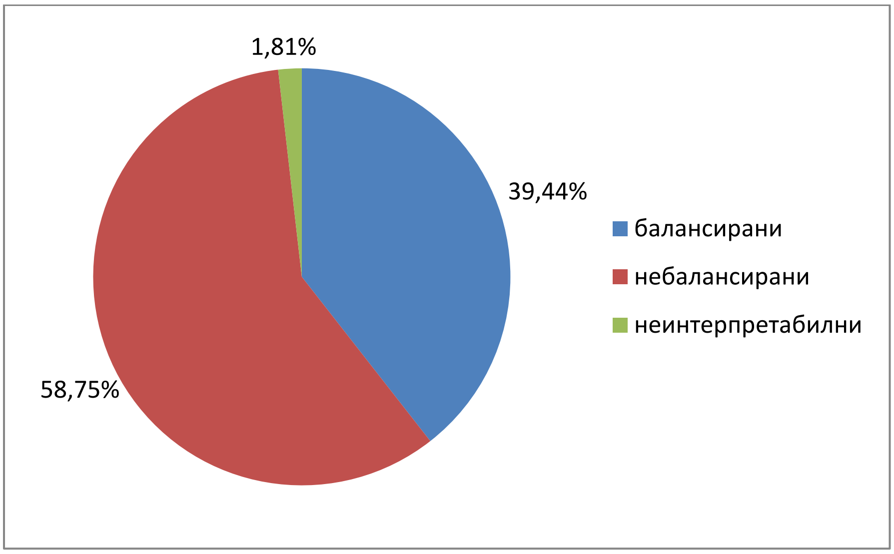


## 2. Брой и разпределение на балансираните и небалансираните ембриони

Чрез микрочипов CGH анализ и NGS секвениране бяха изследвани общо 497 ембриони от 231 ин витро цикъла. От тях 196 бяха балансирани (39.44%), 292 небалансирани (58.75%) и 9 неинтерпретабилни (1.81%) (фиг. 38). Неинтерпретабилните ембриони бяха изключени от проследяващ анализ и статистически данни.

От всички изследвани 497 ембриони, 129 (25.96%) бяха при пациенти с фамилно преустройство. При носителите на балансирани хромозомни преустройства се наблюдаваха 97 небалансирани и 32 балансирани ембриона.

*Фиг. 38. Процентно разпределение на изследваните в проучването ембриони:*

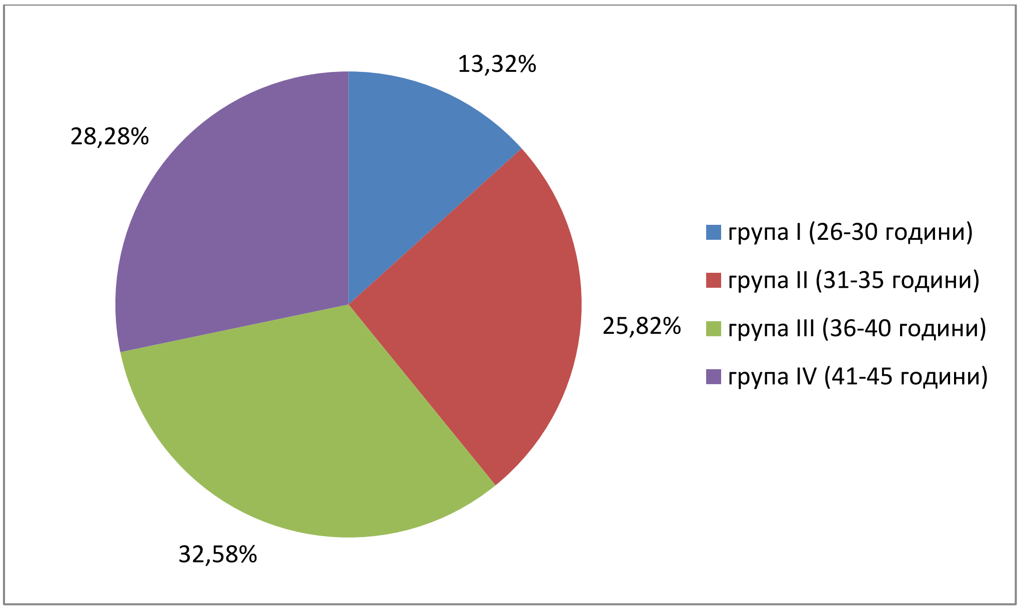



## 3. Разпределение на ембрионите по възрастови групи

Ембриотрансфер беше осъществен при всички пациентки, които имаха поне един балансиран ембрион - 40.54% от жените в проучването.

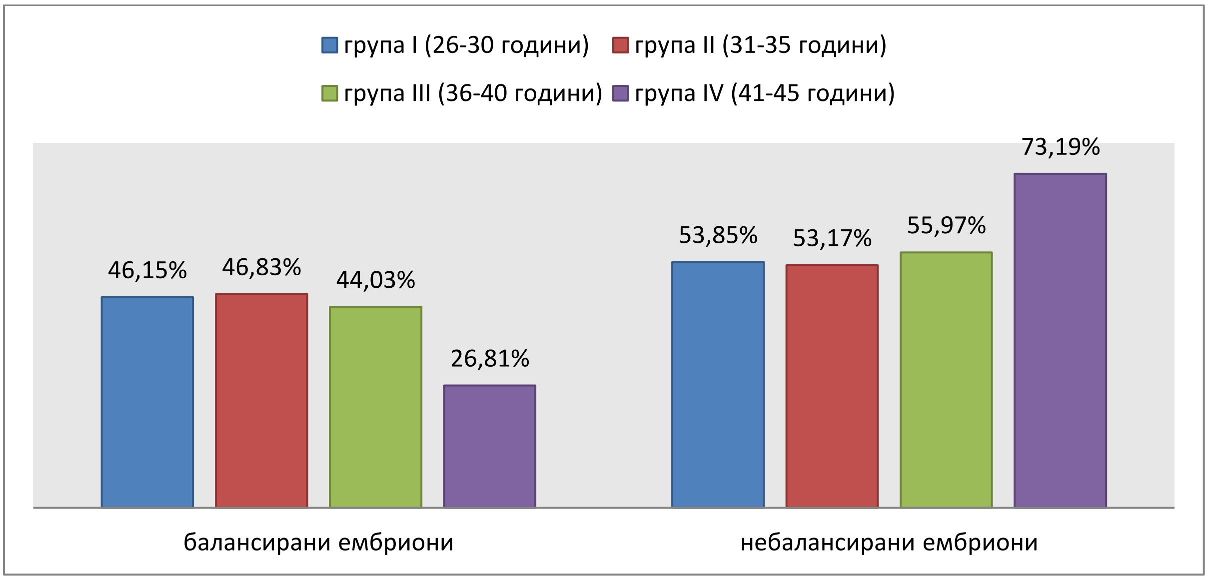
В група I бяха изследвани общо 65 ембриони (13.32% от всички изследвани ембриони), като 30 от тях бяха балансирани (15.31% от всички нормални ембриони) и 35 – небалансирани (11.99% от всички небалансирани ембриони). В група II попадаха 126 ембриони (25.82%), от които 59 балансирани (30.10%) и 67 небалансирани (22.95%). В група III бяха анализирани 159 ембриони (32.58%): 70 балансирани (35.71%), 89 небалансирани (30.48%). Група IV се състоеше от 138 изследвани ембриони (28.28%), от които 37 нормални (18.88%) и 101 с хромозомни аномалии (34.59%) (фиг. 39).

*Фиг. 39. Процентно разпределение на изследваните ембриони по възрастови групи:*




В група I от всички 65 изследвани в групата ембриони 46.15% бяха балансирани и 53.85% - небалансирани. В група II от 126 ембриони 46.83% бяха балансирани и 53.17% - небалансирани. В група III от всички изследвани във възрастовата група 159 ембриони 44.03% бяха балансирани и 55.97% - небалансирани. В група IV се наблюдаваше най-малък процент на балансирани ембриони спрямо всички анализирани в групата ембриони - от 138 ембриони 26.81% бяха нормални и 73.19% съдържаха хромозомни аномалии (фиг. 40).

*Фиг. 40. Процентно разпределение на балансирани и небалансирани ембриони по възрастови групи:*

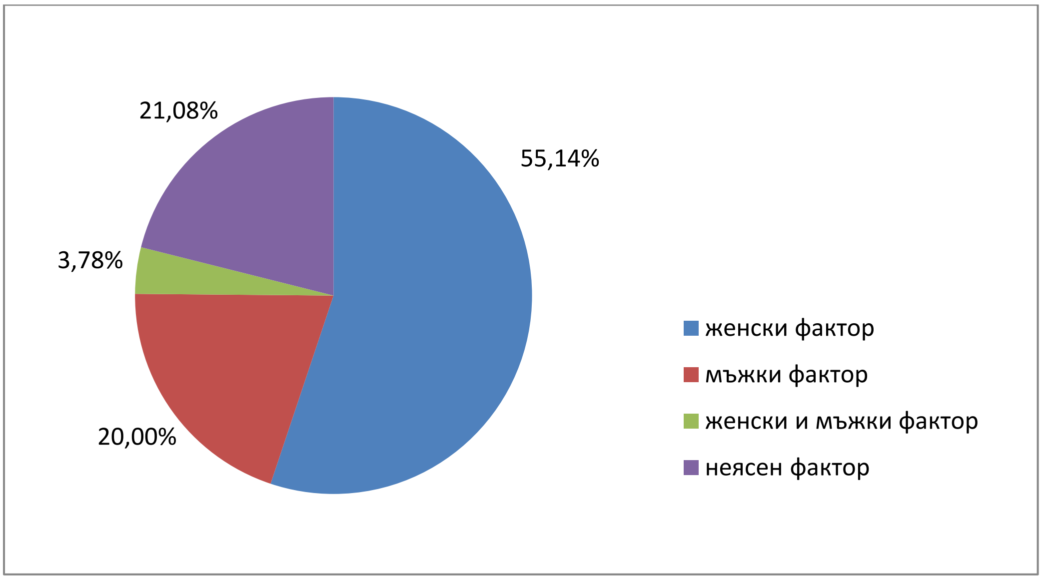


### 4. Анализ на причините за репродуктивни неблагополучия

При по-голямата част от двойките участници в изследването причината за инфертилитет беше женски фактор (102 двойки, 55.14% спрямо всички причини за репродуктивни неблагополучия). Мъжко безплодие беше причина при 37 от двойките (20.00%).

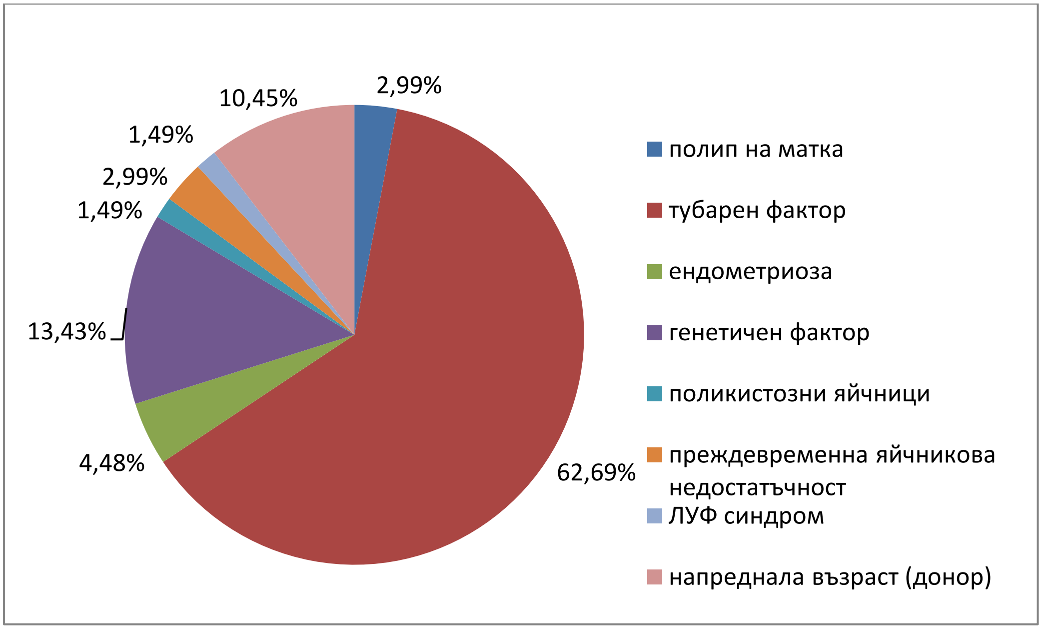
Комбинация от проблеми както при жената, така и при мъжа от двойката, бяха установени при 7 двойки (3.78% от всички двойки). Не беше установена ясна причина за репродуктивни неблагополучия при 39 двойки (21.08%) (фиг. 41).

*Фиг. 41. Основни фактори за инфертилитет при пациентите в проучването:*



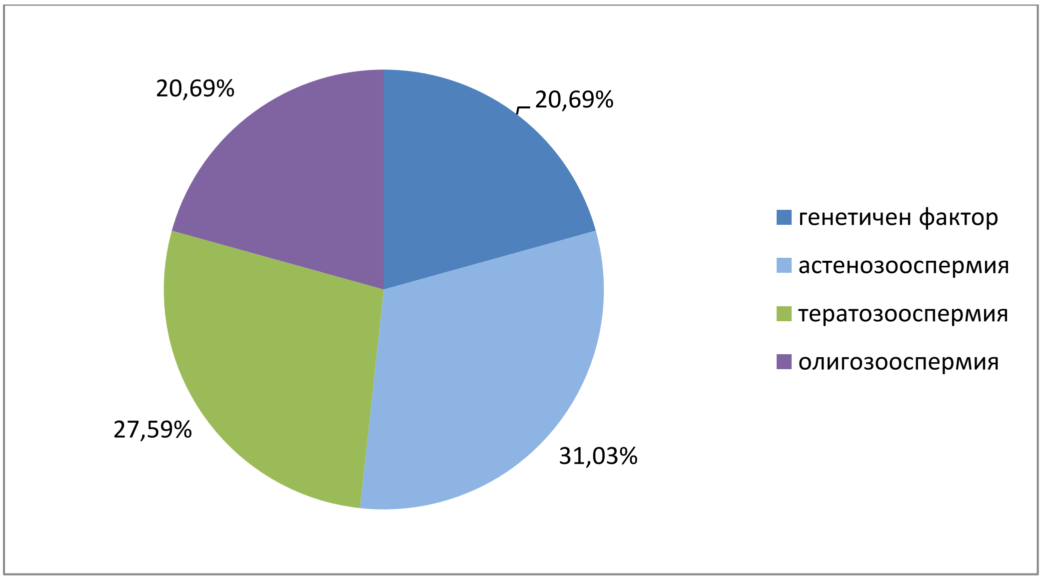

Беше извършена детайлна разбивка на причините за репродуктивни проблеми от страна на партньорките в проучването. Водещ фактор при повече от половината жени беше тубарният фактор (62.69%). Следващи по честота се подреждаха генетични причини – балансирани инверсии и транслокации (13.43%). Донорство на яйцеклетки поради напреднала възраст на партньорката (над 45 години) беше осъществено при 10.45% от двойките. По-малък процент от женското безплодие се дължеше на ендометриоза (4.48%), полип на матката (2.99%) и преждевременна яйчникова недостатъчност (2.99%). Най-малък процент от всички женски фактори заемаха лутеинизиран неруптурирал фоликул (ЛУФ синдром) и синдром на поликистозни яйчници – съответно по 1.49% (фиг. 42).

*Фиг. 42. Причини за инфертилитет при жените в проучването:*




При мъжете генетични причини бяха отговорни за 20.69% от случаите на инфертилитет. Останалите 79.31% се дължаха на отклонения в спермограмата – астенозооспермия (31.03%), тератозооспермия (27.59%) и олигозооспермия (20.69%) (фиг. 43).

*Фиг. 43. Причини за инфертилитет при мъжете в проучването:*




## 5. Вид и честота на хромозомните аберации от проведения PGT анализ

Хромозомните аномалии при изследваните ембриони бяха поделени на структурни и бройни.

Структурни аберации се откриха при 79 ембриони (27.05% от всички небалансирани ембриони), като в 13.92% от случаите се дължаха на дупликации, 34.18% съдържаха комбинации от дупликация и делеция, а повече от половината от ембрионите имаха делеции (51.90%).

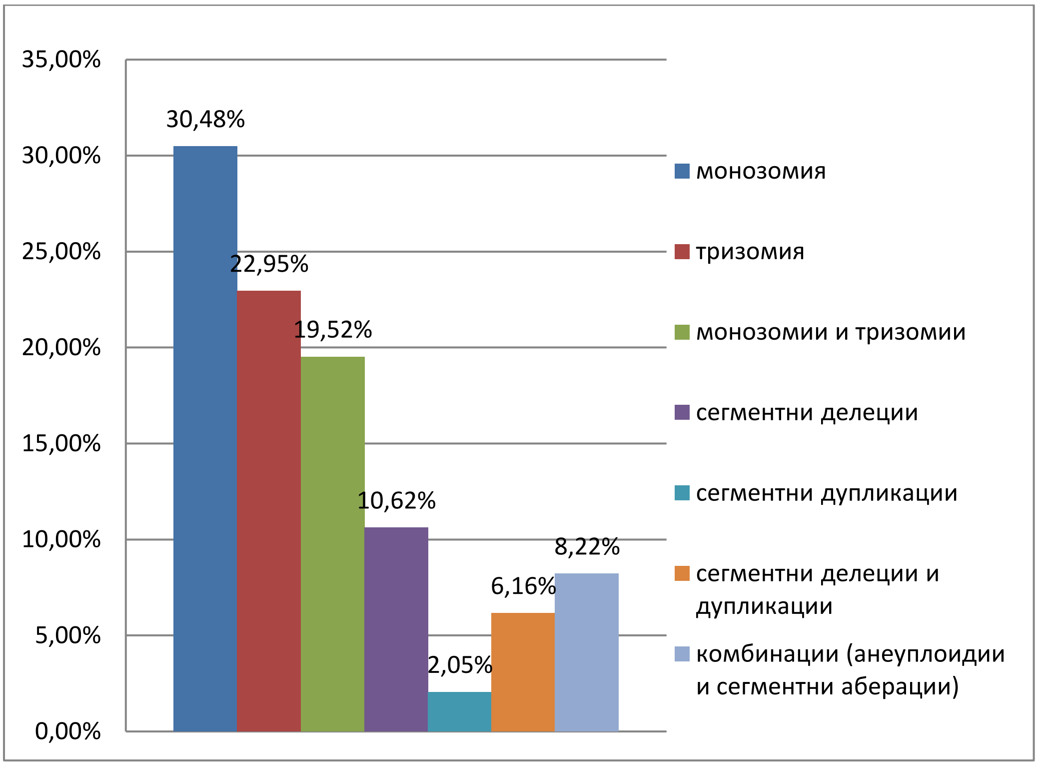
Структурните аберации бяха разделени на сегментни аберации при пациенти с нормален кариотип и сегментни аберации при пациенти с балансирано хромозомно преустройство. От всички 79 ембриони, съдържащи структурни аберации, 61 (77.22%) бяха на двойки, при които единият партньор е носител на балансирано хромозомно устройство. При пациентите с нормален кариотип се наблюдаваха само 18 небалансирани ембриона (22.78%), съдържащи сегментни аберации.

Бройни хромозомни промени бяха установени при 261 ембриони (89.38% от всички небалансирани ембриони). Най-често срещана беше пълната монозомия (34.10%), следвана от пълната тризомия (25.67%) и комбинация от наличие на монозомия и тризомия (21.84%). Мозаични анеуплоидии бяха установени при 48 ембриони (18.39% от анеуплоидните ембриони), като в 11.88% от случаите се срещаше мозаичната тризомия и в 6.51% мозаична монозомия. Не бяха детектирани ембриони с комбинация от мозаична монозомия и тризомия.

От всички 261 анеуплоидни ембриона, 222 съдържаха само автозомни анеуплоидии (85.06%). При 26 от ембрионите (9.96%) бройната хромозомна аномалия се дължеше на комбинация от автозомна и гонозомна анеуплоидия. Най-слабо застъпена беше самостоятелната анеуплоидия на половите хромозоми – 13 ембриони (4.98%).

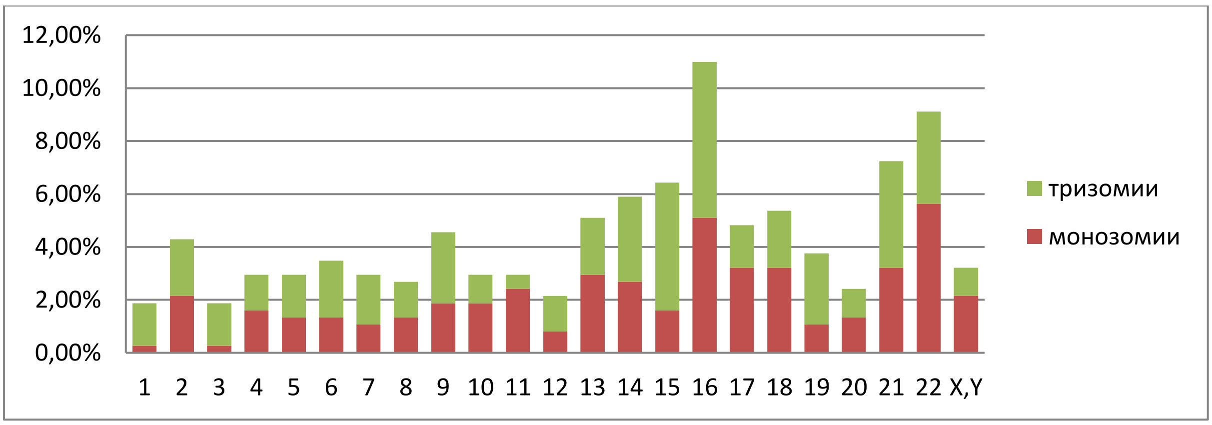
При 213 от всички небалансирани ембриони се срещаха само анеуплоидии – монозомия (30.48%), тризомия (22.95%), комбинация от монозомия и тризомия (19.52%). При 55 небалансирани ембриони се срещаха само сегментни аберации – делеция (10.62%), дупликация (2.05%), комбинация от делеция и дупликация (6.16%). Общо 24 ембриони имаха комбинация от анеуплоидия и сегментна аберация или 8.22% от всички 292 небалансирани ембриони (фиг. 44).

*Фиг. 44. Процентно разпределение на видовете хромозомни аберации при небалансираните ембриони:*




Беше извършено детайлно разпределение на хромозомите, участващи в анеуплоидии. Най-честите пет хромозомни анеуплоидии засягаха хромозоми 14, 15, 16, 21 и 22, отговорни за 32.98% от всички анеуплоидии. Най-честа беше бройната промяна в хромозома 16, която представляваше 10.99% от случаите, непосредствено следвана от хромозома 22 (9.12%) и хромозома 21 (7.24%). Най-редки от всички бройни хромозомни промени бяха анеуплоидии на хромозоми 1 (1.88%), 3 (1.88%) и 12 (2.14%) (фиг. 45).

*Фиг. 45. Процентно разпределение на анеуплоидиите по хромозоми:*



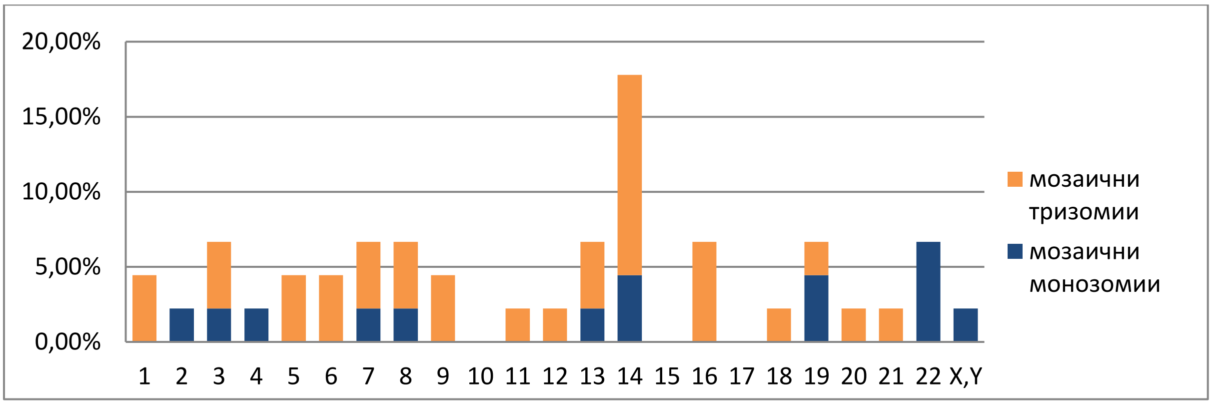
Най-разпространена монозомия сред изследваните ембриони беше монозомия на хромозома 21 (11.60% от всички монозомии), последвана от монозомия на хромозома 16 (10.50%), хромозоми 13, 17, 18 и 21 (съответно с по 6.08%). При тризомиите водеща беше тризомия на хромозома 16 (11.46%), следвана от тризомия на хромозоми 15 (9.38%) и 21 (7.81%) (табл. 18).

*Табл. 18. Честота на анеуплоидиите по хромозоми в низходящ ред:*

| Хромозома | % анеуплоидии | % тризомии | % монозомии |
|---|---|---|---|
| **16** | 21,96% | 11,46% | 10,50% |
| **22** | 18,37% | 6,77% | 11,60% |
| **21** | 14,44% | 7,81% | 6,63% |
| **15** | 12,69% | 9,38% | 3,31% |
| **14** | 11,77% | 6,25% | 5,52% |
| **18** | 10,80% | 4,17% | 6,63% |
| **13** | 10,24% | 4,17% | 6,08% |
| **17** | 9,75% | 3,13% | 6,63% |
| **9** | 9,08% | 5,21% | 3,87% |
| **2** | 8,59% | 4,17% | 4,42% |
| **19** | 7,42% | 5,21% | 2,21% |
| **6** | 6,93% | 4,17% | 2,76% |
| **X, Y** | 6,50% | 2,08% | 4,42% |
| **11** | 6,01% | 1,04% | 4,97% |
| **10** | 5,95% | 2,08% | 3,87% |
| **4** | 5,92% | 2,60% | 3,31% |
| **5** | 5,89% | 3,13% | 2,76% |
| **7** | 5,86% | 3,65% | 2,21% |
| **8** | 5,37% | 2,60% | 2,76% |
| **20** | 4,85% | 2,08% | 2,76% |
| **12** | 4,26% | 2,60% | 1,66% |
| **1** | 3,68% | 3,13% | 0,55% |
| **3** | 3,68% | 3,13% | 0,55% |

Беше извършена оценка на мозаичните анеуплоидии. Мозаични анеуплоидии се срещаха в 15.41% от ембрионите. Най-често в мозаично състояние с дял 17.78% от всички мозаични анеуплоидии се срещаше хромозома 14 (фиг. 46).

*Фиг. 46. Процентно разпределение на мозаичните анеуплодии по хромозоми:*




Най-разпространена мозаична монозомия сред анализираните ембриони беше монозомия на хромозоми 14 и 19 (по 4.44% от всички мозаични монозомии). При мозаичните тризомиите на първо място беше тризомия на хромозома 14 (13.33%), следвана от мозаична тризомия на хромозоми 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 и 13 (по 4.44% от всички мозаични тризомии). Не бяха установени мозаични тризомии на следните хромозоми: 2, 4, 10, 15, 17, 22 и полови хромозоми. Не бяха открити мозаични монозомии на хромозоми 1, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 20 и 21 (табл. 19).

*Табл. 19. Честота на мозаичните анеуплоидии по хромозоми в низходящ ред:*

| **Хромозома** | **% мозаични анеуплоидии** | **% мозаични тризомии** | **% мозаични монозомии** |
|---|---|---|---|
| **14** | 17,78% | 13,33% | 4,44% |
| **3** | 6,67% | 4,44% | 2,22% |
| **7** | 6,67% | 4,44% | 2,22% |
| **8** | 6,67% | 4,44% | 2,22% |
| **13** | 6,67% | 4,44% | 2,22% |
| **16** | 6,67% | 6,67% | 0,00% |
| **19** | 6,67% | 2,22% | 4,44% |
| **22** | 6,67% | 0,00% | 6,67% |
| **1** | 4,44% | 4,44% | 0,00% |
| **5** | 4,44% | 4,44% | 0,00% |
| **6** | 4,44% | 4,44% | 0,00% |
| **9** | 4,44% | 4,44% | 0,00% |
| **2** | 2,22% | 0,00% | 2,22% |
| **4** | 2,22% | 0,00% | 2,22% |
| **11** | 2,22% | 2,22% | 0,00% |
| **12** | 2,22% | 2,22% | 0,00% |
| **18** | 2,22% | 2,22% | 0,00% |
| **20** | 2,22% | 2,22% | 0,00% |

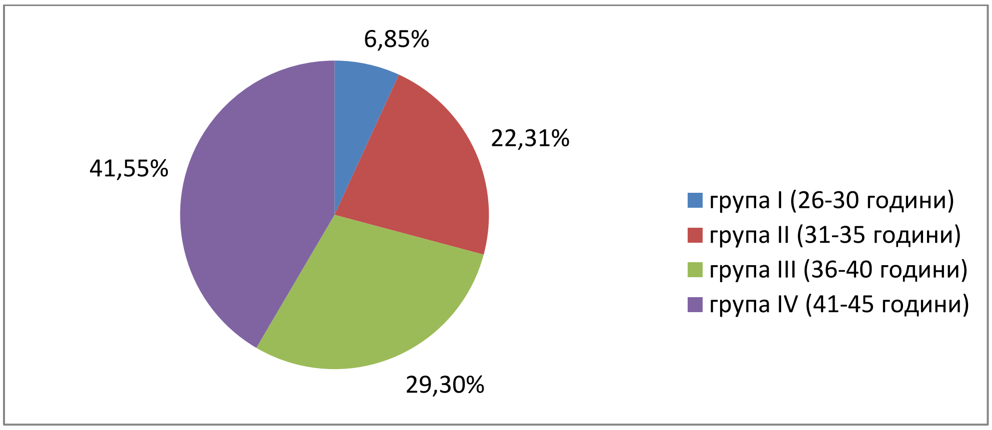
| | | | |
|---|---|---|---|
| **21** | 2,22% | 2,22% | 0,00% |
| **(X)x2,(Y)x1** | 2,22% | 0,00% | 2,22% |
| **10** | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| **15** | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| **17** | 0,00% | 0,00% | 0,00% |

### 6. Честота на анеуплоидиите по възрастови групи

Бройните хромозомни аберации бяха най-честата причина за небалансирани ембриони във всички възрастови групи. Техният процент се повишаваше с нарастване на възрастта на пациентките.

Най-голям процент на анеуплоидии от всички ембриони, съдържащи бройни хромозомни промени, се наблюдаваше при групата с най-напреднала възраст – група IV (41.55%). Група III имаше значителен дял от анеуплоидни ембриони – 29.30%. Групи II и I заемаха трето и четвърто място по честота на бройните аберации съответно с 22.31% и 6.85% (фиг. 47).

*Фиг. 47. Процентно разпределение на анеуплоидиите по възрастови групи:*




### 7. Резултати от PGT-SR при пациенти, носители на хромозомни мутации

При 16 от изследваните двойки, с цитогенетичния анализ се установи, че единият от партньорите е носител на патологичен кариотип. Бяха диагностицирани 15 балансирани хромозомни транслокации – 9 при представители от женски пол и 6 при представители от мъжки пол. При тринадесет пациента се касаеше за реципрочни транслокации (между две двойки хромозоми). При двама пациента (един от мъжки и един от женски пол) бяха установени сложни транслокации, включващи три хромозоми. Открита беше една инверсия на хромозома 14 при пациент от мъжки пол.

При пациентите с патологичен кариотип бяха изследвани общо 129 ембриона, 32

(24.81%) от които бяха балансирани и 97 – небалансирани (75.19%).

Трансфер беше извършен на всички пациенти, които имаха един или повече еуплоидни ембриони – на 10 двойки (62.50%). Останалите 6 двойки имаха само небалансирани ембриони и бяха насочени за следващ ин витро цикъл.

При по-голямата част от двойките с патологичен кариотип, при които беше осъществен трансфер, беше регистрирана биохимична бременност (80.00%) и беше достигнато до живо раждане – при 7 двойки или 70.00% от всички двойки с патологичен кариотип. При една от двойките, бременността беше проследена до късна фетална морфология в периода 28-32 г.с., която не показа отклонения, след което липсваха данни за изхода от бременността (фиг. 48, табл. 20).

*Фиг. 48. Процентно разпределение на ембриотрансфер, биохимична бременност и живо раждане при пациенти с патологичен кариотип:*

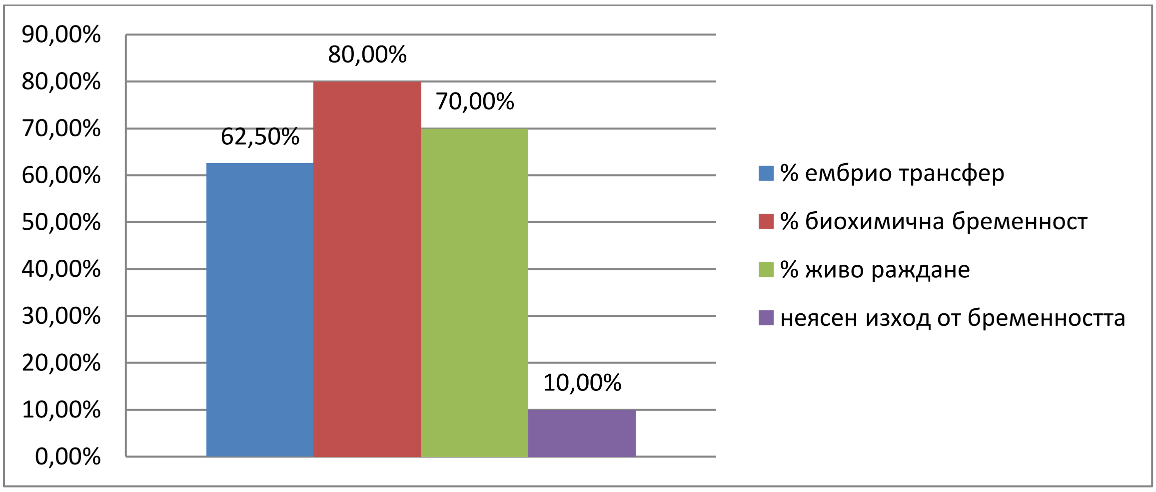



*Табл. 20. Брой изследвани ембриони, балансирани и небалансирани ембриони, биохимична бременност и живо раждане при пациенти с патологичен кариотип:*

| **Патологичен кариотип** | **Брой ембриони** | **Бал.** | **Небал.** | **(+)CGH** | **Живо раждане** |
|---|---|---|---|---|---|
| 46,XY,inv(14)(p12q22) | 3 | 3 | | + | ? |
| 46,XX,t(11;15)(q23;q12) | 11 | 3 | 8 | + | + |
| 46,XX,t(9;14)(q34;q22) | 8 | 3 | 5 | + | + |
| 45,XX,t(14;21)(q10;q10) | 2 | | 2 | - | - |
| 46,XY,t(1;6)(p31;q22) | 36 | 10 | 26 | + | + |
| 46, XX,t(9;14)(q12.1;p11.2) | 22 | 3 | 19 | + | + |
| 46,XX,t(12;18)(q24.1;q21.3) | 1 | 1 | | + | + |
| 46,XY,t(1;14)(q31q24) | 3 | | 3 | - | - |
| 46,XY, t(11;13)(p15;q12) | 13 | 4 | 9 | + | + |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 46,XX,t(4;7)(q21;q11) | 3 | | 3 | - | - |
| 46,XY,t(2;20)(q35;q11) | 2 | 1 | 1 | - | - |
| 46,XX,t(7;16)(q36;q13) | 1 | | 1 | - | - |
| 46,XX,t(7;11)(p22q13.1) | 4 | 1 | 3 | - | - |
| 45,XY,t(13;14)(q10;q10) | 1 | | 1 | - | - |
| 46,XY,t(1;8;11)(1qter→1p22::8q11.1→8qter)(8pter→8q11.1::11q22→11qter)(11pter→11q22::1p22→1pter) | 5 | | 5 | - | - |
| 46,XX,t(3;6;7)(3pter->3q13.2::7p22-<7pter;6pter->6q21::3q13.2->3qter;7qter->7p22::6q21->6qter) | 14 | 3 | 11 | + | + |

При двама пациента (един от мъжки и един от женски пол) бяха установени Робертсонови транслокации. При останалите тринадесет пациента се касаеше за реципрочни транслокациите (8 - при жени и 5 - при мъже). При пациентите с Робертсонови транслокации бяха изследвани общо 3 ембриона, като всички бяха небалансирани и не се достигна до ембриотрансфер.

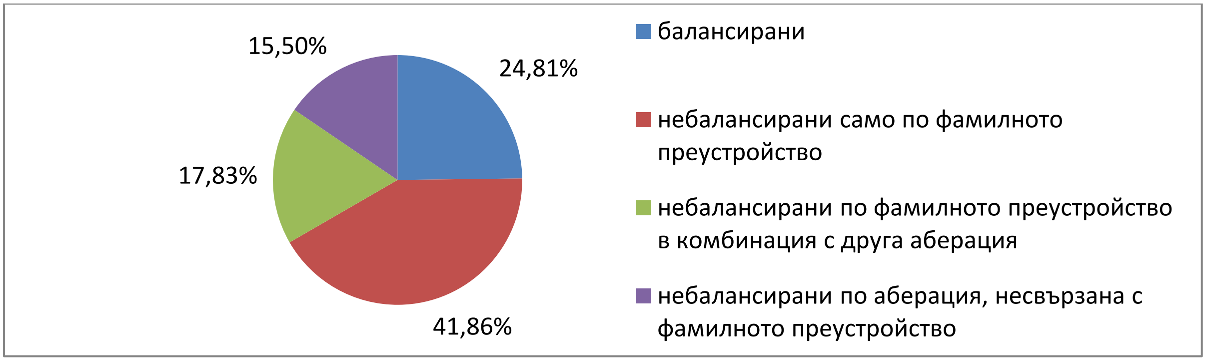
При носителите на реципрочни транслокации бяха анализирани общо 123 ембриона, двадесет и девет, от които бяха балансирани (23.58%) и 94 бяха небалансирани (76.42%). При девет от двойките с реципрочни транслокации (69.23%), които имаха един или повече еуплоидни ембриони, беше извършен трансфер. Останалите 4 двойки имаха само небалансирани ембриони и бяха насочени за следващ ин витро цикъл.

При седем от деветте двойки с реципрочни транслокации, при които беше извършен ембриотрансфер беше достигнато до живо раждане (77.78%).

## 8. Разпределение на ембриони при фамилни преустройства

При пациентите с патологичен кариотип бяха изследвани общо 129 ембриона, 32 (24.81%) от които бяха балансирани и 97 – небалансирани (75.19%): 77 (59.69%) бяха засегнати от майчиното/бащиното хромозомно преустройство; 54 (41.86%) бяха небалансирани само по майчиното/бащиното преустройство, 23 (17.83%) имаха унаследен дисбаланс от майчиното/бащиното преустройство в комбинация с друга аберация, а 20 (15.50%) ембриона нямаха връзка с фамилното преустройство (фиг. 49).

*Фиг 49. Разпределение на ембрионите при фамилни преустройства:*




***Клиничен случай 1: 46,XY,inv(14)(p12q22)***

Касае се за двойка с неизяснен стерилитет - жена на 45 години и мъж на 44 години, претърпели една неуспешна инсеминация и 4 неуспешни процедури ин витро. При партньора беше установен патологичен кариотип с инверсия на хромозома 14 - 46,XY,inv(14)(p12q22). След медико-генетична консултация пациентите бяха насочени към процедура по оплождане ин витро с предимплантационна генетична диагностика. Изследвани бяха 3 ембриона, всички от които бяха балансирани. Извършен беше ембриотрансфер. Не беше установена биохимична бременност. Последва втори ембриотрансфер, след който беше реализирана бременност. Извършена беше хорионбиопсия, която показа, че плодът е нормален, което съответстваше на данните от проведения PGT. Пациентката е посетила клиниката за фетална морфология в 28-32 г.с., която не показа отклонения, след което липсват данни за изхода от бременността.

***Клиничен случай 2 - 46,XX,t(11;15)(q23;q12)***

Касае се за двойка с два спонтанни аборта, един аборт по медицински показания и ендометриоза при жената - жена на 39 години с и мъж на 40 години. След извършен цитогенетичен анализ при партньорката беше установен патологичен кариотип с балансирана транслокация между хромозоми 11 и 15 - 46,XX,t(11;15)(q23;q12). Пациентите бяха насочени за PGT процедура. Изследвани бяха 11 ембриона, 3 от които бяха балансирани и 8 небалансирани (табл. 21). След ембриотрансфер беше постигната биохимична бременност, а впоследствие и живо раждане на дете, незасегнато от транслокацията на майката.

*Табл. 21. Резултати от PGT:*

| Трофектодерм № | Резултат от PGT | Коментар |
|---|---|---|
| **1** | arr(11)(q25qter)x1,(15)(q22qter)x3 | небалансиран |

| | | |
|---|---|---|
| **4** | arr(7,11)x1, (16,21)x3 | небалансиран |
| **5** | arr(1-22)x2,(X)x1 | небалансиран |
| **6** | arr(15)x1 | небалансиран |
| **7** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **8** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **9 - 1** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **9 - 2** | arr(11)(q25qter)x3,(15)(q21qter)x1 | небалансиран |
| **10** | arr(15)x3 | небалансиран |
| **11** | arr(11)(q25qter)x1,(15)(pterq22)x3 | небалансиран |
| **12** | arr(5)(q14.3qter)x1 | небалансиран |

***Клиничен случай 3 - 46,XX,t(9;14)(q34q22)***

Касае се за жена на 33 години и мъж на 41 години с петгодишен стерилитет. Жената е с билатерална салпингектомия. Двойката има два неуспешни предишни ин витро опита и един спонтанен аборт. Пациентите бяха насочени за постнатален хромозомен анализ, който показа наличие на патологичен кариотип с балансирана транслокация между хромозоми 9 и 14 - 46,XX,t(9;14)(q34;q22) при жената. Беше проведен PGT за установяване статуса на получените чрез ин витро процедури ембриони. Анализирани бяха 8 ембриона, като 3 от тях бяха еуплоидни и 5 анормални (табл. 22). Беше реализирана бременност, довела до раждане на здраво дете.

*Табл. 22. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **3** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **4** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **5** | arr mos(14,22)x1,mos(12)x3 | небалансиран |
| **6** | arr(14)(q10q23.3) | небалансиран |
| **8** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **10** | arr(9)x3,(14)(pterq23)x1 | небалансиран |
| **13** | arr(18)x3 | небалансиран |
| **14** | arr(14)(q23qter)x1 | небалансиран |

***Клиничен случай 4 - 45,XX,t(14;21)(q10;q10)***

Касае се за двойка с мъжки фактор за инфертилитет и напреднала възраст на жената (43 години). Рутинният цитогенетичен анализ на партньорите показа наличие на патологичен кариотип при жената - Робертсонова транслокация между хромозоми 14 и 21 - 45,XX,t(14;21)(q10;q10). Чрез PGT на двойката бяха изследвани 2 ембриона, които се оказаха небалансирани (табл. 23).

*Табл. 23. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **1** | arr(9)x3 | небалансиран |
| **4** | arr(22,5)x1 | небалансиран |

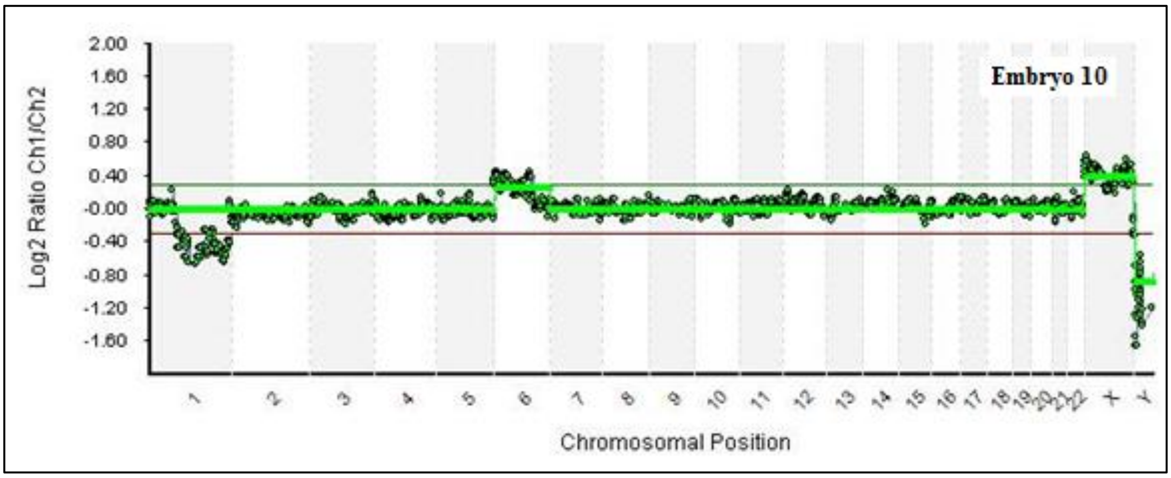
***Клиничен случай 5 – 46,XУ,t(1;6)(p31;q22)***

Касае се за двойка с репродуктивни неудачи – жена на 36 години и мъж на 44 години. Двойката има едно здраво родено дете, един аборт по желание и три последващи спонтанни аборти. При кариотипирането при партньора беше открита балансирана реципрочна транслокация между хромозоми 1 и 6 - 46,XУ,t(1;6)(p31;q22). За целите на PGT бяха биопсирани общо 28 ембриона и извършени шест IVF-PGT-SR процедури, при които бяха установени 7 балансирани ембриона и 21 небалансирани ембриона. При първия  свеж ембриотрансфер на балансиран ембрион на ден 6 беше реализирана бременност, завършила със спонтанен аборт. Абортивният материал е изследван чрез микрочипов анализ, който потвърди нормален кариотип (arr(1-22)x2), установен от предимплантационния генетичен тест. При следващ ин витро цикъл с PGT-SR бяха изследвани 8 ембриона, 3 от които бяха балансирани и 5 небалансирани (табл. 24, фиг. 50). След извършен емрбиотрансфер, беше установена биохимична бременност и постигнато раждане на здраво дете.

*Табл. 24. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от последния PGT-SR цикъл** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **1** | arr(14)x1,(1)(pterp31.1)x1,(6)(q22.3qter)x3 | небалансиран |
| **4** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **5** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **6** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **9** | arr(1)x3,(6)x1 | небалансиран |
| **10** | arr(1)(pterp31.1)x1,(6)(q22.3qter)x3 | небалансиран |
| **11** | arr(22)x3 | небалансиран |
| **12** | arr(1)(pterp31.1)x1,(6)(q22.3qter)x3 | небалансиран |

*Фиг. 50. Геномен профил на изследваният с PGT-SR ембрион - небалансиран по бащината транслокация ембрион – кариотип arr(1)(pterp31.1)x1,(6)(q22.3qter)x3:*



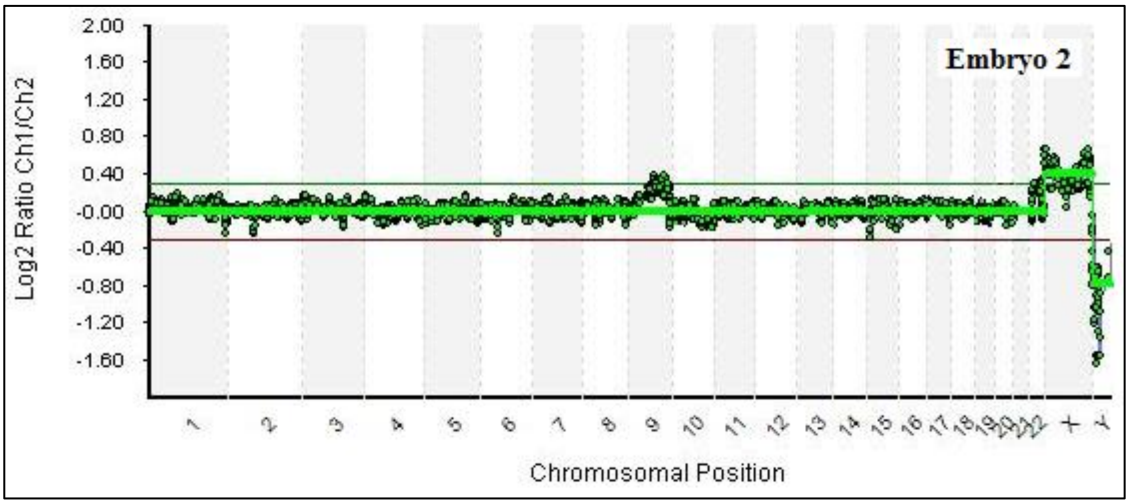

***Клиничен случай 6 - 46,XX,t(9;14)(q12.1;p11.2)***

Касае се за двойка с няколко спонтанни аборта – жена на 41 години и мъж на 42 години. При жената с цитогенетичен анализ беше открит патологичен кариотип с балансирана транслокация между хромозоми 9 и 14 - 46,XX,t(9;14)(q12.1;p11.2). Чрез предимплантационен генетичен тест бяха установени 2 небалансирани и 1 балансиран ембрион и беше постигната биохимична бременност и раждане на здраво дете от женски пол. Впоследствие двойката идва с желание за второ дете. Биопсирани бяха общо 19 ембриона и бяха извършени три процедури ин витро с PGT-SR, при които бяха установени 2 балансирани ембриона и 17 небалансирани ембриона. При първия и втория цикъл бяха изследвани 16 ембриона, 1 от които беше балансиран и 15 бяха небалансирани. Беше осъществен ембриотрансфер на балансирания ембрион на ден 5, който не доведе до биохимична бременност. Настъпи спонтанна бременност, която обаче завърши със спонтанен аборт. Абортивният материал беше изследван с микрочипова диагностика и резултатите от изследването показаха наличие на патологичен кариотип - arr(9)(q12qter)x1. При третия цикъл бяха изследвани 3 ембриона, от които 1 беше балансиран и 2 бяха небалансирани (табл. 25, фиг. 51). Ембрионът беше с лоша морфология и не беше трансфериран.

*Табл. 25. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от третия PGT-SR цикъл** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **2** | arr(9)(pterq12)x3 | небалансиран |
| **3** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **4** | arr(9,15)x3 | небалансиран |

*Фиг. 51. Геномен профил на изследваният с PGT-SR ембрион - небалансиран по майчината транслокация ембрион – кариотип arr(9)(pterq12)x3:*




***Клиничен случай** 7 - **46,XX,t(12;18)(q24.1;q21.3)***

Касае се за 36-годишна жена и 42-годишен мъж със стерилитет. След кариотипиране при жената беше установена балансирана транслокация между хромозоми 12 и 18 - 46,XX,t(12;18)(q24.1;q21.3). На пациентката беше извършена процедура ин витро с PGT-SR; като резултат беше установен един еуплоиден ембрион, който беше трансфериран. Реализира се успешна бременност и живо раждане.

***Клиничен случай 8 - 46,XY,t(1;14)(q31;q24)***

Касае се за двойка - жена на 39 години и мъж на 47 години, с женски фактор на инфертилитет (тубарен фактор и полип на матката) и няколко неуспешни ин витро опита, при които са установени яйцеклетки с лоша морфология. При цитогенетичния анализ беше установена балансирана транслокация между хромозоми 1 и 14 при партньора - 46,XY,t(1;14)(q31;q24). След провеждането на PGT-SR и трите изследвани ембриона се оказаха небалансирани (табл. 26). По настоящем двойката чака за следващ ин витро опит.

*Табл. 26. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **2** | arr(13)x1 | небалансиран |
| **2 - 2** | arr(11)(q22.2q25)x1 | небалансиран |
| **6** | arr(16)x1,(1)(p31.1pter)x3,(14)(q31qter)x1 | небалансиран |

***Клиничен случай 9 - 46,ХУ, t(11;13)(p15;q12)***

Касае се за 31-годишна жена и 36-годишен мъж с полималформативно дете, починало седмица след раждането и тубарен стерилитет при жената. На починалото дете беше извършен цитогенетичен анализ, който показа наличие на допълнителна маркерна хромозома с неясен произход. След кариотипиране при родителите беше открита балансирана транслокация между хромозоми 11 и 13 при партньора - 46,ХУ, t(11;13)(p15;q12). Чрез PGT-SR бяха анализирани 13 ембриона, 4 от които се оказаха балансирани и 9 небалансирани (табл. 27). Последва ембриотрансфер и биохимична бременност, която завърши с раждане на здраво дете.

*Табл. 27. Резултати от PGT:*

| **Т.№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **1** | arr (11)(pterp15)x1,(13)(q12qter)x3 | небалансиран |
| **1 - 2** | arr(14)x1 | небалансиран |
| **1 - 3** | arr(14)x1 | небалансиран |
| **2** | arr(4)x1,(21)x3,(1)(p10pter)x3,(11)(p15qter)x3, (13)(pterq12)x1 | небалансиран |
| **3** | arr(11)(pterp15)x1,(13)(q12qter)x3 | небалансиран |
| **5** | arr(11)(p15qter)x1 | небалансиран |
| **6** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **7** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **8 - 1** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **8 - 2** | arr(11)(p15qter)x1,(13)x1 | небалансиран |
| **8 - 3** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **9** | arr(11)(pterp15)x1,(13)(q12qter)x1 | небалансиран |
| **10** | arr(11)(p15qter)x1 | небалансиран |

***Клиничен случай 10 - 46,XX,t(4;7)(q21;q11)***

Касае се за двойка с мъжки фактор за стерилитет – жена на 31 години и мъж на 33 години. Постнаталният хромозомен анализ установи патологичен кариотип при жената - балансирана транслокация между хромозоми 4 и 7 - 46,XX,t(4;7)(q21;q11). При двойката с PGT-SR бяха изследвани 3 ембриона, които се оказаха небалансирани по майчината транслокация (табл. 28). По настоящем двойката обмисля следващ ин витро опит.

*Табл. 28. Резултати от PGT:*

| **Т.№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **2** | arr(2)x1,(4)(pterq13)x3,(7)(q11qter)x3 | небалансиран |

| | | |
|---|---|---|
| 7 | arr(4)(pterq13)x3,(7)(pterq11)x1 | небалансиран |
| 6 | arr(4)(q21qter)x1,(7)(q11qter)x3 | небалансиран |

***Клиничен случай 11 - 46,ХУ,t(2;20)(q35;q11)***

Касае се за двойка с неизяснен стерилитет и един спонтанен аборт - жена на 35 години и мъж на 34 години. При партньора беше установен патологичен кариотип с балансирана транслокация между хромозоми 2 и 20 - 46,ХУ,t(2;20)(q35;q11). След медико-генетична консултация пациентите бяха насочени за процедура по ин витро оплождане с PGT-SR. Изследвани бяха 3 ембриона, един от които еуплоиден и 2 небалансирани (табл. 29). След извършения ембриотрансфер не беше установена биохимична бременност.

*Табл. 29. Резултати от PGT:*

| Т№ | Резултат от PGT | Коментар |
|---|---|---|
| 2 | arr(2)(q36.1q37.3)x3,(20)(q13.33q13.33)x1 | небалансиран |
| 4 | arr mos(X)x1 | небалансиран |
| 7 | arr(1-22,X)x2 | балансиран |

***Клиничен случай 12 - 46,XX,t(7;16)(q36;q13)***

Касае се за жена на 41 години и мъж на 40 години с дългогодишен стерилитет. Пациентите бяха насочени за постнатален хромозомен анализ, който показа наличие на патологичен кариотип с балансирана транслокация между хромозоми 7 и 16 - 46,XX,t(7;16)(q36;q13) при жената. Чрез PGT-SR беше изследван един ембрион, който се оказа небалансиран по транслокацията (табл. 30).

*Табл. 30. Резултати от PGT:*

| Т№ | Резултат от PGT | Коментар |
|---|---|---|
| 1 | arr(7)(pterq35x1),(16)(q21q24.3)x1 | небалансиран |

***Клиничен случай 13 - 46,XX,t(7;11)(p22;q13.1)***

Касае се за 34-годишна жена и 40-годишен мъж със стерилитет. При пациентката са установени ендометриоза, дисморфична матка и тубарен фактор. След стандартна процедура по кариотипиране беше открита балансирана транслокация между хромозоми 7 и 11 при партньорката - 46,XX,t(7;11)(p22;q13.1). Чрез PGT-SR бяха анализирани 4 ембриона, един от които балансиран и 3 небалансирани (табл. 31). Последва ембриотрансфер, но не беше отчетена биохимична бременност.

*Табл. 31. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **3** | arr(8)x1,(22)x3 | небалансиран |
| **4** | arr(7)(pterp21)x3,(11)(q22qter)x1 | небалансиран |
| **5** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **9** | arr(7)(pterp21)x3,(11)(q22qter)x1 | небалансиран |

***Клиничен случай 14 - 45,XY,t(13;14)(q10;q10)***

Касае се за двойка с репродуктивни неблагополучия, спонтанен аборт и отклонения в спермограмата при партньора – жена на 38 години и мъж на 41 години. При мъжа след цитогенетичен анализ беше установен патологичен кариотип с Робертсонова транслокация между хромозоми 13 и 14 - 45,XY,t(13;14)(q10;q10). Извършена беше ин витро процедура с PGT-SR на един ембрион, които се оказа небалансиран (табл. 32). Семейството обмисля следваща ин витро процедура.

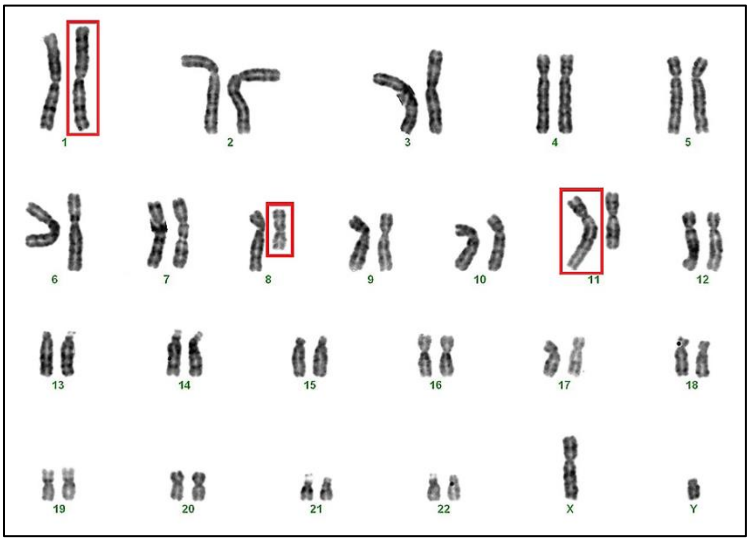
*Табл. 32. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **4** | arr(14)x1 | небалансиран |

***Клиничен случай 15 - 46,XY,t(1;8;11)(1qter→1p22::8q11.1→8qter)(8pter→8q11.1::11q22→11qter)(11pter→11q22::1p22→1pter)***

Касае се за двойка (27-годишна жена и 28-годишен мъж) с история за неизяснен инфертилитет и 4 неуспешни ин витро процедури. Пациентите са насочени за генетична консултация, след като при сестрата на мъжа е установено носителство на балансирана тройна транслокация между хромозоми 1, 8 и 11. Хромозомният анализ установява абнормен кариотип при мъжа - 46,XY,t(1;8;11)(1qter→1p22::8q11.1→8qter)(8pter→8q11.1::11q22→11qter)(11pter→11q22::1p22→1pter) – сложно хромозомно преустройство между хромозоми 1, 8 и 11 (фиг. 52).

*Фиг. 52. Сложно хромозомно преустройство между хромозоми 1, 8 и 11 – кариотип 46,XY,t(1;8;11)(1qter→1p22::8q11.1→8qter)(8pter→8q11.1::11q22→11qter)(11pter→11q 22::1p22→1pter):*

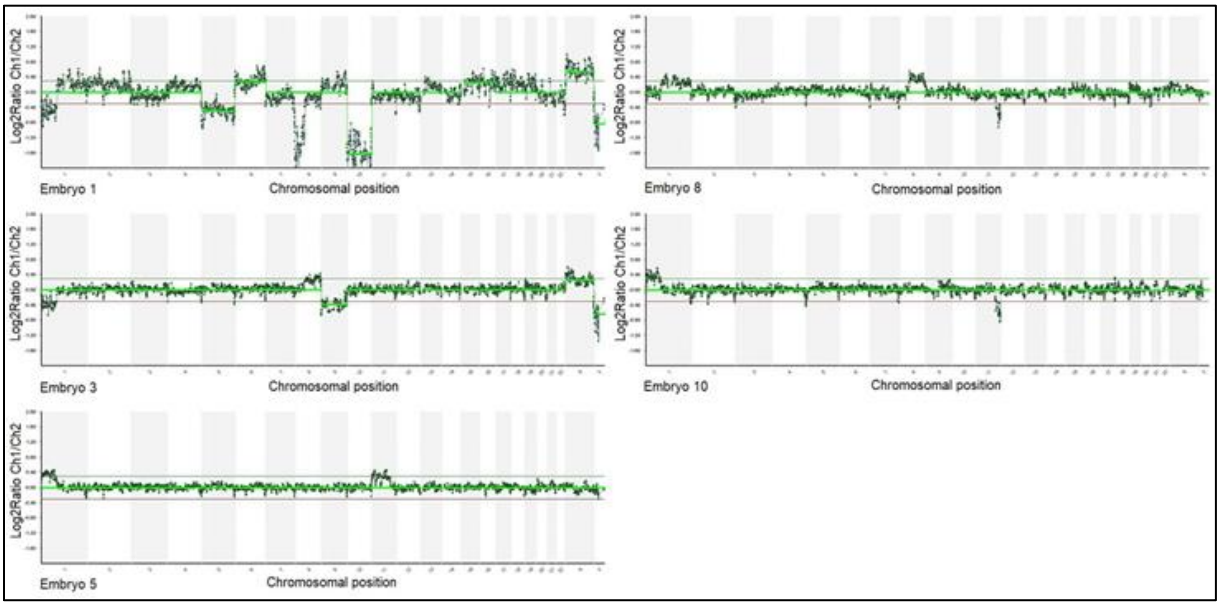



По дълъг протокол за стимулация на яйчниците бяха получени общо 9 яйцеклетки и беше извършена процедура ICSI със свежи сперматозоиди. Всички яйцеклетки бяха успешно оплодени и получените ембриони достигнаха етап бластомер. Беше размразен един ембрион на ден 3 от предишен ин витро цикъл. От общо 10 ембриона само 5 оцеляха до стадий бластоцист. От всички 5 ембриона, биопсирани за PGT, нито един не беше балансиран и не беше осъществен ембриотрансфер (табл. 33, фиг. 53). В момента семейството преминава втори IVF-PGT-SR цикъл.

*Табл. 33. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **Т1** | arr(5,10)x1,(6,15,16)x3,(1)(pterp22.1)x1, (8)(pterq12.1)x1 | небалансиран |
| **Т3** | arr(9)x1,(1)(pterp22.1)x1,(8)(q12.1qter)x3 | небалансиран |
| **Т5** | arr(1)(pterp22.1)x3,(11)(pterq22.3)x3 | небалансиран |
| **Т8** | arr(1)(p22.1qter)x3,(8)(q12.1qter)x3, (11)(q22.3qter)x1 | небалансиран |
| **Т10** | arr(1)(pterp22.1)x3,(11)(q22.3qter)x1 | небалансиран |

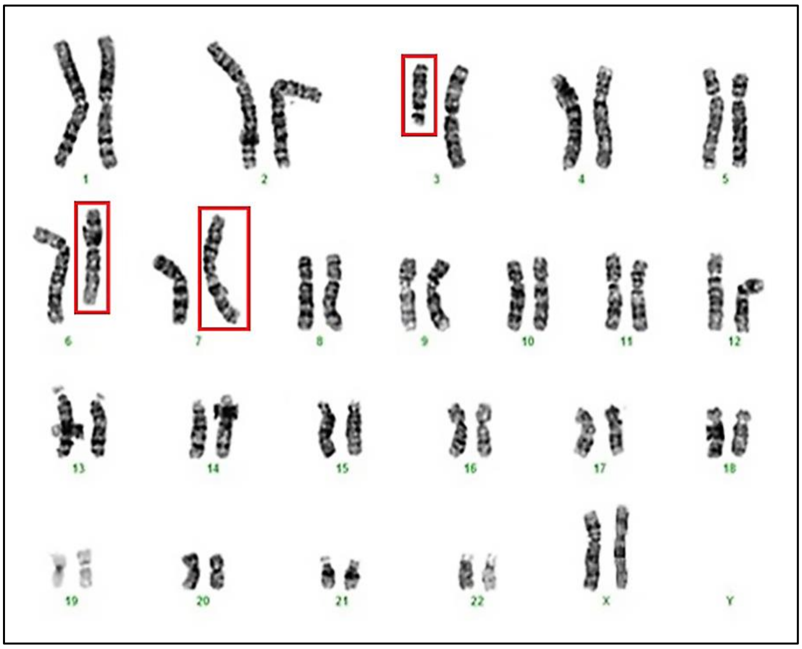
*Фиг. 53. Геномен профил на изследваните с PGT-SR ембриони.*




***Клиничен случай 16 - 46,XX,t(3;6;7)(3pter->3q13.2::7p22-<7pter;6pter->6q21::3q13.2->3qter;7qter->7p22::6q21->6qter)***

Касае се за двойка (жена на 35 години и мъж на 39 години) с анамнеза за две спонтанни загуби на бременността преди 12-та гестационна седмица. Причината и генетичният статус на абортивните материали бяха неизвестни. Липсваха данни за аномалия на матката или друго основно състояние, причина за неуспешна бременност. Цитогенетичният анализ беше извършен като част от стандартния протокол за клинична и лабораторна оценка на двойки с повтарящи се аборти. Хромозомният анализ разкри патологичен кариотип при партньорката - 46,XX,t(3;6;7)(3pter→3q13.2::7p22→7pter;6pter→6q21::3q13.2→3qter;7qter→7p22::6q21→6qter) – сложно хромозомно преустройство между хромозоми 3, 6 и 7 (фиг. 54).

*Фиг. 54. Сложно хромозомно преустройство между хромозоми 3, 6 и 7 – кариотип 46,XX,t(3;6;7)(3pter→3q13.2::7p22→7pter;6pter→6q21::3q13.2→3qter;7qter→7p22::6q21→6qter):*




Кариотипите на роднините на семейството от първа степен също бяха изследвани и беше установено, че първият братовчед на пробанда носи същата транслокация.

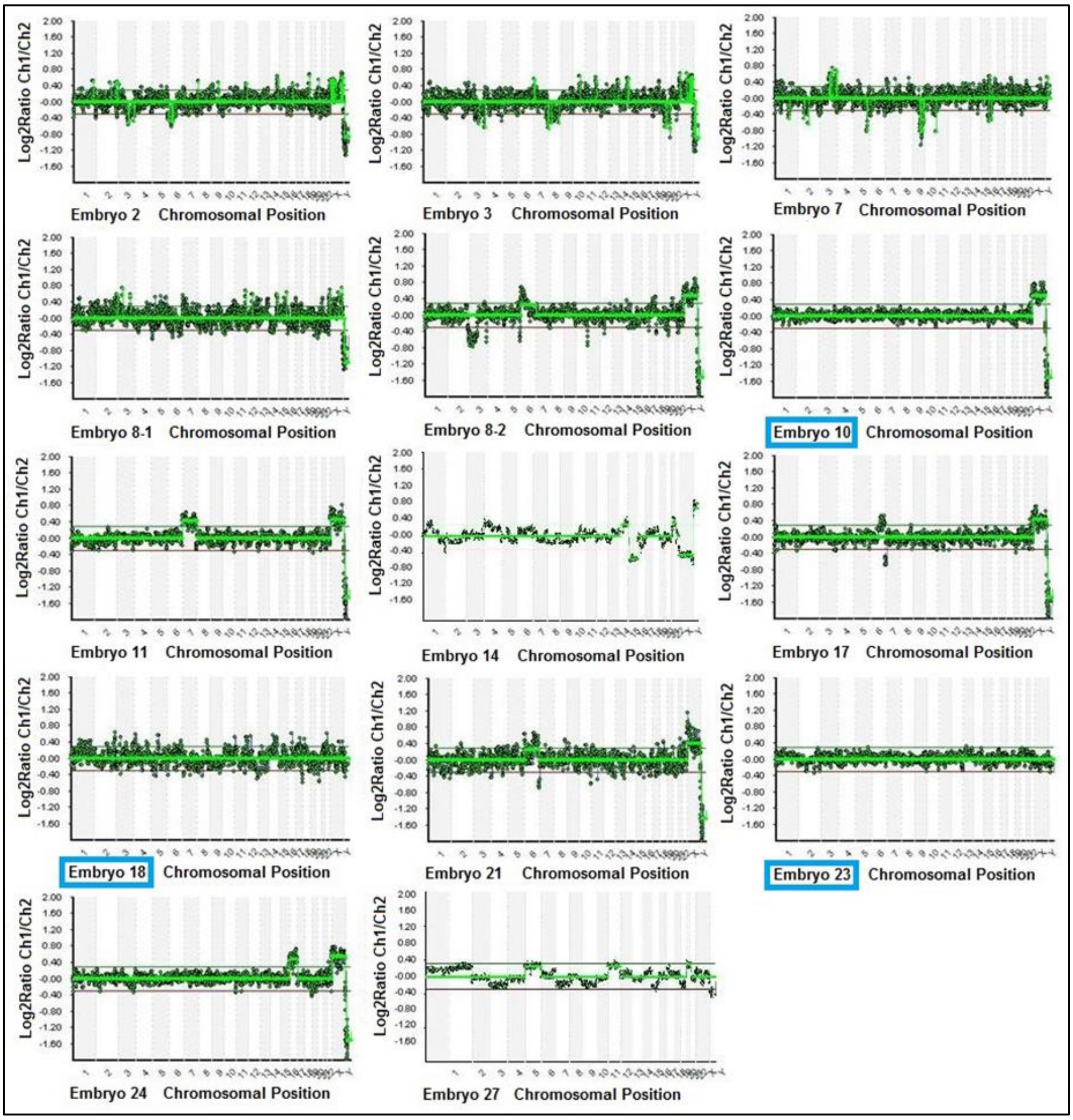
За период от две години бяха събрани общо 36 яйцеклетки чрез различни протоколи за стимулация на яйчниците или естествени цикли. Извършени бяха 14 процедури ICSI. Първите 4 цикъла доведоха до получаване на 9 яйцеклетки, които бяха оплодени, като 4 от тях стигнаха до стадий бластомер. Ембрионите бяха биопсирани на ден 3. Нито един от 4-те ембриона не беше балансиран. От следващите 10 ин витро цикъла бяха получени общо 27 зрели яйцеклетки. При размразяването на ооцитите оцеляха 25 от тях. Оцелелите яйцеклетки бяха успешно оплодени и всички 25 ембриони достигнаха ден 3. Само 10 ембриона достигнаха стадий бластоцист и бяха биопсирани. Резултатите показаха 3 балансирани и 7 небалансирани ембриони (табл. 34, фиг. 55). Два еуплоидни ембриона бяха прехвърлени на 6-ия ден след оплождането. Третият балансиран ембрион беше замразен за евентуален бъдещ трансфер.

Реализирана беше едноплодна бременност. Двойката беше посъветвана да проведе пренатална диагностика като част от стандартната процедура PGT за проследяване, но пациентката отказа да се подложи на амниоцентеза. След нормално протекла бременност чрез цезарово сечение поради медицински коморбидности на майката (тревожност и депресия, тиреоидит на Хашимото, коагулопатия, разширени вени и напреднала възраст на майката - 35 години) беше родено здраво дете от мъжки пол с нормален фенотип и без видими вродени аномалии. Кариотипирането показа нормален мъжки кариотип 46, XY.

*Табл. 34. Резултати от PGT:*

| **Т№** | **Резултат от PGT** | **Коментар** |
|---|---|---|
| **Т2** | arr(3)(q13.2qter)x1, (6)(pterq21)x1 | небалансиран |
| **Т3** | arr(8)x1,(20)x1,(3)(q13.2qter)x1 | небалансиран |
| **Т7** | arr(3)(q13.2qter)x3,(9)(q21.33qter)x1 | небалансиран |
| **Т8-1** | arr(6)(q22qter)x1,(7)(pterp22)x3,mos(14)x1 | небалансиран |
| **Т8-2** | arr(3)(pterq13.2)x1,(6)(pterq21)x3 | небалансиран |
| **Т10** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **Т11** | arr(7)x3 | небалансиран |
| **Т14** | chaotic mosaic | небалансиран |
| **Т17** | arr(6)(q22qter)x3,(7)(pterp22)x1 | небалансиран |
| **Т18** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **Т21** | arr(6)(q22qter)x3,(7)(pterp22)x1 | небалансиран |
| **Т23** | arr(1-22)x2 | балансиран |
| **Т24** | arr(16)x3 | небалансиран |
| **Т27** | chaotic mosaic | небалансиран |

*Фиг. 55. Геномен профил на изследваните с PGT-SR ембриони:*




## 9. Критерии за трансфер на приоритетни ембриони

Разработени са критерии за трансфер на приоритетни ембриони въз основа на литературна справка (табл. 35) (206). С приоритет се препоръчва трансфер на еуплоидни ембриони при наличие на такива. При липса на еуплоиден ембрион след медико-генетична консултация може да се пристъпи към трансфер на мозаичен.

Ембрионите се категоризират в четири групи въз основа на генетичния им статус. Към първа група влизат еуплоидните ембриони. Втора група включва ембриони с една или две анеуплоидии под 50% (тризомия на 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 22 или монозомия на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21 хромозоми) или една сегментна анеуплоидия под 50% (хромозоми 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 19, 20, 22). В трета група са включени ембриони с една или две анеуплоидии над 50% (тризомия на хромозоми 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 17, 19, 20, 22 или монозомия на хромозоми 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21). В четвърта група влизат ембриони с една или две мозаични анеуплоидии (тризомии по хромозоми 2, 13, 18, 21, 14, 15, 7, 11, 16 или монозомии по хромозоми 14, 15, 7, 11); една сегментна анеуплоидия над 50% или една сегментна анеуплоидия под 50% за хромозоми 13, 18, 21, 14, 15, 7, 11; ембриони с пълна анеуполидия; хаотични мозайки и ембриони с няколко мозаични анеуплоидии.

При липса на еуплоидни ембриони се пристъпва към трансфер на ембриони от втора или трета група (като втора група са с приоритет). Ембрионите от четвърта група не се препоръчват за транфер.

Според литературни данни, процентът на живо раждане и ранен аборт при трите групи годни за трансфер ембриони е следният: 47% и 8% за първа група; 40% и 6.80% за втора група; 15% и 9.10% (207).

*Табл. 35. Критерии за трансфер на приоритетни ембриони:*

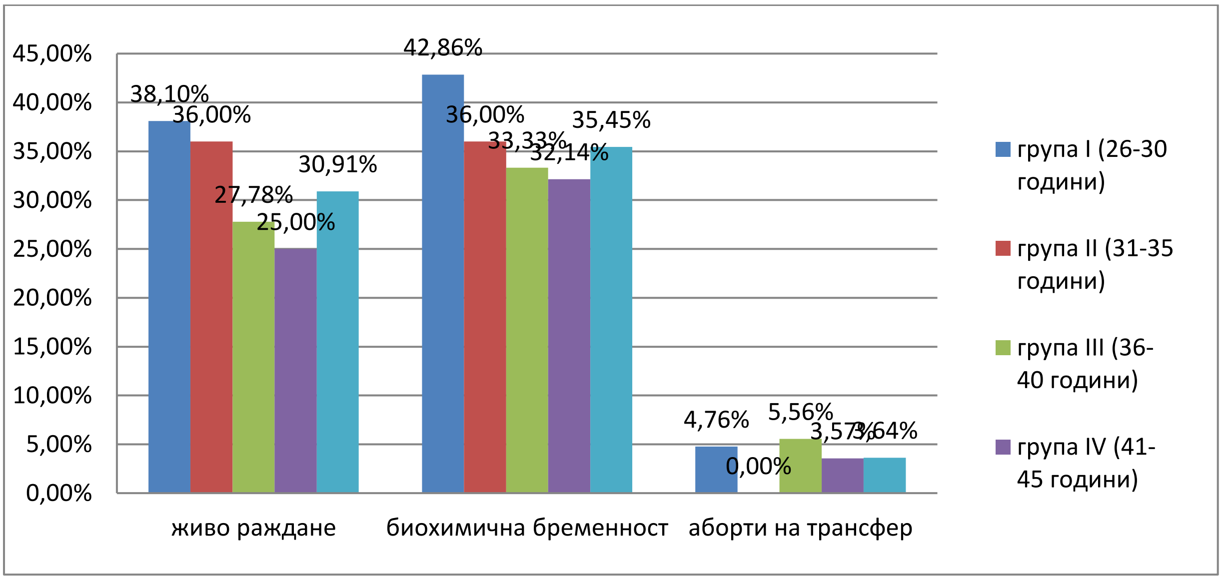
| | Трансфер |
|---|---|
| **група I** | **да** |
| еуплоидни ембриони | |
| **група II** | **да** |
| 1 или 2 анеуплоидии под 50% | |
| тризомия 1,3,4,5,6,8,9,10,12,17,19,20,22 | |
| монозомия 1,2,3,4,5,6,8,9,10,12,13,16,17,18,19,20,21 | |
| 1 сегментна анеуплоидия под 50% | |
| хромозоми 1,2,3,4,5,6,8,9,10,12,16,17,19,20,22 | |
| **група III** | **да** |
| 1 или 2 анеуплоидии над 50% | |
| тризомия 1,3,4,5,6,8,9,10,12,17,19,20,22 | |
| монозомия 1,2,3,4,5,6,8,9,10,12,13,16,17,18,19,20,21 | |
| **група IV** | **не** |
| 1 или 2 анеуплоидии мозаични: | |
| тризомия 2,13,18,21,14,15,7,11,16 | |
| монозомия 14,15,7,11 | |
| 1 сегментна анеуплоидия над 50% | |
| 1 сегментна анеуплоидия под 50% за 13,18,21,14,15,7,11 | |
| пълна анеуполидия | |
| complex mosaic | |
| complex aneuploid | |

## 10. Процент на живо раждане, биохимична бременност и спонтанни аборти при пациентките в проучването

Ембриотрансфер беше осъществен при 40.54% от 185 пациентки в проучването. При 35.45% от жените с извършен трансфер беше установена биохимична бременност. Процентът на спонтанна загуба на бременността при жените от всички възрастови групи беше 3.64%. При 30.91% от всички жени с осъществен ембриотрансфер беше достигнато до живо раждане.

Процентът живо раждане, биохимична бременност и спонтанни аборти беше разпределен по възрастови групи. Първата група (26-30 години) имаше най-голям брой биохимични бременности и живо раждане от всички възрастови групи – съответно 42.86% и 38.10%. Спонтанна загуба на бременността се наблюдаваше в 4.76% от случаите. Във втората възрастова група (31-35 години) при нито една от жените не настъпи спонтанен аборт. Процентите на биохимична бременност и живо раждане бяха 36.00% - по-малък процент от данните в първата група. Група III (36-40 години) заемаше трето място по процент на биохимични бременности и раждане – съответно 33.33% и 27.78%. Аборт настъпи при 5.56% от пациентките. Най-малък процент на реализиране на бременност и живо раждане са наблюдаваше в четвърта възрастова група, в която жените бяха с най-напреднала възраст (41-45 години) – съответно 32.14% и 25.00%. Спонтанна загуба на бременността се наблюдаваше в 3.57% от случаите (фиг. 56).

*Фиг. 56. Проценти на живо раждане, биохимична бременност и спонтанни аборти при различните възрастови групи:*



# ОБСЪЖДАНЕ

## 1. Подбор на метод за PGT

Настоящите препоръки подкрепят използването на PGT технологии, които оценяват статуса на всички 23 хромозомни двойки на стадий бластоцист чрез биопсия на трофектодерм (208). Най-често използваните методи за предимплантационен генетичен тест са SNP array, qPCR, aCGH и NGS. Те се различават по отношение на геномното покритие, способността за откриване на небалансирани транслокации, частични анеуплоидии, полиплоидия и мозаицизъм. Всеки от методите има предимства и недостатъци. SNP array, aCGH, и NGS изискват цялостна амплификация на геномната ДНК, което потенциално може да доведе до артефакти. Array CGH може да идентифицира анеуплоидии, небалансирани транслокации, частични анеуплоидии и мозаицизми, но не може да детектира унипарентални дизомии и полиплоидии (162, 208, 209). SNP array може да открие небалансирани транслокации, частични анеуплоидии, унипарентални дизомии, но може да идентифицира мозаицизмите само при наличен значителен брой трофектодермални клетки (208). От друга страна, qPCR не използва цялостна геномна амплификация и може да идентифицира анеуплоидии по бърз начин, но има по-ниско геномно покритие, не е в състояние да различи малки делеции и дупликации и не може да открие структурни хромозомни аберации или мозаицизми (210). NGS е най-новата платформа за PGT – техниката идентифицира небалансирани транслокации, частични анеуплоидии и подобрява откриването на мозаицизми (211, 212). NGS притежава висока чувствителност на за откриване на минимални количества линии в смесени клетъчни популации, следователно може да детектира по-ниски степени на мозаицизъм в сравнение с aCGH (213).

Редица данни в научната литература доказват големите предимства на array CGH за PGT: много по-големи разделителна способност, позволяващи идентифициране на нови микроструктурни преустройства; разкриване на ниско-степенни мозаицизми; доказване на хромозомен дисбаланс при привидно балансирани преустройства (214).

От своя страна NGS техниката има широко приложение като метод за предимплантационен тест на ембриони поради високата чувствителност и малко необходимото количество ДНК проба, което може да се получи при биопсия на бластомер или трофектодерм (205). В допълнение, методиката NGS предлага бързина, точност на резултата, скрининг на генома без необходимост от предварителна информация относно суспектната генетична аномалия. NGS е в състояние да генерира скоростно и икономически обосновано големи количества информация за последователността на ДНК. Технологиите, базирани на секвениране, са по-ефективни и се характеризират с по-голяма чувствителност от повечето други скринингови подходи, което им дава подобрена способност за откриване на аномалии, представляващи трудност за диагностициране с помощта на алтернативни техники (20).

Всички тези предимства на aCGH и NGS като техники за провеждане на предимплантационен генетичен тест обосноваха нашия избор да използваме тези две методики в настоящата ни разработка.

## 2. Подбор на техника за биопсиране

PGT изисква биопсия, която представлява инвазивна манипулация на ооцити, бластомери или бластоцисти и отнема време. Основна дилема са евентуалните щети, произтичащи от тази процедура. Биопсиите изискват добре обучени и опитни специалисти ембриолози и съответно увеличаване на ресурсите и разходите в лаборатории, в които се провежда PGT (215).

Стадият на биопсиране на яйцеклетките и/или ембрионите, подлежащи на за PGT, е обект на усилени дебати. Ефективността на биопсията на полярни телца е спорна, главно поради честотата на пост-зиготна анеуплоидия, която се реализира след диагностичното тестване (216-218). Основен довод на много изследователи срещу биопсията на ембриони на 3-ти ден е, че отстраняването на повече от една клетка в стадия на разцепване може да има пагубно въздействие за по-нататъчното развитие и жизнеспособност на ембриона, които да доведат до по-нисък процент на имплантация (219). В допълнение, наличието на единичен бластомер за анализ може да е причина за неубедителни или погрешни резултати (64, 220-222).

Днес е прието, че трофектодермалната биопсията има слабо влияние върху жизнеспособността на ембриона. Независимо от това, въздействието на биопсията не може категорично да се изключи нарушаването на имплантационния потенциал. Междувременно се изискват високи стандарти за култивиране на бластоцисти и криоконсервация, които представляват важни ограничаващи фактори за широкото прилагане на PGT.

При по-голямата част от настоящите ин витро цикли с PGT се прилага трофектодермална биопсия, което е в съответствие с неотдавнашен доклад на Европейското общество по човешка репродукция и ембриология (ESHRE), като тенденцията се увеличава особено през последните 5 години (223). Предимствата на биопсията на бластоцист са, че се предоставят повече от три бластомера за анализ. По този начин се преодоляват проблемите с отпадане на алела (ADO) и възможността за неуспешна амплификация на ДНК поради недостатъчен материал, които се срещат по време на полимеразната верижна реакция (224).

Наличието на повече клетки води до повишаване на диагностичната точност и до намаляване на риска от погрешна диагноза поради естественото явление мозаицизъм. Скорошен системен преглед от Van Echten-Arends et al. показа, че степента на хромозомен мозаицизъм на етап на разцепване е 72% (170). Fragouli et al. доказват, че по-малко от 6% от анализираните ембриони на стадий бластоцист са високостепенни мозайки (225).

Биопсията на стадий бластоцист може да бъде благоприятна поради значително по-големия брой клетки, които могат безопасно да бъдат премахнати, но от друга страна ограничава наличното време за генетичен тест поради необходимостта от трансфер на ембриона в матката на същия или на следващия ден (5-6 ден след оплождането). За да се извърши подробно и достоверно изследване, без ограниченията, които поставя времето при биопсия на 5-6 ден, ембрионите могат да бъдат замразени и да бъдат трансферирани на следващ ин витро цикъл (224).

Описани са тринадесет проучвания с PGT-A, различаващи се по техниката на биопсиране (седем проучвания с биопсия на ембриони на стадий разцепване, три - с първо и второ полярни телца и три - с биопсия на трофектодерм), които показват повишена степен на постигната бременност при трофектодермалната биопсия в сравнение с другите две техники (214, 223, 226-232).

Fragouli et al. сравняват клинични резултати от CGH PGT-A на полярното тяло и биопсия на трофектодерм при 32 жени в напреднала възраст и неблагоприятна прогноза (средна възраст 39,1 години), като също отчитат подобрен процент на реализирана бременност сред пациентите, при които е проведена трофектодермална биопсия (225).

В рандомизирано клинично проучване Scott et al. показват значително подобрени прогнозни стойности за имплантация при метода биопсия на трофектодерм в сравнение с бластомерната биопсия.

Chen et al. твърдят, че трофектодермалната биопсия е по-малко трудоемка и по-рентабилна в сравнение с биопсията на трети ден от развитието на ембриона (233). Възможността за прилагането на тази техника обаче зависи от способността на ембрионите да достигнат до 5-ти ден. Само 50-60% от ембрионите са в състояние да достигат този етап, което ограничава наличните за биопсия ембриони. В тези случаи обаче може да се твърди, че ембрионите, достигнали до стадий на бластоцист, са по-склонни да осъществят бременност и живо раждане, което е основната цел на пациентите, желаещи PGT (234).

В настоящата работа, поради висок риск от мозаицизъм на 3-тия ден от ембрионалното развитие, с цел по-малко нарушаване целостта на ембрионите и запазване на имплантационния им потенциал, беше предпочетено извършването на трофектодермална биопсия. Общо 493 от 497-те биопсирани ембриони бяха биопсирани на стадий бластоцист. В единичен случай беше проведена биопсия на стадий бластомер на четири от 14-те ембриона при пациентка с тройна транслокация.

Като алтернатива на биопсията на бластоцисти се разработват по-малко инвазивни техники. Много проучвания, фокусирани върху свободноклетъчната ДНК в бластоцела, показват противоречиви данни относно степента на сходство с клетките на трофектодерма и генетичния статус на ембрионите (53, 235-238).

Въпреки че неинвазивните стратегии изглеждат привлекателни методи за набавяне на генетичен материал за PGT, те се характеризират с някои ограничения, включително непълно представяне на целия ембрионален геном, потенциално замърсяване с ДНК на майката, лоша цялостност на нуклеиновата киселина, неизвестно време, необходимо за получаване на приемлива степен на амплификация (54). Необходими са допълнителни добре разработени проучвания, за да се оцени ефикасността на използването на свободноклетъчната ДНК за целите на PGT (177).

### 3. Обсъждане на причините за репродуктивни неблагополучия

Световната здравна организация определя инфертилитета като заболяване на репродуктивната система, дефинирано от невъзможността за постигане на клинична бременност след 12 или повече месеца на редовен полов акт при липса на контрацепция

(239). Предполага се, че над 5% от всички хетеросексуални двойки са засегнати от безплодие (240). Около 20–30% от случаите на безплодие се дължат на мъжки фактор, 20-35% на женски фактор, 25–40% на комбинация от мъжки и женски фактор, 10–20% на неясни причини (241, 242).

При по-голямата част от двойките, участници в настоящото изследване, причината за невъзможност за реализиране на бременност беше женски фактор (102 двойки, 55.14% спрямо всички причини за репродуктивни неблагополучия), следователно се наблюдава почти двукратно увеличена честота на женско безплодие спрямо международните данни. Мъжко безплодие беше причина при 37 от двойките (20.00%), което съответства на литературните справки. Съвкупност от проблеми, както при жената, така и при мъжа от двойката, бяха установени при 7 двойки (3.78% от всички двойки). Не беше установена ясна причина за репродуктивни неблагополучия при 39 двойки (21.08%).

Фертилитетът на жената се влияе от нейната възраст, като пикът му е в началото и средата на 20-те години, след което започва да намалява, като този спад се ускорява рязко след 35-годишна възраст (243). Много е вероятно преобладаването на женския фактор за инфертилитет в нашата извадка да се дължи на възрастта на пациентките - между 26 и 45 години (средна възраст 35.5 години), като 64.33% от тях са в напреднала възраст - над 35 години.

Безплодието при жените засяга около 48 милиона жени (241). Една трета от женския инфертилитет е причинен от тубарен фактор. Ендометриозата заема второ място като причина за безплодие с 25-30% (244). Честа причина за инфертилитет при жените са овулаторните проблеми, които се проявяват чрез оскъдни или липсващи менструални периоди (245). Синдромът на поликистозни яйчници (PCOS) засяга 2%-20% от жените на възраст между 18 и 44 години и е най-разпространеното ендокринно заболяване в тази възрастова група. При безплодие поради липса на овулация, PCOS е най-честият причинител (246-248). Синдромът на лутеинизиран неруптурирал фоликул (LUF) се наблюдава при 10% от менструалните цикли при фертилни жени. Според проучвания честотата на LUF при безплодни жени е от порядъка на 25–43% (249). Полипите на матката се откриват при 5% до 10% от безплодните жени. Отрицателен ефект върху фертилитета имат фиброми, които: са разположени в маточната кухина и са с диаметър повече от 6 cm; променят позицията на маточната шийка, формата на матката или блокират маточните тръби, затруднявайки достъпа на сперматозоидите и/или движението на яйцеклетките; ограничават притока на кръв към матката, нарушавайки възможността за имплантация на ембриона (250).

Всички горепосочени фактори за женско безплодие присъстваха при пациентките в нашето проучване, като най-разпространен беше тубарният фактор, който е и водещата причина за инфертилитет при жените според световните данни. Следващи по честота се подреждаха генетични причини – балансирани инверсии и транслокации (13.43%). Вероятно това се дължи на факта, че по-голямата част от двойките, участници в проучването, са преминали стандартна процедура по кариотипиране като подготовка за ин витро процедура с PGT и са установени 9 двойки (4.86% от всички двойки в проучването), при които жената е носителка на балансирана транслокация. Донорство на яйцеклетки беше застъпено сред ин витро процедурите с PGT поради напредналата възраст на много от пациентките в разработката. Останалите фактори на безплодие (ендометриоза, полип на матката, преждевременна яйчникова недостатъчност, лутеинизиран неруптурирал фоликул) заемаха по-малки проценти.

Мъжкото безплодие най-често се дължи на дефекти в броя, качеството, подвижността, морфологията и жизнеспособността на сперматозоидите, а качеството на еякулата се използва за определяне на мъжкия фертилитет (251). Преобладаващата част от мъжете с инфертилитет в нашата извадка (79.31%) имаха отклонения в спермограмата, което съответства на литературните данни.

В своя извадка Ugwuja et al. откриват, че болшинството от изследваната от тях мъжка популация има нисък брой сперматозоиди (70%), със значително висока честота на дефекти (64%) - почти аналогичен процент на данните от нашето проучване. Астенозооспермията и тератозооспермията са основните регистрирани аномални параметри. По-голямо разпространение на олигозооспермията е установено при възрастовата група 31-40 години (съответно 74% и 75%).

Butt et al. разглеждат извадка от 396 пациенти, от които при 293 (73,99%) се наблюдава нормозооспермия, при 59 (14,89%) азооспермия и при 44 (11,11%) олигозооспермия. Астенозооспермия се наблюдава при 37 (25,81%) мъже, тератоспермия при 11 (3,26%) и олигоастенотератозооспермия при 4 (9,09%) (252).

Ikyernum et al. изследват 600 мъже в репродуктивна възраст, като установяват, че относно концентрацията 52,5% от мъжете имат нормозооспермия, 8,2% азооспермия и 39,3% олигозооспермия. Морфологията на сперматозоидите детектира 57,7% тератозооспермия и 42,3% нормозооспермия. Разборът на подвижността на сперматозоидите показва, че в повече от половината случаи се наблюдава 58,0% астенозооспермия в сравнение с 42,0% нормозооспермия (253).

Най-чести отклонения в спермограмата при пациентите в нашето проучване бяха астенозооспермия, тератозооспермия и олигозооспермия, подобно на изследванията на Ugwuja et al., Butt et al. и Ikyernum et al.

При мъжете генетични причини бяха отговорни за 20.69% от случаите на инфертилитет. Вероятно, както и при пациентките в нашата разработка, това се дължи на факта, че по-голямата част от участващите двойки са преминали стандартна процедура по кариотипиране като подготовка за IVF-PGT процедурата и са установени 7 случая на носители на балансирани хромозомни преустройства при представителите от мъжки пол (3.78% от всички двойки в проучването) – 6 балансирани транслокации и една инверсия.

## 4. Обсъждане на хромозомните аберации

В настоящото проучване бяха изследвани общо 497 ембриони от 231 ин витро цикъла. Резултатите от PGT показаха 196 балансирани (39.44%), 292 небалансирани (58.75%) и 9 неинтерпретабилни (1.81%). Наблюдаваха се както бройни, така и структурни хромозомни аберации.

***Сегментни хромозомни аберации***

Сегментните анеуплоидии се срещат при 6% от установените бременности, които завършват със спонтанен аборт. Сегментните аберации, които са съвместими с живо раждане, се наблюдават в около 0,05% от неонаталната популация и обикновено са свързани с редица вродени аномалии при засегнатите деца (254-258).

Установяването на вътрехромозомни сегментни аберации е от съществено значение за PGT, независимо от факта, че честотата, типът, големината на ДНК-последователностите и хромозомното разпределение на тези промени не са добре изучени. Според литературни данни разпространението им варира между 4 и 58% в предимплантационните ембриони (259).

Zhang et al. изследват 1014 бластоцисти, получени от 1220 цикъла с PGT, от които 617 (60.8%) са еуплоидни, а останалите 397 (39.2%) са небалансирани. Сегментните анеуплоидии се нареждат на трето място по честота (16.9%) след сложните хромозомни анеуплоидии, тризомиите, монозомиите. Най-честите сегментни аберации са на хромозоми 8, 5, 7 и 4, чиито дял възлиза на 45,3%, което е в съответствие с предишно проучване (260). Превес взимат делециите с 71.6%, а дупликации се срещат в 28.4% от сегментните анеуплоидии (261).

Escriba et al. правят ретроспективно проучване на 822 цикъла с PGT, извършени върху 3565 бластоцисти, биопсирани между 2016 г. и 2017 г. Четиридесет и шест процента от бластоцистите са еуплоидни, като честотата варира значително в зависимост от индикацията за PGT. Останалите бластоцисти са диагностицирани като абнормни (53.5%). При 45.2% от бластоцистите една (29.2%) или повече (16.0%) цели хромозоми са анеуплоидни. При 8.4% от бластоцистите е налична сегментна анеуплоидия, засягаща една или повече хромозоми. Дупликациите се срещат с малко по-ниска честота от делециите (44.0% спрямо 56.0%). Не се наблюдават частични аберации на Y хромозомата. Сегментите, включени в преустройствата, преобладават в средно големи метацентрични или субметацентрични хромозоми и по-специално в q-раменете. Според авторите честотата на сегментните хромозомни аберации е топографски зависима и не е свързана с клинични или ембриологични фактори, а с качеството на трофектодерма. Сегментните анеуплоидии може да бъдат причинени от хромозомна нестабилност в отговор на хромотрипсис, да са възникнали в резултат от неточности при извършване на биопсията (262).

Babariya et al. изследват 1327 бластоцисти от 635 ин витро пациенти с индикации за PGT напреднала възраст на майката или предишни неуспешни IVF опити. Те установяват, че честотата на сегментните анеуплоидии е 15,6%. Някои сегментни аберации имат мейотичен произход, но повечето изглежда се появяват през първите няколко митотични деления след оплождането. Интересно е, че местата на счупване на хромозомите, свързани със сегментната анеуплоидия, не са напълно случайни, а са склонни да се проявяват в отделни хромозомни области. Някои от идентифицираните „hot spot” места съответстват на известни чупливи места, докато други могат да се считат за de novo и могат да бъдат специфични за гаметогенезата и/или ембриогенезата (256).

Данните, получени от нашето проучване при пациентите с нормален кариотип, показаха наличие на структурни аберации при 18 небалансирани ембриона (6.16%), малко по-ниска честота от данните от предните три проучвания (16.9%, 8.4% и 15.6%) (Babariya et al., Escriba et al. и Zhang et al.) (256, 261, 262).

Увеличението на честотата на сегментни аберации при всички 497 излследвани ембриони в настоящата работа се дължи на включването на 16 пациенти с балансирани хромозомни преустройства (15 носители на балансирани транслокации и 1 носител на инверсия). От всички 79 ембриони, съдържащи структурни аберации, 77.22% бяха на двойки, при които единият партньор е носител на балансирано хромозомно преустройство. От всички 97 абнормни ембриони при пациентите с патологичен кариотип близо 2/3 бяха засегнати от майчиното/бащиното хромозомно преустройство, и само 1/3 нямаха връзка с фамилното преустройство.

От всички сегментни анеуплоидии, 13.92% бяха дупликации и 34.18% делеции, а повече от половината от ембрионите съдържаха комбинации от дупликация и делеция (51.90%). Съотношението на дупликациите и делециите, при което има превес на частичните монозомии, е в съответствие с данните, получени от Escriba et al. и Zhang et al (261, 262).

Степента на хромозомна нестабилност при човешки преимплантационни ембриони обикновено наподобява тази при неопластичните промени. Някои биологични характеристики като бърза кинетика, къс клетъчен цикъл, релаксация на контролни точки в митозата и нарушена регулация на механизмите за апоптоза, се появяват както в неопластичните, така и в ембрионалните клетки. Споменатите характеристики са от решаващо значение за постигане на оптимален размер и морфология на предимплантационните ембриони (263, 264). Сравнително нов феномен, известен като хромотрипсис, се изтъква като потенциална причина за сегментните хромозомни дисбаланси в предплантационните ембриони (265, 266). Хромотрипсисът е едноетапно събитие, при което в една или няколко хромозоми се появяват двойни разкъсвания. Тези разкъсвания генерират хромозомни фрагменти, които могат да бъдат свързани по време на следващите интерфази, образуващи производни хромозоми и допълнителни малки ацентрични или дицентрични фрагменти (267, 268). При бърза клетъчна кинетика, характерна за предимплантационните ембриони, такива хромозомни фрагменти могат да бъдат съединени отново чрез неточни механизми за ДНК репарация (хомоложна рекомбинация и свързване на нехомоложни краища). По време на диакинезата ацентричните хромозоми, при които липсват правилни кинетохори, са неспособни да сегрегират правилно и се предават на случаен принцип в дъщерните клетки през следващите ембрионални деления (269).

Клиничното значение на частичните хромозомни делеции/дупликации не е известно, тъй като епидемиологичните данни за новородени са оскъдни и фрагментарни. Разпространението на сегментните аберации в общата популация много често остава нерегистрирано, тъй като повечето цитогенетични анализи на абортивни материали или новородени се извършват с помощта на техники с ниска разделителна способност (кариотип или неинвазивни NGS-базирани протоколи). Новите данни, основани на междулабораторни тестове и проспективни изследвания, са от съществено значение за определяне на критерии в кои случаи да бъде извършен ембриотрансфер със засегнати ембриони, особено в екстремни ситуации, при които е наличен само един ембрион, носещ сегментна аберация (262).

Хромозомните анеуплоидии в човешките ооцити и предимплантационни ембриони са чести, като разпространението им нараства с напредване на възрастта на майката – с дял от около 25% в средата на 20-те години до над 65% над 40-годишна възраст (147, 160). За разлика от мейотичната анеуплоидия, която обикновено засяга цели хромозоми и показва силна връзка с напредване на възрастта на жените, не се наблюдава корелация между възрастта и честотата на сегментни аномалии в яйцеклетките или ембрионите (147, 270).

Спорно е дали откритите след PGT сегментни анеуплоидии са представителни за статуса на бластоцисти след естествено зачеване или са свързани с инфертилитета на пациента, стимулацията на яйчници и култивирането на ембриони. Известно е, че de novo сегментни аберации се наблюдават с ниска честота при естествена бременност (271). Въпреки това, тези небалансирани хромозомни преустройства често са летални и засегнатите ембриони най-вероятно се губят в началните стадии на развитие (256).

***Бройни хромозомни аберации***

Анеуплоидията е често срещана и се предполага, че е естествено явление при ранните човешки ембриони (272). Мета-анализ на изследвания върху човешки ембриони през 2011 г. съобщава, че 73% от всички ембриони, получени чрез ин витро процедура, съдържат анеуплоидни клетки (170, 273). Смята се, че приблизително 20% от човешките ооцити и 9% от човешките сперматозоиди са анеуплоидни (274). Около 25% от наблюдаваната анеуплоидия се дължи на грешки в мейозата (275).

Обстоятелствата, допринасящи за неправилното разпределение на хромозомите по време на мейозата при мъжете, не са добре разбрани (276). Доказано е, че грешките в анафазата при мейоза I, или мейоза II се появяват по-често с напредване на възрастта на майката (277). Някои изследвания, предполагат, че протоколите за индукция на овулация, използвани при стандартните ин витро процедури, могат да засилят честотата на мейотичните грешки в ооцитите, като по този начин вторично увеличават анеуплоидията в получените ембриони (185, 275). Смята се, че анеуплоидиите, възникващи по време на първите митотични деления, които следват оплождането, представляват по-голямата част от анеуплоидията, наблюдавана при предплантационните човешки ембриони (272).

Munne et al. изследват 549 бластоциста и установяват, че повече от половината от анеуплоидните събития са монозомии (58%), а 42% са тризомии. Авторите доказват, че хромозомите, които най-често участват в анеуплоидии, са хромозоми 22 (6,6%), 16 (5,2%), 21 (4,7%) и 15 (4,7%). Най-чести са монозомиите на хромозоми 21, 16 и 22 (съответно 19.62%, 18.3%, 16.77%) и тризомиите на същите хромозоми (18.88%, 17.16% и 15.45%). Хромозомите, които най-малко участват в анеуплоидии, са 6 (1,5%), 14 (1,1%), X и Y (1,2%). Наблюдението, че хромозома 16 е по-малко ангажирана от 22 в анеуплоидии, може да бъде свързано с напреднала възраст на жените в проучването. Хромозома 22 е най-податлива на неразделяне от всички хромозоми, независимо от възрастта на майката. В допълнение, увеличението на анеуплоидията с възрастта на майката не е същото за всички хромозоми - 15, 16, 21 и 22. Анеуплоидиите на хромозоми 16 и 22 имат почти линейно увеличение, докато анеуплоидиите на хромозоми 15 и 21 имат по-експоненциален модел (278).

Zhang et al. изследват 1014 бластоцисти, получени от 1220 цикъла с PGT, от които 617 (60.8%) са еуплоидни, а останалите 397 (39.2%) са небалансирани. Най-чести са сложните хромозомни анеуплоидии (повече от две хромозомни аберации или повече от два вида аберация), следвани от тризомии, монозомии и сегментни анеуплоидии, съответно 27.9%, 27.7%, 22.2% и 16.9%. Най-разпространените анеуплоидии включват хромозоми 22 (24.9%), 16 (13.9%) и 21 (12.0%). Не са открити анеуплоидии на хромозоми 1 и 10. Най-чести монозомии се срещат на хромозоми 22 (31.5%), 16 (12.0%) и 21 (12.0%). Най-разпространени са тризомиите на същите хромозоми 22 (19.7%), 16 (15.4%) и 21 (12.0%) (261).

Редица други проучвания потвърждават, че хромозоми 22, 16 и 21 са най-податливи на тризомии в стадия на бластоцист (258, 260, 278, 279). Още в средата на 90-те години Jamieson et al. изследват 178 ембриона и доказват, че тризомия 16 е най-честата аномалия сред небалансираните ембриони (280).

Установено е, че монозомията е по-честа от тризомията (281). Теоретично неправилното разделяне по време на мейозата би трябвало да формира дизомични и нулизомични гамети със същата честота. Неравното разпределение между монозомиите и тризомиите може да обясни с алтернативен механизъм за анеуплоидия, например забавяне на митотичната анафаза по време на първото митотично деление или загуба на хромозома по време на мейозата (282). По този начин до 20% от анеуплоидиите могат да се дължат на загуба на хромозоми преди или по време на първото митотично деление, следователно е възможно излишъкът от монозомии да се формира в ооцитите, не чрез неправилно разделяне, а чрез други механизми като изоставане в анафазата или хромозомно отлепване от метафазната пластинка (283).

В настоящия дисертационен труд бройни хромозомни промени бяха установени при 261 ембриони (89.38% от всички небалансирани ембриони). Най-често срещана беше пълната монозомия (34.10%), следвана от пълната тризомия (25.67%) и комбинация от наличие на монозомия и тризомия (21.84%). Процентното разпределение на монозомии и тризомии съответства на наблюдавания превес в полза на монозомиите от Marquez et al., Ford et al. и Hunt et al. (281-283).

При детайлното разпределение на хромозомите, участващи в анеуплоидии, беше установено, че най-честите хромозомни анеуплоидии, които отговаряха за 32.98% от всички анеуплоидии, засягаха хромозоми 14, 15, 16, 21 и 22. Най-честа беше бройната промяна в хромозома 16, която заемаше 10.99% от случаите, непосредствено следвана от хромозома 22 (9.12%) и хромозома 21 (7.24%). Най-разпространена монозомия сред изследваните ембриони беше монозомия на хромозома 21 (11.60% от всички монозомии), последвана от монозомия на хромозома 16 (10.50%). При тризомиите водеща беше тризомия на хромозома 16 (11.46%), следвана от тризомия на хромозоми 15 (9.38%) и 21 (7.81%). Тези данни са сходни с множество проучвания, включително горепосочените, като изводът е, че хромозоми 16, 21 и 22 са най-често застъпените в анеуплоидии (258, 260, 261, 278-280).

Проучвания при сперматозоиди показват, че тризомия 22 е значително по-честа от останалите, въпреки че този факт не може да обясни високите проценти на тризомия 22, открити в ембрионите (284). Спектрални проучвания на кариотипите при свежи неисеминирани ооцити също показват, че хромозома 22 има най-висока честота на анеуплоидия, следвана от останалите по-малки хромозоми, като повечето от откритите анеуплоидии произхождат от преждевременно разделяне на хроматиди (285). Sandalinas et al. твърдят, че дегенерацията на яйцеклетки при по-възрастни жени може да се дължи на дефицитен синтез на белтъци, както предполагат и Steuerwald et al. (286). По този начин се засягат белтъците, които поддържат кохезията между сестринските хроматиди (287, 288). Всяко нарушаване на равновесието на тези белтъци, специфични за мейозата, може да доведе до преждевременното разделяне на хроматидите и колкото по-малки са хромозомите, толкова по-често субоптималната кохезия може да доведе до допълнително разделяне по време на второто мейотично делене. Например, дисталната хиазма предразполага към неразделяне на хромозома 21, вероятно защото има по-слаба кохезия (289). Установено е също, че хромозомите от групи E и G имат най-висок процент на анеуплоидия, предимно свързан с нарушения в разделянето на хроматидите (290).

## 5. Анеуплоидии, напреднала възраст и PGT-A

Още през 80-те и 90-те години на миналия век е установена връзка между честотата на анеуплоидиите и възрастта на жената. При жените рискът за зачеване с ембрион с тризомия се увеличава от 1.9% при 25-29 годишните до 19.1% при 35-39 годишните (291). Честотата на анеуплоидиите на хромозоми 13, 18, 21 се увеличава от 1.3% при 35-39 годишни жени на 4.3% при тези над 40-годишна възраст (292).

Възрастта на майката е тясно свързана с нарастващата честота на анеуплоидия в яйцеклетките, особено при жени над 40-годишна възраст, при които анеуплоидията достига 60%. Mastenbroek et al. отчитат, че при яйцеклетки на млади фертилни жени се наблюдава ниска степен на анеуплоидия (3%) (293).

Анеуплоидията намалява шанса на ембрионите за имплантация и увеличава риска от аборт. Дори при ембриони с нормална морфология може да се наблюдават хабитуални аборти и повтарящ се имплантационен неуспех. Съществуват множество проучвания, целящи да изтъкнат ползите или неутралността на предимплантационната генетична диагностика или скрининг именно в тези случаи. Резултатите от различните изследвания са противоречиви. Според някои автори се наблюдава подобрение на резултатите след използване на PGT-A (151-157), докато други не откриват нарастване на имплантационния потенциал и процента живи раждания (294-298).

Верлински и сътрудници доказват в свое проучване, че PGT представлява важна техника за оценка на ембриони за генетични и хромозомни болести като небалансирани транслокации, генетични болести с Менделов тип на унаследяване и HLA-типизиране. Те твърдят, че техниката PGT-A увеличава ембрионалния имплантационен потенциал, намалява процентът спонтанни аборти, но въпреки това не успява да подобри процента живородени деца (297, 298).

Carp et al. посочват, че PGT може да бъде по-ефективен при по-възрастни пациенти, тъй като ембриони с анормални кариотипи се наблюдават по-често при тази група пациенти. Авторите демонстрират, че PGT-A може да подобри резултатите от бременността при пациенти, които имат хабитуални спонтанни аборти, произтичащи от анормални ембриони (299).

Bielanska et al. (2002a) изследват 216 ембриона и също установяват връзката между дяла на анеуплоидиите и напредналата майчина възраст. С напредване на възрастта анеуплоидиите на хромозоми 22, 16, 15 и 21 значително зачестяват (300).

Marquez et al. анализират 1255 ембриона, 731 от които са нежизнеспособни. Установяват, че анеуплоидията се увеличава с възрастта на майката - от 3,1% при пациентки на възраст 20-34 години до 17% при пациентки над 40 години. Този ефект се дължи най-вече на анеуплоидия на хромозома 21, но честотата на анеуплоидии на хромозоми 16 и 18 също е значително по-висока при жени над 40 години (281).

В съответствие с горепосочените данни, в нашата разработка се наблюдаваше повишаване на бройните хромозомни промени с нарастване на възрастта на пациентките. Най-младите пациентки (26-30 години, група I) имаха най-нисък процент на анеуплоидия (52.31%), като с напредване на възрастта на жените, се увеличаваха анеуплоидиите – съответно в нарастващ ред на възрастовите групи: група II – 52.38%, група III – 54.09% група IV – 71.01%. Нарастването на бройните хромозомни промени беше плавно между първите три групи, но рязко се покачи в четвъртата – групата на 41-45 годишните. Много автори са установили, че именно над 40 годишна връзка се наблюдава скок на анеуплоидиите (281, 292, 293, 300).

Тринадесет научни проучвания изследват клиничните резултати от приложението на PGT-A при пациентки в напреднала възраст (средна възраст 35 години) (214, 226-229, 231, 232, 301-307). Контролната група се състои от пациенти, чиито ембриони са подбрани въз основа на морфологична оценка. Всички проучвания демонстрират подобрен процент на имплантация в PGT-A групата спрямо контролната група. Schoolcraft et al. съобщават за успешна имплантация в 68,9% от случаите на ембриотрансфер след PGT-A в сравнение с 44,8% имплантация в контролната група. Четири от горепосочените проучвания съобщават за значително подобрен процент на постигане на бременност.

На базата на тези тринадесет разработки може да се заключи, че PGT-A увеличава шансът за успешна имплантация и реализиране на бременност при жени с напреднала възраст (305, 306).

В свое проучване Lee et al. установяват, че PGT-A подобрява шансовете на жени на възраст над 40 години, като постигат биохимична бременност в 50.9% и живо раждане в 45.5% от случаите (308).

Harton et al. разглеждат връзката между възраст на майката, хромозомни аномалии, имплантиране и загуба на бременност. В тяхното проучване показва, че степента на имплантация и бременност при селективен трансфер на еуплоидни ембриони при по-млади и по-възрастни пациенти не се различават значително. Някои от пациентите нямат еуплоидни ембриони за трансфер, ситуация, която се увеличава с напредване на възрастта на майката (223).

Rubio et al. изследват ефективността на PGT за две различни индикации - напреднала възраст на майката и повтарящи се спонтанни аборти. Резултатите показват, че след PGT–A процентът на живо раждане се увеличава 2,5 пъти в сравнение със случаите, в които не се прилага изследването (309).

За разлика от резултатите от това проучване, Debrock et al. не намират полза от скрининг метода при пациенти в напреднала възраст на майката (над 35 години) по отношение на имплантацията, честотата на настъпване на бременност и процента на живо раждане (310).

Най-малък процент на реализиране на бременност и живо раждане са наблюдаваше в четвърта възрастова група, в която жените бяха с най-напреднала възраст (41-45 години) – съответно 32.14% и 25.00%.

В настоящия дисертационен труд най-значителното увеличение на процента на живо раждане се наблюдава при най-напредналата възрастова група. Средната честота на раждаемост при жени на възраст 41-45 години, подложени на IVF, е 3,6% (311). В нашето проучване се отчетоха значително по-високи проценти на биохимична бременност и живо – съответно 32.14% и 25.00%. От тук може да се заключи, че PGT-A увеличава значително шанса за настъпване на бременност и живо раждане при жени в напреднала възраст. В тази група се установи процент на загуба на бременността от 3.57%, по-нисък в сравнение с литературните данни за спонтанен аборт без извършване на PGT-A (312-315). Следователно, от една страна PGT процедурата може значително да увеличи шансът за имплантация, реализиране на бременност и живо раждане, и от друга страна намали риска от загуба на бременността при жени в напреднала възраст.

Мета-анализ, направен от Twisk et al., и други наскоро публикувани изследвания показват, че основните причини за неуспеха на PGT-A са резултат от редица променливи фактори като неоптимални условия за култивиране на ембриони, техники за биопсия, брой на получените клетки, метод на фиксиране, изследван брой хромозоми, техническата експертиза на репродуктивния център, ембрионалния мозаицизъм и свързаното с възрастта увеличение на процента анеуплоидия (316).

## 6. Генетични фактори за инфертилитет

Хромозомните аномалии могат да доведат до репродуктивна недостатъчност, спонтанни аборти, пери- и постнатална смърт на плода (317). Честотата на хромозомните аномалии е сравнително висока - хромозомни аномалии, включително хромозомни полиморфизми, са открити при 1,3–15,0% от двойките, които не успяват да заченат (318-324). Най-честите хромозомни аномалии са балансираните хромозомни преустройства (транслокации), инверсии и полови хромозомни мозаицизми.

Реципрочните транслокации са едно от най-често срещаните структурни преустройства, наблюдавани при хората (324). Индивидите, носители на балансирана транслокация, са клинично здрави, но имат повишен риск от раждане на деца с небалансиран кариотип.

Носителите на Робертсонови транслокации също са изложени на риск от спонтанни аборти, потомство с умствена изостаналост и вродени дефекти, свързани с анеуплоидия. Честотата на автозомните хромозомни аномалии при мъже с безплодие е 1,1–7,2% (325-328), а честотата на хромозомните аномалии при инфертилни жени е 10,0% (329).

По неизвестни причини женските гамети са по-податливи на мейотични рекомбинационни грешки и са с по-голяма вероятност от анеуплоидия (330). Тези грешки могат да възникнат по време на хромозомното сдвояване и/или рекомбинацията в мейоза I или по време на сегрегацията на хромозоми в анафаза I и/или II. Идентифицирането на тези цитогенетични грешки при жените може да бъде предизвикателство, тъй като грешките в анафаза I и/или II се проявяват в случайни ооцити във всеки овулаторен цикъл.

Моделите на мейотична сегрегация се различават при мъже и жени, носители на Робертсонови транслокации – с по-голяма честота се формират небалансирани гамети при жени носителки (331). В проучване, сравняващо модели на мейотична сегрегация и данни от предимплантационни генетични тестове на ембриони, получени от жени и мъже, носители на Робертсонови транслокации, Ko et al. показват по-висок процент на небалансирани, нежизнеспособни ембриони при жени носителки (75.3% спрямо 66.3%) (332).

Връзката между хромозомните аномалии и мъжкото безплодие е добре проучена. Ретроспективен преглед на 668 субфертилни мъже, подложени на цитогенетичен анализ, установява, че честотата на хромозомни аномалии е най-висока сред мъже с азооспермия (13,3%), следвана от тези с тежка олигозооспермия (10.9%), олигозооспермия (4.2%) и лека олигозооспермия (1.2%) (327). Общата честота на хромозомните аномалии се определя като 8,2%, което е повече от десеткратно увеличение спрямо нормозооспермичната популация (0,6%). (333, 334).

Няколко сходни проучвания откриват подобни данни – хромозомни аномалии са детектирани в 4,3% до 10,3% от субфертилните мъже и 15,4% от азооспермичните мъже (325, 335, 336). Установена е по-голяма вероятност за наличие на гонозомни нарушения при мъже с необструктивна азооспермия и автозомни нарушения при мъже с олигозооспермия, олигоастенотератозооспермия и олиготератозооспермия (325, 327).

Транслокациите представляват 1,8–3,3% от автозомните аномалии при безплодни мъже (327). При мъже, носители на балансирани транслокации, се наблюдава по-висок процент мейотични грешки в сперматогенезата (като нарушено синаптично комплексно сдвояване или рекомбинация), което води до дизомия и/или небалансирани транслокации при 29–81% от сперматозоидите (337, 338). Следователно, тези сперматозоиди могат да произвеждат ембриони с небалансирани транслокации или анеуплоидии.

Пренареждането на хромозомен материал между гонозомите и автозомите е силно свързано с мъжкото безплодие. Трансферът на материал между автозомите и X хромозомата е свързан със стерилитет чрез нарушаване на сперматогенезата, независимо от позицията на хромозомното скъсване. Пренареждането между Y хромозомата и автозомите също води до стерилитет, ако точката на счупване се намира в псевдоавтомозомна област на Y хромозомата, в областта на Yq11 или нейните граници. Както Yq11, така и псевдоавтомозомната област на Y хромозомата съдържат гени, които играят важна роля в мейозата и фертилитета (339).

Реципрочните и Робертсоновите транслокации са 8,5 пъти по-често срещани при мъже с репродуктивни неуспехи. При мъже, носители на Робертсонови транслокации, 3–36% от сперматозоидите са генетично небалансирани. Нещо повече, тези транслокации са по-често свързани с наличие на олигозооспермия, отколкото с необструктивна азооспермия (съответно 1,6% и 0,09%) (340).

Хромозомните инверсии са 8 пъти по-разпространени при инфертилни мъже, отколкото в общата популация (съответно 0,16% и 0,02%). Инверсии на големи участъци в 1-ва хромозома носят най-високи риск от безплодие, тъй като тази хромозома носи най-голям процент генетичен материал (340).

## 7. PGT-SR за балансирани хромозомни преустройства

Известно е, че спонтанните аборти са свързани с родителски хромозомни аберации, основно с балансирани реципрочни и Робертсонови транслокации. Балансираните транслокации се появят при 0.2 % от новородените, но се срещат с по-голяма честота сред безплодните двойки и пациенти с рецидивиращи аборти. Балансирани транслокации са открити при 0.6% от двойките с инфертилитет, 3.2 % от двойките с повече от десет неуспешни ин витро циклъла и 9.2 % от пациентите с три или повече спонтанни аборта в първия триместър (341).

При индивиди,  носители на балансирани реципрочни или Робертсонови транслокации, е установен висок процент на анормални гамети след мейотична сегрегация и съответно ембриони с небалансиран хромозомен набор (87, 342). Тези пациенти са с по-голям риск от репродуктивни неблагополучия и/или с висок риск за хромозомно анормални бременности, които водят до хабитуални спонтанни аборти или деца с вродени аномалии и умствена изостаналост (343).

За носителите на балансирани реципрочни транслокации шансовете за зачеване на хромозомно абнормни ембриони, в зависимост от транслокацията, варират от порядъка на 20% - 80% (1).

Пациенти, при които са осъществени най-малко 10 ембриотрансфера без достигане на клинична бременност, се изследват за хромозомни аномалии като част от скринингово изследване, с цел да се изясни невъзможността за имплантация. Пациенти с история за най-малко три последователни аборти през първия триместър на бременността също подлежат на изследване (341).

Stern et al. установяват хромозомни аномалии при 13 от 514 лица с неуспехи в имплантирането на ембрионите (2.5%) и 15 от 319 лица с хабитуални аборти (4.7%). Транслокации (реципрочни и Робертсонови) са установени при 7 от 514 индивида (1,4%) и 7 от 219 двойки (3.2%) с невъзможност за имплантиране. Транслокации са открити при 13 от 319 пациенти (4.1%) и 12 от 130 двойки (9,2%) с повтарящи се аборти (341).

Балансирани транслокации са също така срещани при 2% - 3.2 % от мъжете, при които се налага IVF чрез ICSI (интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоиди) (118-120).

***Реципрочни транслокации***

Реципрочните транслокации представляват взаимен обмен на генетичен материал между нехомоложни хромозоми. Такива транслокации могат да се формират между хромозоми от всички двойки,  включително между автозоми и полови хромозоми. Реципрочните транслокации са най-разпространените хромозомни аномалии с честота от 0,14% до 0.2% при неонаталната популация (344-346).

Повечето носители на реципрочни транслокации са здрави и нямат никакви симптоми. Но около 6% от тях имат набор от симптоми, които могат да включват аутизъм, умствено увреждане, или вродени аномалии. Вероятно причината за тези симптоми е засягане на ген/гени, локализирани в точката на разкъсване на хромозомните фрагменти, ангажирани в транслокацията.

Обикновено реципрочните транслокации са резултат от обмен на два терминални сегмента от различни хромозоми. По време на първото мейотично делене транслоцираните хромозоми и техните нормални хомолози могат да образуват квадриваленти и да се сегрегират по пет различни начина: алтернативен, I съседен, II съседен, 3:1 и 4:0 режими, като се формират 32 типа възможни гамети с различни хромозомни комбинации.  Генетично нормалните/балансирани гамети се получават чрез алтернативна сегрегация. От всички 32 възможни гаметни комбинации само една води до нормален генотип и една до генотип с балансирана транслокация. Другите режими на сегрегация водят до формиране на хромозомно небалансирани гамети (347, 348).

Съседните типове сегрегация (I и II) генерират небалансирани гамети, тъй като се унаследява производната хромозома, което може да доведе до фетус с множество аномалии. Двата други модела на сегрегация (3:1 и 4:0) формират небалансирани гамети с частични тризомии или частични монозомии (159).

При индивидите с реципрочни транслокации съществува висок риск от създаване на гамети с небалансирани хромозомни транслокации, което води до спонтанни аборти или деца с аномалии. За семействата, носители на транслокации, често се предлагат генетична консултация и генетични тестове. Реципрочните транслокации най-често се установяват чрез пренатална диагностика или постнатален хромозомен анализ.

PGT-SR е приложим при носителите на реципрочни транслокации, като основната цел е да се намали честотата на спонтанните аборти и засегнатите новородени чрез подбор на хромозомно нормални/балансирани ембриони. Степента на бременност след PGT-SR е тясно свързана с броя на хромозомно нормалните ембриони, които са достъпни за трансфер (349). Въпреки това, за разлика от Робертсоновите транслокации, процентът на ембрионите, съответстващ на алтернативната сегрегация при реципрочните транслокации, е сравнително малък. При някои цикли с PGT при реципрочна транслокация трансферът на ембриони не може да бъде осъществен поради липсата на генетично балансирани ембриони. Следователно е важно да се предвиди методът на сегрегация на реципрочните транслокации и да се проведе адекватна генетична консултация на пациента преди PGT процедурата, за да се изясни вероятността за наличие на хромозомно балансирани ембиони (350).

***Робертсонови транслокации***

Честотата на Робертсонови транслокации при новородени е приблизително 1 на 1000 (351). Те представляват необичаен тип хромозомно пренареждане, причинено от съединяване на две акроцентрични хромозоми. Среща се между петте акроцентрични хромозоми - хромозоми 13, 14 и 15 (група D) и 21 и 22 (група G). Участващите в Робертсоновите транслокации хромозоми се разкъсват в техните центромери и дългите рамена се сливат, за да образуват единична хромозома с единичен центромер. Късите рамена се сливат и образуват реципрочни продукти, които обикновено съдържат несъществени гени и най-често се губят в рамките на няколко клетъчни деления.

Носителите на Робертсонови транслокации най-често нямат фенотипна изява, следователно този тип пренареждане може да бъде предадено в много поколения без да бъде установено наличието му (352). Въпреки това при жените се наблюдават по-нисък оплодителен потенциал на ооцитите, забавено развитие на ембрионите и по-бавно формиране на бластоцисти (353). При мъжете обикновено има нарушения в спермограмата като намален брой сперматозоиди, подвижност и променена морфология. Освен намален репродуктивен потенциал, носителите на Робертсонови транслокации имат повишен риск от спонтанни аборти и раждане на деца с хромозомни нарушения, дължащи се на формирането на небалансирани гамети (354).

При 50% от Робертсоновите транслокации пренареждането възниква de novo, а 95% от de novo аберациите се случват по време на мейотичното делене през овогенезата (355).

При Робертсоновите транслокации през профаза на първото мейотично делене в резултат от сдвояването на дериватните хромозоми и двете нормални хомоложни хромозоми се формира тривалентна структура, която може да се сегрегира по различни начини при анафаза - чрез алтернативен, I съседен, II съседен и 3:0 режими на сегрегация (356, 357). Само алтернативната сегрегация формира гамети с нормален/балансиран кариотип. Другите режими на сегрегация (I съседен, II съседен и 3:0) образуват небалансирани гамети с дизомии и нулизомии на хромозомите, участващи в пренареждането (352).

Добре известно е, че мейотичната тетравалентна конфигурация има тенденция да сегрегира по алтернативен начин, което води до производството на нормални/балансирани сперматозоиди/яйцеклетки. Въпреки това, се получават и известен процент небалансирани гамети, произтичащи от съседната или 3:0 сегрегация, които биха могли да причинят спонтанен аборт или анеуплоидия в потомството (352).

Най-често Робертсонова транслокация се наблюдава между хромозоми 13 и 14 (126). Тази D/D транслокация съставлява около 75% от всички транслокации тип центрично сливане (358). Потенциалното живо раждане от това хромозомно небалансирано преустройство е тризомия 13 (синдром на Патау). При двойки, носители на тази Робертсонова транслокация, при пренатална диагностика във втория триместър съществува емпиричен риск за диагностициране синдром на Патау от 0.4 % (359, 360).

В някои случаи на транслокация между 13 и 14 хромозома се наблюдава унипарентална дизомия на 14-та хромозома след механизъм на тризомично спасяване, като прогностичният риск е около 0.1 - 0.5 %. Тризомия 14 най-често довежда до спонтанен аборт обикновено в първия триместър на бременността (360).

За носители на der(13;14) общият риск от спонтанен аборт не се очаква съществено да се различава от популационния (фонов) риск от 15% - 20% (124, 125). Въпреки това при някои двойки с транслокация 13/14 се наблюдава безплодие и по-висока честота спонтанни аборти от предишно предполаганите (27.6% от всички спонтанно настъпили бременности) (126).

Втора по честота след der(13;14) е der(14;21) транслокацията. Това е една от най-срещаните Робертсонови транслокации при двойките с история на спонтанни аборти (125) и представлява една от причините за синдром на Даун (361). Около 3.7% от случаите на тризомия 21 възникват поради родител, носител на Робертсонова транслокация, в която е ангажирана 21-ва хромозома, като най-честа е t(14;21) (362). Носители на t(21q;21q) винаги формират небалансирани гамети и живородените им потомни са винаги засегнати от синдрома на Даун (363).

Проучване в Англия и Уелс описва характеристиките на кариотипите, водещи до фенотипна изява синдрома на Даун при 29 256 случаи, диагностицирани между 1989 и 2009 г. и включени в Националния Цитогенетичен Регистър за Синдрома на Даун (NDSCR). Анализирани са честотата на възникване на различните кариотипи, процентът случаи, диагностицирани пренатално, половото съотношение, средната възраст на майката и процентът на повтаряемост на дете с Даун при двойките. 97.1% от всички случаи на синдром на Даун са със свободна тризомия 21; 2.9% са с транслокационна форма. При 0.3% от случаите на синдром на Даун се наблюдават двойни или тройни анеуплоидии, в състава на които влиза 21 хромозома. Близо 1% от всички случаи на синдром на Даун са с мозайки по хромозома 21. Средната възраст на майката при свободната форма на тризомия 21 е 35 години. Половото съотношение на засегнатите индивиди е 54% мъже и 46% жени. Около 1% от майките имат повече от едно засегнато от синдрома на Даун дете. При свободната мозаична форма на тризомия 21 се наблюдава по-ниска средна възраст на майката (33 години), по-малък процент мъжки пол (39.5%) и 2.5% рецидив при майките. По-голямата част от транслокационните форми са вследствие на Робертсонови транслокации, като майките носителки са на по-млада средна възраст (28 години). От Робертсоновите транслокации der(14; 21), 54% са възникнали de novo, 41% са унаследени от майката и 5% по бащина линия. При 15,8% от майките с Робертсонови транслокации се установява раждане на повече от едно дете със синдрома на Даун. Множествените анеуплоидии имат най-висок дял на мъжкия пол (67%), най-голям дял на мозайки (40%), а средната възраст на майките е 37 години. Данните, натрупани в този национален регистър позволяват да бъде направена оценка на по-редките кариотипи, свързани със синдрома на Даун и да се опише тяхната епидемиология (364).

В детската болница Фредерико Гомез в Мексико за периода 1992-2011 са идентифицирани 2 018 случаи с клинична диагноза тризомия 21. При 1921 пациента (95.2%) е установен цитогенетичен вариант на тризомия 21. Свободна тризомия 21 се наблюдава при 1787 от случаите (93,02%), Робертсонова транслокация при 92 случая (4,79%), мозаицизъм при 31 случая (1,61%). При останалите пациенти се наблюдават допълнителни хромозомни аномалии под формата на други структурни размествания и двойни анеуплоидии. Засегнатите индивиди са разделени по пол, като 1048 ( 54,56 %) са мъже и 873 (45.44%) са жени. Възрастта на майката оказва ефект върху честотата на свободната тризомия 21 - над 36-годишна възраст на майката зачестява процентът на свободна форма на Даун (365).

Fiorentino et al. провеждат двадесет и осем последователни цикъла с PGT-SR при 24 двойки, носители на 18 различни балансирани транслокации. Като цяло 187 от 200 (93,5%) ембриони са успешно диагностицирани. Ембрионите, подходящи за трансфер, са идентифицирани в 17 цикъла (60.7%), като са прехвърлени 22 ембриона (1.3%). При дванадесет двойки е постигната клинична бременност (70.6%), с общо 14 имплантирали се ембриони (63.6%). На три от двойките се раждат здрави бебета, а две двуплодни и седем едноплодни бременности са в ход след 20-та гестационна седмица (366).

Предишни проучвания показват, че PGT-SR може да подобри процента живо раждане чрез намаляване на риска от повтарящи се спонтанни аборти, минимизиране на риска от зачеване с хромозомно анормален плод или увеличаване на шанса за забременяване при безплодни двойки (особено при двойки след неуспешни предишни IVF опити). Прилагането на PGT-SR при носители на балансирани транслокации може да намали риска от неблагоприятни резултати, като даде възможност за трансфер само на тези ембриони с нормален/балансиран кариотип (342, 343, 367).

***Сложни хромозомни преустройства***

Най-често срещаните структурни хромозомни преустройства са реципрочните транслокации, наблюдавани с приблизителна честота от 0,14% при новородените и 0,6% при мъжете, засегнати от инфертилитет (341, 368, 369). Реципрочните транслокации представляват обмен на крайни сегменти между хромозоми от различни хромозомни двойки.

Сложните хромозомни преустройства (CCR) се дефинират като структурни хромозомни аберации, включващи най-малко три точки на разкъсване с обмен на генетичен материал между две или повече хромозоми. Фенотипно нормалните носители на CCR могат да страдат от безплодие или субфертилитет, повтарящи се аборти и/или са изложени на висок риск от хромозомно небалансирано потомство (71). Видът на балансираното сложно хромозомно преустройство може да варира от обикновена тройна размяна на участъци между три хромозоми до изключително сложни транслокации, включващи много хромозоми и множество разкъсвания (370). Цитогенетично балансираните носители на CCR могат да страдат от умствено изоставане и/или могат да имат различни вродени аномалии, главно поради нарушаване на гените в точките на счупване, позиционен ефект или криптични дисбаланси в генома (371).

Повечето носители на фамилни случаи на CCR, включващи три или четири хромозоми с три или четири точки на разкъсване, са фенотипно нормални. Привидно балансираният носител на CCR, обаче, може да е със значително увеличен риск от репродуктивни неблагополучия (72). Балансираните носители на CCR имат повишен риск от ембриони с небалансиран кариотип. Поради този факт рискът от повтарящи се при тях аборти се оценява на 50 до 100%, а рискът за раждане на хромозомно небалансирано дете варира от 20 до 90% (75, 76).

Предлагани са различни класификации на CCR - според тяхното естество, брой хромозомни разкъсвания, разпределение или участие на вътрехромозомни преустройства (372, 373). Въз основа на начина на предаване на CCR в потомството, сложното хромозомно пренареждане може да бъде нововъзникнало или фамилно унаследено. Макар и на пръв поглед балансирани, de novo пренарежданията с повече от четири точки на разкъсване, са свързани с множество малформации. При CCR с четири точки на разкъсване може да се наблюдава анормален или нормален фенотип (374-376).

Механизмите в основата на формиране на CCR остават неизяснени и до днес. Използването на флуоресцентни тестове за in situ хибридизация и молекулярни техники за характеризиране на CCR разкриват, че хромозомните преустройства могат да бъдат по-сложни от първоначално предполагаемите. Предложени са няколко механизма за възникване на CCR, сред които са неалелната хомоложна рекомбинация (non-allelic homologous recombination, NAHR) и нехомоложното снаждане на краищата (nonhomologous end-joining, NHEJ) (377-379). И при двата метода се делетират или дублират геномни сегменти. Други вероятни механизми за възникване на CCR се дължат на анормална репликация на ДНК – прекъсване на репликационната вилка и смяна на матрицата (fork stalling, template switching, FoSTeS) и микрохомоложно медиирана индуцирана от прекъсвания репликация (microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR) (377, 380, 381). Според последните проучвания свързани с CCR могат да са и едновременните двуверижни разкъсвания на ДНК, предизвикани от стимули като свободни радикали или йонизиращо лъчение, последвани от неправилно снаждане на фрагментите поради микрохомоложност (371, 382, 383).

Въз основа на произхода си CCR могат да бъдат наследени по майчина или по бащина линия. Повечето документирани случаи на CCR включват майчино унаследяване, което показва, че оогенезата е в състояние да се справи със сложността на CCR и да се роди фенотипно нормално дете (375). Повечето от носителките на CCR са идентифицирани поради напреднала възраст, многократни спонтанни аборти или раждане на анормално дете (75, 384-387). По-голямата част от CCR при мъжете са документирани главно при случаи на мъжко безплодие (388-392). Обикновено мъжете, носители на сложни хромозомни преустройства, са инфертилни или субфертилни поради хипосперматогенеза или сперматогенен арест вследствие на сложните мейотични конфигурации (393). Следователно, унаследяването на CCR по бащина линия се счита за ограничено, но въпреки този факт подобни случаи са докладвани в няколко проучвания (394-398).

Индивиди с хромозомно пренареждане имат повишен риск от зачеване с хромозомно небалансиран ембрион/плод и спонтанни аборти, тъй като мейотичното сдвояване на хомоложните хромозоми не може да се извърши по прост линеен начин и това създава формиране на небалансирани гамети (343, 399, 400).

В случай на троен или четворен обмен, включващ три хромозоми, по време на мейозата могат да се получат балансирани и небалансирани гамети. По време на първото мейотично делене се формира шествалентна конфигурация, която позволява четири модела на сегрегация (3:3, 4:2, 5:1 и 6:0). На теория могат да се формират 64 различни гаметни хромозомни комбинации. От тези 64 комбинации само 2 са нормални/балансирани - 1 е нормална хаплоидна гамета, 1 е балансирана хаплоидна гамета. Останалите 62 гаметни хромозомни комбинации имат голямо разнообразие от дисбаланси поради хромозомната малсегрегация. Небалансираните гамети могат да причинят периимплантационна загуба, аборт или раждане на дете с различни вродени малформации. Ако мейотичното разделяне е симетрично (3:3), могат да се получат 20 различни гаметни хромозомни комбинации - 1 нормална, 1 балансирана и 18 небалансирани комбинации. Ако разделянето е асиметрично (4:2, 5:1 или 6:0), се формират 44 различни небалансирани гамети (30 вида за 4:2, 12 вида за 5:1 и 2 вида за 6:0) (71).

Въпреки подобрените възможности за пренатална диагностика, балансираните носители на CCR все още са изправени пред сериозни предизвикателства като невъзможност за постигане на бременност, повтарящи се спонтанни аборти, прекъсване на бременността при засегнат плод, преодоляване на социална, религиозна и етична стигма, свързани с избирателно прекъсване на бременността (401, 402).

Сложните хромозомни преустройства и други хромозомни аномалии често причиняват пери- или пост-имплантационна загуба понякога преди бременността да бъде регистрирана поради значителните хромозомни дисбаланси, които са несъвместими с нормалното развитие на плода (403). При двойки, при които един от партньорите е носител на хромозомно пренареждане, PGT може да се проведе, за да се изберат нормални/балансирани ембриони и значително да се увеличи вероятността за живо раждане.

Тъй като PGT става все по-разпространена и икономически достъпна техника, вероятно повече носители на CCR ще се възползват от процедурата. Важно е да се отбележи, че при de novo възникнали хромозомни преустройства или в случай на липса или непълна фамилна анамнеза на пациенти с CCR, се препоръчва предпазлив подход към PGT.

Потенциалните ползи от прилагането на PGT при носители на CCR са очевидни - увеличаване на шанса за раждане на здраво дете, подобряване на успеха на ин витро трансферите, скъсяване на времето за постигане на бременност и намаляване на риска от аборт. От друга страна PGT също е рентабилен подход, тъй като намалява броя на неуспешните трансфери и елиминира необходимостта от прекъсване на желана бременност по медицински показания.

В настоящия дисертационен труд имаше извадка от 16 двойки, при които единият партньор беше носител на балансирано хромозомно преустройство. При пациентите с патологичен кариотип бяха изследвани общо 129 ембриона, 32 (24.81%) от които бяха балансирани и 97 – небалансирани (75.19%). Трансфер беше извършен на всички пациенти, които имаха един или повече еуплоидни ембриони – на 10 двойки (62.50%). При по-голямата част от двойките с патологичен кариотип, при които беше осъществен трансфер, беше регистрирана биохимична бременност (80.00%) и беше достигнато до живо раждане – при 7 двойки или 70.00% от всички двойки с патологичен кариотип. При една от двойките с установена биохимична бременност, бременността беше проследена до късна фетална морфология в периода 28-32 г.с., която не показа отклонения, след което липсваха данни за изхода от бременността.

Нашите резултати са в съответствие с данните, получени от Treff et al., които провеждат PGT-SR при 15 пациенти, носители на балансирани транслокации. Направени са 12 ембриотрансфера на 9 балансирани ембриона. Постигната е биохимична бременност и живо раждане в 75% от случаите (404).

При пациентите с Робертсонови транслокации бяха изследвани общо 3 ембриона, като всички бяха небалансирани (100%) и не се достигна до ембриотрансфер.

При носителите на реципрочни транслокации бяха анализирани общо 123 ембриона, 29 от които бяха балансирани (23.58%) и 94 бяха небалансирани (76.42%). Трансфер беше извършен на всички пациенти с реципрочни транслокации, които имаха един или повече еуплоидни ембриони – на 9 двойки (69.23%). Останалите 4 двойки имаха само небалансирани ембриони и бяха насочени за следващ ин витро цикъл.

При 7 от 9-те двойки с реципрочни транслокации, при които беше извършен ембриотрансфер, беше регистрирана биохимична бременност и беше достигнато до живо раждане (77.78%).

В нашето изследване установихме, че 75.19% от ембрионите на родители с балансирани транслокации, анализирани чрез aCGH и NGS, са небалансирани. Процентите на хромозомните аберации сред носители на балансирани транслокации от пет различни независими една от друга публикации са 79.50%, 69.40%, 85.50%, 84.00%, 79.00% и 79.20%, следователно данните са доста близки до нашите открития (366, 405-408). Разликата между процента небалансирани ембриони при носителите на Робертсонови транслокации и носителите на реципрочни транслокации е значителна – съответно 100% и 76.42%. Вероятно това се дължи на малкия дял, който заемат Робертсоновите транслокации в нашето проучване и ограничения брой ембриони за изследване при носителите на този тип хромозомно преустройство. Извадката на реципрочни транслокации в настоящата работа е значително по-подробна.

Съществуват противоречиви данни дали при носители на Робертсонови или на реципрочни транслокации се наблюдава по-голям процент небалансирани ембриони. В проучване на „Reprogenetics“ върху 432 PGT цикъла е посочено, че средно 72% от ембрионите на носители на Робертсонов тип транслокации и 82% от ембрионите на носители на реципрочни транслокации са абнормни (409). В другата статия се твърди, че пациенти с Робертсонова транслокация са склонни да формират по-голям брой нормални/балансирани ембриони от тези с реципрочни транслокации, съответно 76% и 33% (410).

При анализ на честотата на спорадичните и небалансирани хромозомни аберации в ембрионите на носители на Робертсонов тип и реципрочни транслокации е установено, че разпространението на спорадичните аномалии е почти 5 пъти по-застъпено от небалансираните транслокации в ембрионите на носители на Робертсонови транслокации. Докато резултатите при носителите на реципрочни транслокации са противоположни – честотата на небалансирани транслокации е 4 пъти по-висока от спорадичните анеуплоидии (405). В аналогично проучване честотата на спорадичната анеуплоидия, свързана с Робертсоновите транслокации, е 31%, докато при реципрочните транслокации е само 6% (411). В извадка от 122 пациенти с транслокации са установени повече спорадични случаи при носители на Робертсонови транслокации спрямо носителите на реципрочни транслокации, съответно 74% и 25% (412).

Според проучвания честотата на спонтанния аборт е близо 50% при носители на балансирани реципрочни транслокации и между 20 и 25% при носители на балансирани Робертсонови транслокации (413). При носителите на реципрочна транслокация, е постигнато живо раждане в 18.2% от случаите, а при носителите на Робертсонов тип транслокация, степента на живо раждане е 20% на ембриотрансфер (414). В нашето проучване не се наблюдава загуба на бременност при носителите на реципрочни транслокации. Постигнати са биохимична бременност и живо раждане в 77.78% от случаите, което е почти тройно повече от показаното в горните научни разработки.

Наблюдава се статистически значима разлика в броя на небалансираните ембриони при мъже и жени носители на балансирани транслокации (415). В нашето проучване също е установен превес на небалансирани ембриони, получени от жени, носителки на балансирани транслокации (78.13% спрямо 74.58%).

## 8. Живо раждане, биохимична бременност и спонтанни аборти

***Хромозомни аномалии, загуба на бременност и PGT***

Около 10-15% от клинично установените бременности водят до спонтанен аборт, а около 50% от ранните загуби на бременност се дължат на хромозомни аномалии (312, 313).

Още през 60-те години на 20 век е наблюдавана корелация между спонтанните аборти и хромозомните аномалии (136). През 70-те години е публикувано едно от най-мащабните до тогава проучвания, което разглежда 1500 абортивни материала, над 60% от кариотипите на които са абнормни (137). В следващите години са публикувани редица изследвания, свързващи спонтанните аборти с хромозомни аномалии, като процентът на абнормни кариотипи варира в рамките на 40-60% (139-142).

Между 1990 г. и 2002 г. чрез цитогенетичен анализ са изследвани 2301 аборта, които поради подобрения в техниките за култивиране през 1997 г. са разделени в два периода: период А от 1990 до 1997 г. (907 абортивни материала) и период Б от 1998 до 2002 г. (1273 абортивни материала). Абнормни кариотипи са открити в 42.8% от случаите за период А и 65.8% - за период Б. Най-чести хромозомни аберации сред изследваните аборти са тризомия, триплоидия и монозомия X. Синдром на Търнър съставя около 10% от всички аномалии в период Б. Процентът на анеуплоидии в двата периода не се различава значително. От общо 1099 абнормни кариотипа и за двата периода, 7.7% представляват анеуплоидии. В период Б най-често се среща тризомия 16, която се наблюдава в 18.3% от всички случаи на тризомии и в 12.0% от всички абнормни кариотипи за периода. За период А най-разпространена е тризомия 21, която съставлява 23.9% от всички тризомии и 15.6% от всички аномалии за периода. Най-рядко срещаните тризомии сред абортите са тризомии 1 и 19, като за тризомия 19 е открит само един случай за всичките 12 години на проучването. Анеуплоидните кариотипи са открити основно при по-възрастните жени, което съответства на литературните данни, че над определена възраст зачестява процентът на анеуплоидиите (145).

През 2010 е извършено сходно изследване, при което са анализирани 382 абортивни материала. Установено е, че 52.62% от абортите се дължат на цитогенетично абнормни кариотипи. Най-разпространени са автозомните тризомии, които съставляват повече от половината от спонтанните аборти (143).

Четиринадесет проучвания сравняват процента загуба на бременност в две групи – група, при която е постигната бременност в резултат на PGT-A и група, при която е отчетена бременност след извършена морфологична оценка на ембрионите (11, 214, 219, 223, 226-229, 231, 232, 301, 305, 306, 367).

Спонтанните аборти варират от 2.6% до 31.6% в групата PGT-A. Yang et al. и Fishel et al. не откриват значителна разлика между пациентите в двете изследвани групи (11, 231). Harton et al. прави ретроспективен преглед на степента на спонтанен аборт при прилагане на биопсия на етап на разцепване и биопсия на трофектодерм по възрастови групи не открива измерима разлика при честотата на възникване на спонтанни аборти между двете техники на биопсия – при жени до 42 години, спонтанна загуба на бременността е отчетена в 9.9% от случаите в стадий на разцепване и 7.9% в стадий на бластоцист (223). Въпреки това, други две проучвания с контролни групи пациенти, чиито ембриони са оценени единствено по морфология, съобщават за значително по-ниски нива на спонтанен аборт след PGT-A (229, 304).

При хабитуалните аборти могат да се наблюдават ембриони с нормален или абнормен кариотип. PGT може да подобри резултатите от бременността при пациенти, които имат периодична загуба на бременност, произтичаща от анормални ембриони. PGT, обаче, не показва ползи при необясними повтарящи аборти. При пациенти с три рецидивиращи аборта процентът на постигане на бременност след PGT е приблизително 70%, при пациенти с четири повтарящи се аборти - 60% (416).

В настоящия труд процентът на спонтанна загуба на бременността при жените от всички възрастови групи беше 3.64%. Процентът на спонтанни аборти беше разпределен по възрастови групи. В първата група (26-30 години) спонтанна загуба на бременността се наблюдаваше в 4.76% от случаите. Във втората възрастова група (31-35 години) при нито една от жените не настъпи спонтанен аборт. Група III (36-40 години) аборт настъпи при 5.56% от пациентките. При жените с напреднала възраст (41-45 години) загуба на бременност имаше в 3.57% от случаите. В сравнение с литературни данни за процентите на спонтанен аборт, се вижда че в настоящото проучване честотата на загуба на бременност е много по-ниска след провеждането на PGT (312, 313). В този смисъл, PGT процедурата би намерила широко приложение сред жени с хабитуални аборти и двойки, при които прекъсването на бременността е невъзможно по религиозни или етични причини. В допълнение, всички IVF пациенти могат да намалят психотравмата, свързана със загубата на бременност, като се подложат на PGT процедура.

***Реализиране на бременност и живо раждане след процедура с PGT***

Три рандомизирани научни проучвания изследват клиничните резултати от приложението на PGT-A при млади пациенти с благоприятна прогноза, като демонстрират полза по отношение на имплантацията и реализацията на бременност в тази група (11, 219, 303).

В своето проучване Yang et al. прилагат aCGH-базиран PGT-A, за да изберат единичен бластоцист за свеж ембриотрансфер (средна възраст на пациентките 31.2 години). Процентът на реализиране на успешна бременност след PGT-A е значително по-висок в сравнение с групата, при която е извършена само морфологична оценка на ембрионите (съответно 69.1% и 41.7%) (11).

Scott et al. прилагат qPCR-базиран PGT-A, като трансферират два шестдневни ембриона. Пациентите са на възраст между 21 и 42 години (средна възраст 32.2 години) с най-малко два бластоциста за биопсия. Резултатите показват, че в тази група е постигнат по-висок процент на имплантация на ембрионите (наличие на гестационен сак) на трансфер спрямо контролната група, при която е извършена само морфологична оценка на ембрионите (79.8 и 63.2%,) и по-висок процент раждане на цикъл (84.7 и 67.5%) (219).

Forman et al. използва подобни критерии за включване като Scott et al. и Yang et al., с тази разлика, че сравняват ембриотрансфер на единичен ембрион, проверен чрез PGT-A и два морфологично оценени ембриона. Подобен процент на реализиране на бременност е наблюдаван и при двете групи (свеж трансфер 63.9% и 70.5%, замразен трансфер 53.6% и 52.0%) (303).

Обобщено, на базата на тези три рандомизирани контролни проучвания беше заключено, че използването на PGT-A може да бъде ефективно средство за улесняване на единичния ембриотрансфер, като по този начин значително се намалява рискът от многоплодна бременност.

Lee et al. анализират 3241 бластоциста, като след ембриотрансфер на 762 еуплоидни ембриона се постига биохимична бременност в 64.5% от случаите и живо раждане в 53.5% от случаите (417).

Rubio et al. провеждат 86 PGT цикъла при 71 двойки със спонтанни аборти. Постигнати са 23 биохимични бременности (34.3%) и 19 живи раждания (28.33%). Установена е една извънматочна бременност и три спонтанни аборта (418).

Magli et al. изследват 412 ембриони с PGT и установяват, че 234 (57%) са хромозомно балансирани. Еуплоидни ембриони са трансферирани на 59 пациентки, в резултат на което се реализират 19 бременности (32%), 16 живи раждания (26.95%) и 3 спонтанни аборта (5.05%) (419)

Mastenbroek et al. сравняват случаите на реализация на бременност при наличие или отсъствие на PGT-A процедура (съответно 37% и 69%) и коефициент на живо раждане (съответно 35% и 24%) (293). Те предполагат, че ембрионалната биопсия намалява процента на имплантация в сравнение с контролната група (229, 420).

Въпреки че някои проучвания посочват ползи от PGT за реализирането на бременност (151, 152, 154, 157), други автори не откриват подобрение в честотата на имплантация и живо раждане (294, 296, 297). Verlinsky et al. доказват, че PGT е важна техника за скрининг на ембриони за генетични и хромозомни разстройства като небалансирани транслокации, моногенни болести и HLA типизиране (297, 299). Авторите посочват повишен процент на имплантация и намален процент на аборти, но няма увеличение в честотата на живо раждане.

В настоящото проучване ембриотрансфер беше осъществен при 59.46% от двойките. При 35.45% от жените беше установена биохимична бременност. Процентът на спонтанна загуба на бременността беше 3.64%. При 30.91% беше достигнато до живо раждане.

В сравнение с трите проучвания на Yang et al., Scott et al. и Forman et al. процентът на бременност и живо раждане в нашия дисертационен труд е значително по-нисък. Но трябва да се вземе предвид фактът, че пациентките в тези три проучвания са с благоприятна прогноза, докато двойките в настоящото изследване са с множество репродуктивни неблагополучия (11, 219, 303).

Данните от настоящото проучване са съизмерими с подобни проучвания при инфертилни пациенти с не толкова добра прогноза (Rubio et al., Magli et al. и Mastenbroek et al.) (293, 418, 419). Процентите на биохимична бременност и живо раждане са почти аналогични.

В групата на най-младите жени (26-30 години) имаше най-голям брой биохимични бременности и живо раждане от всички възрастови групи – съответно 42.86% и 38.10%. Във втората група процентите на биохимична бременност и живо раждане бяха 36.00% - по-малък процент от данните в първата група. Група III (36-40 години) заемаше трето място по процент на биохимични бременности и раждане – съответно 33.33% и 27.78%. Най-малък процент на реализиране на бременност и живо раждане са наблюдаваше в четвърта възрастова група, в която жените бяха с най-напреднала възраст (41-45 години) – съответно 32.14% и 25.00%. Следователно процентът на имплантация, биохимична бременност и живо раждане намалява с увеличаване на възрастта на жената.

### 9. Трансфер на мозаични ембриони

След като е установено, че повечето предимплантационни човешки ембриони са мозайки от еуплоидни и анеуплоидни клетки, възниква въпросът дали е уместно такива ембриони да бъдат трансферирани на пациентите след PGT и дали те могат да доведат до успешна бременност и раждане на здраво дете. За да се определи съдбата на анеуплоидните клетки и потенциала за развитие на мозаични ембриони, някои учени генерират миши модели на хромозомен мозаицизъм. Основно това се осъществява чрез инхибиторане делителното вретено на мишите ембриони на стадий четири до осем клетки. Ембрионите се наблюдават с Live-embryo imaging и Single-cell tracking метод, за да се види съдбата на анеуплоидните клетки. Резултатите показват, че анеуплоидните клетки във феталната клетъчна линия се елиминират чрез апоптоза, докато тези в плацентарната клетъчна линия проявяват тежки пролиферативни дефекти. Като цяло, делът на анеуплоидни клетки постепенно намалява от стадий бластоцист нататък. Това доказва, че мозаичните ембриони имат пълния потенциал за нормално развитие, при условие че съдържат достатъчно еуплоидни клетки и могат да бъдат използвани за трансфер в ин витро клиники (167).

Ембрионите с най-много нарушения не се имплантират. В редките случаи, когато те успеят да се имплантират, често водят до ранни спонтанни аборти. Хромозомните аномалии, които никога не водят до живо раждане, се смятат за летални. Почти невъзможно е бременности със летални хромозомни аномалии да продължат до термин. Трансфери на ембриони с летални хромозомни аномалии могат да бъдат извършени с презумпцията, че нормалната клетъчна линия ще доминира в последващия растеж на ембрионите и ако леталната клетъчна линия остане доминираща, ембрионът с голяма вероятност няма да се имплантира или ще настъпи ранен аборт (165, 169, 170).

Въпросът дали да се осъществи трансфер на мозаичен или анеуплоиден ембрион е сложен от етична гледна точка. От съществено значение е генетичното консултиране на пациентите и получаване на писмено информирано съгласие от пациента за трансфер на ембриони с доказани чрез PGT анеуплоидии. Трябва да се обсъди възможността, че макар и малко вероятно, съществува вероятността от евентуална бременност с хромозомно абнормен плод. Пациентите, които обмислят трансфер на небалансирани ембриони, при доказана бременност трябва да бъдат съветвани да се подложат на пренатални генетични тестове. Не трябва да се изключва възможността да се наложи медицински индуцирано прекъсване на бременността (165, 169, 170).

Еуплоидните ембриони се трансферират с приоритет. Ако не е наличен еуплоиден ембрион, е препоръчително да се извърши друг ин витро цикъл с PGT. При липса на еуплоидни ембриони и несъществуваща опция за друг ин витро цикъл, може да се обмисли възможността за трансфер на мозаични ембриони. Ембрионите с по-ниски нива на мозаична анеуплоидия под 50% са предпочитани пред тези с по-високи нива (над 50%). В случай на хаотичен мозаицизъм не се препоръчва трансфер. Мозаични анеуплоидни ембриони с повече от 70% анормални клетки се разглеждат като пълни анеуплоидии и не трябва да бъдат трансферирани, тъй като могат да доведат до неблагоприятни резултати (206, 207).

При решение за трансфер на ембрион с ниска степен на мозайка, може да се даде приоритет на селекцията въз основа на специфичната хромозома, участваща в мозайката. Ембриони, мозаични за тризомии, способни да доведат до раждане (хромозоми 13, 18, 21, 22), са с най-малък приоритет. Ембриони, мозайки за тризомии, свързани с унипарентална дизомия (хромозоми 14, 15), са с нисък приоритет. Ембриони, мозайки за тризомии, свързани с вътреутробно забавяне на растежа (хромозоми 2, 7, 16), са с нисък приоритет. Ембриони, включващи мозайки на хромозоми 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19, 20, се разглеждат като потенциален вариант за ембриотрансфер. Мозаичните монозомии се имплантират с подобна честота на мозаичните тризомии (206, 207).

За периода май 2013 г. - юли 2014 г. проучване анализира 3802 бластоцисти чрез метода на сравнителна геномна хибридизация. Хромозомен мозаицизъм е установен при 181 бластоцисти (4.8 %). На 18 жени, при които PGD с aCGH не открива нормални еуплоидни ембриони, е предоставена възможността за трансфер на мозаични ембриони. Всичките 18 жени преминават медико-генетична консултация и са посъветвани относно потенциалните последици от трансфера на ембрион мозайка. Консултирането е съобразено индивидуално с всеки пациент според вида на установената анеуплоидия в мозаичния ембрион. Получено е одобрение от Комитета по етика и е взето писмено информирано съгласие от всяка жена, преди да се стигне до трансфер и имплантация на ембриона мозайка. Всички жени избират да осъществят трансфер, като всяка от тях разполага само с по един ембрион. Постигнати са осем клинични бременности, при шест от които се достига до живо раждане. Жените преминават през задължителна пренатална диагностика чрез анализ на хорионни въси, като резултатите от всичките осем бременности показват нормални кариотипи. Това изследване показва, че някои мозаични ембриони могат да се развият в здрави еуплоидни новородени. Въпреки тези данни, към трансфера на мозаични ембриони винаги трябва да се подхожда с особено внимание (168).

В настоящия дисертационен труд на базата на горепосочените факти е изготвен критерий за подбор на ембриони за трансфер. На пациентите беше даден избор дали да се продължи с трансфер на мозаични ембриони в няколко частни случая. След обстойна медико-генетична и гинекологична консултация, от пациентите, лекарите генетици и акушер-гинеколози беше взето решение да не се трансферират мозаични ембриони.

### 10. Проверка на резултатите от PGT с хорионбиопсия или амниоцентеза

Генетичното консултиране на бъдещите родители преди началото на цикъла с PGT е от съществено значение поради сложността на процедурата, която се провежда на няколко етапа, също така да се изяснят алтернативни подходи, техническите ограничения на методиката, интерпретацията на резултатите от теста (61).

### 11. PGT в момента

През последните години бяха анализирани редица нови стратегии, които навлизат драстично в клиничната практика в сферата на ин витрото (421-423). Въпреки че основното предимство на PGT е изборът на единичен ембрион за трансфер и намаляване на броя на трансферите, няколко други фактора като потенциалното намаляване на процента на спонтанен аборт, също подкрепят преминаването към този подход в технологията за асистирана репродукция. Психологическата тежест и намаляването на разходите при прилагане на PGT са фактори, които трябва да бъдат по-добре проучени.

Преминаването през IVF с PGT-SR, PGT-M или PGT-A може да бъде пораждаща стрес процедура. Пациентите са емоционално уязвими и след няколко неуспеха често са готови да изпробват нови възможности. Прецизното консултиране е изключително важно - пациентите трябва да бъдат информирани за предимствата и недостатъците на тази техника и трябва да бъдат запознати с данните за клиничната ѝ ефективност (424).

Понастоящем съществуват данни за дългосрочните ефекти върху деца, родени след биопсия на ембриони. През 2017 г. са обобщени данните за всички извършени от 1991 г. до 2011 г. АРТ и PGT процедури във Великобритания (съответно 87 571 и 439), които са довели до живо раждане на 88 010 деца. Анализът показва, че не съществува разлика спрямо преждевременно раждане и ниско родилно тегло между родените след ART деца и родените след IVF-PGT деца. През 2019 г. е публикувана статия, която обобщава данните от проследяване на 1721 деца, родени в резултат на трофектодермална биопсия и PGT. Изводът на авторите е, че няма съществена разлика в честотата на преждевременно раждане и ниско родилно тегло между родените след PGT деца и контролната група, следователно биопсията на бластоцист може не представлява допълнителен риск за новородените (425).

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

PGT-A има потенциала да се превърне в рентабилна процедура, в случаите, в които успее да намали броя на ин витро циклите, необходими на двойка за постигане на живо раждане и намали честотата на спонтанните аборти. Това е особено вярно, ако се извършва единичен ембриотрансфер на свеж или следващ размразен цикъл (426, 427).

Въпреки че PGT-A е критикуван като скъп метод, трябва да се вземе предвид и вероятността от премахване на разходите по съхранение на непроверени замразени ембриони и прехвърляне на анеуплоидни, нежизнеспособни ембриони, което теоретично намалява времето до постигане на бременност. Следователно, оценката на рентабилността не изисква отчитане единствено на цената на PGT-A. Трябва да включват и фактори като разходите и ефективността на криосъхранението на броя останали ембриони и времето за постигане на бременност.

Важен аспект на икономическата ефективност на PGT-A, който трябва да бъде разгледан, е потенциалът за насърчаване на единичен ембриотрансфер. Forman et al. демонстрират сходен процент на постигане на бременност при трансфер на единичен, изследван чрез PGT-A ембрион, и прехвърлянето на два морфологично подбрани ембриона в два съседни цикъла. Това повишава възможността PGT-A да бъде полезна процедура за промотиране на единичен ембрион в държави по света, където това все още не е установена практика, и по този начин да намали значителните усложнения и икономическата тежест на многоплодните бременности (426, 428).

PGT е ефективен начин за увеличаване на шанса за раждане на здраво дете. PGT повишава успеваемостта на ембриотрансферите, скъсява времето за постигане на бременност и намалява риска от аборт. От друга страна се явява и икономически ефективен подход, тъй като редуцира броя на неуспешните трансфери и елиминира необходимостта от прекъсване на желана бременност по медицински индикации. Той е толкова по-малко травмиращ от аборта, че неминуемо ще се превърне във важен подход при превенцията на генетични болести и раждането на увредени деца.

Благодарение на техническия прогрес при асистираната репродукция и геномните технологии PGT има потенциала да се превърне в изключително важно оръжие в борбата ни с генетичните заболявания, като в бъдеще може да се окаже ефикасен метод дори за елиминиране на редица наследствени болести от общата популация.

## БЪДЕЩИ НАСОКИ ЗА PGT

Едно от приложенията на PGT е идентифицирането на ембриони с риск за болести с късно начало. т. нар. мултифакторни заболявания (ракови предразположения, психични болести, астма, диабет) са сложни и се дължат както на генетични, така и на фактори на средата. Болестите с генетично предразположение традиционно не се считат за индикация за пренатална диагностика, тъй като това би довело до прекратяване на бременността, което едва ли може да бъде оправдано само въз основа на генетичното предразположение.

Използването на PGT за скрининг на ембриони, носещи мутации, предразполагащи към ракови заболявания, предотвратява раждането на деца, които ще бъдат изправени пред многократно увеличен риск от рак през целия им живот и следователно се нуждаят от внимателно проследяване, профилактична операция или други превантивни мерки. Прилагането на PGT за нарушения на по-късен етап е противоречиво и не е добре проучено. Няма достатъчно доказателства в публикуваната научна литература, за да се подкрепи употребата на PGT за мултифакторни заболявания.

Редактирането на генома има потенциал за целева корекция на герминативните мутации. Ефективността, точността и безопасността на този подход предполагат, че той има потенциал да бъде използван за коригиране на наследствени мутации в човешки ембриони като допълнение към PGT. Необходимо обаче е техниката на геномно редактиране да се усъвършенства, преди да бъде приложена клинично, включително трябва да бъде изпитана успеваемостта с други хетерозиготни мутации.

С бурния тласък в развитието на технологиите и дешифрирането на човешкия геном, технически вече е възможно и генното модифициране на ембриони - CRISPR–Cas9 геномно редактиране, при което дефектен ген в ембриона се замества със здрав и се предовратява предаването на мутацията в следващото поколение. (429-431). Ефективността, точността и безопасността на този подход предполагат, че той има потенциал да бъде използван за коригиране на наследствени мутации в човешки ембриони като допълнение към ПГД.

През юли 2017 г. Mitalipov и неговият екип осъществиха първия известен успешен опит за създаване на генетично модифицирани човешки ембриони, като използваха метода CRISPR/Cas9 за коригиране на болестотворна мутация в десетки жизнеспособни човешки ембриони (429).

През октомври 2018 г. китайският учен He Jiankui съобщи за раждането на първите в света генетично модифицирани бебета - близначки, известни с псевдонимите Лулу и Нана. Той използва метода CRISPR/Cas9 за редактиране на *CCR5* гена, кодиращ протеин, чрез който HIV вирусът навлиза в клетките и по този начин създава генетично модифицирани резистентни към HIV човешки ембриони (430, 431).

## ИЗВОДИ

1. В нашето проучване се установи, че при 55.14% от двойките репродуктивните неуспехи се дължаха на причини от страна на жената с водещ фактор тубарна непроходимост (62.69%) и водещ фактор при мъжете отклонения в спермограмата (79.31%) - астенозооспермия (31.03%), тератозооспермия (27.59%) и олигозооспермия (20.69%).
2. Потвърди се, че процентът анеуплоидни ембриони нараства с увеличаване на репродуктивната възраст на майката, което съответства на литературните данни. Най-голям процент на анеуплоидии от всички ембриони, съдържащи бройни хромозомни промени, се наблюдава при групата с най-напреднала възраст – група IV (41.55%). Група III има значителен дял от анеуплоидни ембриони – 29.30%. Групи II и I заемат трето и четвърто място по честота на бройните аберации съответно с 22.31% и 6.85%.
3. Препоръчва се прилагането на PGT-A при жени в напреднала репродуктивна възраст (41-45 години), тъй като асоциира с по-висок процент на настъпване на биохимична бременност (32.14%) и живо раждане (25.00%) в сравнение с успеваемостта от класическо IVF без провеждане на PGT-A - 3,6% по литературни данни.
4. PGT-A редуцира риска от настъпване на спонтанна загуба на бременността при жени в напреднала възраст (41-45 години), като честотата на абортите в нашето проучване възлиза на 3.57%, респективно до 53% по литературни данни при IVF без провеждане на PGT-A.
5. В настоящия дисертационен труд доказахме, че PGT-SR значително увеличава шанса за настъпване на биохимична бременност (80.00%) и живо раждане (70.00%) при двойки с фамилни преустройства в сравнение с успеваемостта от класическо IVF без провеждане на PGT-SR - 18.20% - 20.00% биохимична бременност и живо раждане по литературни данни.
6. Установи се, че 24.81% от ембрионите на пациенти с фамилно преустройство са балансирани и 75.19% - небалансирани. Близо три четвърти (79.38%) от небалансираните ембриони при носители на балансирани хромозомни преустройства са засегнати от фамилното преустройство, като 55.67% са небалансирани само по майчиното/бащиното преустройство, а 23.71% имат

унаследен дисбаланс от майчиното/бащиното преустройство в комбинация с друга аберация. 20.62% от небалансираните аберации нямат връзка с фамилното преустройство.

7. При жени, носителки на балансирани транслокации, се установи 78.13% дял на небалансирани ембриони, съответно 74.58% при мъже, носители на балансирани транслокации.
8. Най-честият тип геномно нарушение бяха монозомиите (30.48%), следвани от тризомиите (22.95%), комбинацииите от монозомии и тризомии (19.52%), делециите (10.62%), комбинациите от анеуплоидии и сегментни аберации (8.22%), дупликациите (2.05%) и комбинациите от делеции и дупликации (6.16%).
9. При детайлното разпределение на хромозомите, участващи в анеуплоидии, беше установено, че най-честите хромозомни анеуплоидии, които отговаряха за 32.98% от всички анеуплоидии, засягаха хромозоми 14, 15, 16, 21 и 22. Най-честа беше бройната промяна в хромозома 16, (10.99%), следвана от хромозома 22 (9.12%) и хромозома 21 (7.24%).
10. Установихме, че процентът на мозаични анеуплоидии при небалансираните ембриони е 15.41%, като най-често срещана в мозаична форма е хромозома 14 с дял 17.78%.

## ПРИНОСИ

1. Разработени са, оптимизирани и въведени ефективни протоколи за цялостен геномен скрининг с микрочипова сравнителна геномна хибридизация и секвениране от ново поколение за разкриване на геномни нарушения в предимплантационни човешки ембриони.
2. Установи се, че PGT-A увеличава успеваемостта от IVF процедура при двойки с напреднала майчина репродуктивна възраст (41-45 години) и множество спонтанни аборти.
3. Потвърди се, че прилагането на PGT-SR при фамилни хромозомни преустройства увеличава значително шанса за постигане на успешна бременност.
4. За първи път в България е осъществено обширно проучване за определяне на честотата и типът на геномни нарушения в предимплантационни човешки ембриони.
5. Създадена е електронна база данни, съдържаща клинични данни за пациенти с репродуктивни неблагополучия и генетичен статус на техни ембриони.
6. Разработени са критерии за трансфер на приоритетни ембриони съобразно генетичния им статус.

**ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ**

Декларирам, че всички представени данни в настоящия дисертационен труд са от собствени изследвания и резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата: .................. Подпис: …………………..

гр. София /Славяна Янева Стайкова/

## ЛИТЕРАТУРНИ ИЗТОЧНИЦИ


1. Martin RH, Hulten M. Chromosome complements in 695 sperm from three men heterozygous for reciprocal translocations, and a review of the literature. Hereditas. 1993;118(2):165-75.

2. Goossens V, Traeger-Synodinos J, Coonen E, De Rycke M, Moutou C, Pehlivan T, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XI: cycles from January to December 2008 with pregnancy follow-up to October 2009. Hum Reprod. 2012 Jul;27(7):1887-911.

3. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. Hum Reprod Update. 2012 May-Jun;18(3):234-47.

4. EURODIS. Rare Diseases: understanding this Public Health Priority: EURODIS: European Organization for Rare Diseases; November 2005. Available from: www.eurordis.org.

5. Spinella F, Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Ruberti A, Cotroneo E, et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. Fertil Steril. 2018 Jan;109(1):77-83.

6. Popescu F, Jaslow CR, Kutteh WH. Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. Hum Reprod. 2018 Mar 12.

7. Embryology ESoHRa. "More than 8 million babies born from IVF since the world's first in 1978". ScienceDaily. 3 July 2018.

8. Faddy MJ, Gosden MD, Gosden RG. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. Reprod Biomed Online. 2018 Apr;36(4):455-8.

9. Fertility treatment 2014–2016 – Trends and figures [database on the Internet]2018. Available from: https://www.hfea.gov.uk/.

10. Scott KL, Hong KH, Scott RT, Jr. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. Fertil Steril. 2013 Sep;100(3):608-14.

11. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. Mol Cytogenet. 2012 May 2;5(1):24.

12. Simpson JL. Changing indications for preimplantation genetic diagnosis (PGD). Mol Cell Endocrinol. 2001 Oct 22;183 Suppl 1:S69-75.

13. Brezina PR, Ke RW, Kutteh WH. Preimplantation genetic screening: a practical guide. Clin Med Insights Reprod Health. 2013 Feb 27;7:37-42.

14. Cooper AR, Jungheim ES. Preimplantation genetic testing: indications and controversies. Clin Lab Med. 2010 Sep;30(3):519-31.

15. Karatas JC, Strong KA, Barlow-Stewart K, McMahon C, Meiser B, Roberts C. Psychological impact of preimplantation genetic diagnosis: a review of the literature. Reprod Biomed Online. 2010 Jan;20(1):83-91.

16. Lavery SA, Aurell R, Turner C, Castello C, Veiga A, Barri PN, et al. Preimplantation genetic diagnosis: patients' experiences and attitudes. Hum Reprod. 2002 Sep;17(9):2464-7.

17. Tur-Kaspa I. Clinical management of in vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis. Semin Reprod Med. 2012 Aug;30(4):309-22.

18. Knoppers BM, Bordet S, Isasi RM. Preimplantation genetic diagnosis: an overview of socio-ethical and legal considerations. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2006;7:201-21.

19. Damian BB, Bonetti TC, Horovitz DD. Practices and ethical concerns regarding preimplantation diagnosis. Who regulates preimplantation genetic diagnosis in Brazil? Braz J Med Biol Res. 2015 Jan;48(1):25-33.

20. Fragouli E. Next generation sequencing for preimplantation genetic testing for aneuploidy: friend or foe? Fertil Steril. 2018 Apr;109(4):606-7.

21. Edwards RG, Gardner RL. Sexing of live rabbit blastocysts. Nature. 1967 May 6;214(5088):576-7.

22. Prenatal diagnosis in the human pre-implantation period. Meeting held at the Ciba Foundation on the 13th November 1986. 1987 April, 1987.

23. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. Nature. 1990 Apr 19;344(6268):768-70.

24. Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. N Engl J Med. 1992 Sep 24;327(13):905-9.

25. Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. Hum Reprod. 1990 Oct;5(7):826-9.

26. Griffin DK, Handyside AH, Harper JC, Wilton LJ, Atkinson G, Soussis I, et al. Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. J Assist Reprod Genet. 1994 Mar;11(3):132-43.

27. Munne S, Weier HU, Stein J, Grifo J, Cohen J. A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. J Assist Reprod Genet. 1993 Jan;10(1):82-90.

28. Munne S, Tang YX, Grifo J, Rosenwaks Z, Cohen J. Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization. Fertil Steril. 1994 Jan;61(1):111-7.

29. Garvin SE, Chatzicharalampous C, Puscheck E. Reflections on preimplantation genetic testing for aneuploidy and mosaicism: how did we get here, and what does it mean clinically? Fertil Steril. 2019 Jan;111(1):45-7.

30. Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. Hum Reprod. 1998 Nov;13(11):3169-76.

31. Tur-Kaspa IB, A. / Tkachenko, N. / Pawlovska, J. / Rechitsky, S. / Verlinsky, Y. / American Society for Reproductive Medicine. To PGD or not to PGD: is there a magic number of oocytes to start with?: Elsevier; 2007.

32. Verpoest W, Haentjens P, De Rycke M, Staessen C, Sermon K, Bonduelle M, et al. Cumulative reproductive outcome after preimplantation genetic diagnosis: a report on 1498 couples. Hum Reprod. 2009 Nov;24(11):2951-9.

33. Hu X, Wang J, Li Y, Wang Y, Ding C, Zeng Y, et al. Clinical Considerations of Preimplantation Genetic Diagnosis for Monogenic Diseases. PLoS One. 2015;10(9):e0139613.

34. Loutradis D, Drakakis P, Vomvolaki E, Antsaklis A. Different ovarian stimulation protocols for women with diminished ovarian reserve. J Assist Reprod Genet. 2007 Dec;24(12):597-611.

35. What type of evidence is currently being considered in the development of clinical practice guidelines for rare diseases? Executive summary of rapid report V10-01, Version 1.0. 2005.

36. al. Ae. Reproductive endocrinology, surgery, and technology. (Philadelphia) L-R, editor1996.

37. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet. 1992 Jul 4;340(8810):17-8.

38. Van Steirteghem A. Celebrating ICSI's twentieth anniversary and the birth of more than 2.5 million children--the 'how, why, when and where'. Hum Reprod. 2012 Jan;27(1):1-2.

39. Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, Warner L, Kawwass JF, Jamieson DJ. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection. JAMA. 2015 Jan 20;313(3):255-63.

40. French DB, Sabanegh ES, Jr., Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? Fertil Steril. 2010 Mar 1;93(4):1097-103.

41. Delhanty JD. Is the polar body approach best for pre-implantation genetic screening? Placenta. 2011 Sep;32 Suppl 3:S268-70.

42. Wei Y, Schatten H, Sun QY. Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. Hum Reprod Update. 2015 Mar-Apr;21(2):194-208.

43. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. Hum Reprod. 1992 May;7(5):685-91.

44. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RM, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. Hum Reprod. 1990 Aug;5(6):708-14.

45. Gardner RL, Edwards RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. Nature. 1968 Apr 27;218(5139):346-9.

46. Grifo JA, Tang YX, Cohen J, Gilbert F, Sanyal MK, Rosenwaks Z. Pregnancy after embryo biopsy and coamplification of DNA from X and Y chromosomes. JAMA. 1992 Aug 12;268(6):727-9.

47. Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. Hum Reprod. 2002 Feb;17(2):413-9.

48. Christodoulou C, Dheedene A, Heindryckx B, van Nieuwerburgh F, Deforce D, De Sutter P, et al. Preimplantation genetic diagnosis for chromosomal rearrangements with the use of array comparative genomic hybridization at the blastocyst stage. Fertil Steril. 2017 Jan;107(1):212-9 e3.

49. D.K. G, A. W, C. H, Z. S. Textbook of assisted reproductive techniques – laboratory and clinical perspectives: Martin Dunitz; 2002.

50. Dokras A, Sargent IL, Gardner RL, Barlow DH. Human trophectoderm biopsy and secretion of chorionic gonadotrophin. Hum Reprod. 1991 Nov;6(10):1453-9.

51. Schattman GL. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: another fact that cannot be ignored. Fertil Steril. 2018 Jan;109(1):54-5.

52. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum Reprod. 1992 Jun;7 Suppl 1:101-6.

53. Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, Martinez S, Navarro R, Peinado V, et al. Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. Hum Reprod. 2018 Apr 1;33(4):745-56.

54. Farra C, Choucair F, Awwad J. Non-invasive pre-implantation genetic testing of human embryos: an emerging concept. Hum Reprod. 2018 Dec 1;33(12):2162-7.

55. Mains L, Van Voorhis BJ. Optimizing the technique of embryo transfer. Fertil Steril. 2010 Aug;94(3):785-90.

56. Gergely RZ, DeUgarte CM, Danzer H, Surrey M, Hill D, DeCherney AH. Three dimensional/four dimensional ultrasound-guided embryo transfer using the maximal implantation potential point. Fertil Steril. 2005 Aug;84(2):500-3.

57. Dar S, Lazer T, Shah PS, Librach CL. Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update. 2014 May-Jun;20(3):439-48.

58. Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F, Wilson RD, Brock JA, Campagnolo C, et al. Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. J Obstet Gynaecol Can. 2015 May;37(5):451-63.

59. Audibert F, Wilson RD, Allen V, Blight C, Brock JA, Desilets VA, et al. Preimplantation genetic testing. J Obstet Gynaecol Can. 2009 Aug;31(8):761-75.

60. Baruch S, Kaufman D, Hudson KL. Genetic testing of embryos: practices and perspectives of US in vitro fertilization clinics. Fertil Steril. 2008 May;89(5):1053-8.

61. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. Fertil Steril. 2008 Nov;90(5 Suppl):S136-43.

62. Rechitsky S, Verlinsky O, Amet T, Rechitsky M, Kouliev T, Strom C, et al. Reliability of preimplantation diagnosis for single gene disorders. Mol Cell Endocrinol. 2001 Oct 22;183 Suppl 1:S65-8.

63. Yaron Y, Gamzu R, Malcov M. Genetic analysis of the embryo. London: Informa. 2009;3(Textbook of assisted reproductive technologies):403-16.

64. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. Hum Reprod. 2009 May;24(5):1221-8.

65. Тончева Д, Ганев В. Геномна медицина. София: Симел Прес; 2015.

66. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. Nature. 1959 Jan 31;183(4657):302-3.

67. Lejeune J, Gauthier M, Turpin R. Les chromosomes humains en culture de tissus. C R Hebd Seances Acad Sci. 1959:248:602–3.

68. Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA. The somatic chromosomes in mongolism. Lancet. 1959 Apr 4;1(7075):710.

69. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat Rev Genet. 2001 Apr;2(4):280-91.

70. Nagaoka SI, Hassold TJ, Hunt PA. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. Nat Rev Genet. 2012 Jul;13(7):493-504.

71. Pellestor F, Anahory T, Lefort G, Puechberty J, Liehr T, Hedon B, et al. Complex chromosomal rearrangements: origin and meiotic behavior. Hum Reprod Update. 2011 Jul-Aug;17(4):476-94.

72. Lespinasse J, North MO, Paravy C, Brunel MJ, Malzac P, Blouin JL. A balanced complex chromosomal rearrangement (BCCR) in a family with reproductive failure. Hum Reprod. 2003 Oct;18(10):2058-66.

73. Machin GA. Chromosome Abnormality and Perinatal Death. Persaud TVN, editor: Springer, Dordrecht; 1974.

74. Current status of cystic fibrosis carrier screening. ACOG Committee Opinion No. 101. ACOG Comm Opin. 1991 Nov;No. 101:2 p.

75. Batista DA, Pai GS, Stetten G. Molecular analysis of a complex chromosomal rearrangement and a review of familial cases. Am J Med Genet. 1994 Nov 15;53(3):255-63.

76. Gorski JL, Kistenmacher ML, Punnett HH, Zackai EH, Emanuel BS. Reproductive risks for carriers of complex chromosome rearrangements: analysis of 25 families. Am J Med Genet. 1988 Feb;29(2):247-61.

77. McKusick D. Demographic issues in Medicare reform. Health Aff (Millwood). 1999 Jan-Feb;18(1):194-207.

78. Gelehrter T, Collins F, Ginsburg D. Principles of Medical Genetics, Second Edition. Williams & Wilkins ed1998.

79. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O. Preimplantation diagnosis for p53 tumor suppressor gene mutations. . Reproductive BioMedicine Online. 2001;2:102-5.

80. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O. Preimplantation diagnosis for neurofibromatosis. Reproductive BioMedicine Online. 2002;4:218-22.

81. Cram D. Preimplantation genetic diagnosis for familial cancer. Reprod Biomed Online. 2001;3(1):3-4.

82. Simpson JL. Celebrating preimplantation genetic diagnosis of p53 mutations in Li-Fraumeni syndrome. Reprod Biomed Online. 2001;3(1):2-3.

83. Malcov M, Ben-Yosef D, Amit A, Yaron Y. [Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for cancer predisposition syndromes]. Harefuah. 2011 Jun;150(6):496-501, 53.

84. Spits C, De Rycke M, Van Ranst N, Verpoest W, Lissens W, Van Steirteghem A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition syndromes. Prenat Diagn. 2007 May;27(5):447-56.

85. Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokhina A, Sharapova T, Ozen S, Masciangelo C, et al. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. Reprod Biomed Online. 2002 Sep-Oct;5(2):148-55.

86. Rosenwaks Z, Handyside AH, Fiorentino F, Gleicher N, Paulson RJ, Schattman GL, et al. The pros and cons of preimplantation genetic testing for aneuploidy: clinical and laboratory perspectives. Fertil Steril. 2018 Aug;110(3):353-61.

87. Verlinsky Y, Kuliev A. Practical Preimplantation Genetic Diagnosis. London: Springer-Verlag London; 2005.

88. Deng J, Peng WL, Li J, Fang C, Liang XY, Zeng YH, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis for alpha- and beta-thalassemia in China. Prenat Diagn. 2006 Nov;26(11):1021-8.

89. Rechitsky S, Verlinsky O, Kuliev A. PGD for cystic fibrosis patients and couples at risk of an additional genetic disorder combined with 24-chromosome aneuploidy testing. Elsevier, Reprod Biomed Online. 2013 2013 May;26.

90. Ozge A, Safak H, Ebru H, Evrim U, Bilge SE, Leyla O, et al. First successful preimplantation genetic diagnosis of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: case study of a novel c.4505-4508insACTC mutation. J Assist Reprod Genet. 2012 Apr;29(4):347-52.

91. Vendrell X, Bautista-Llácer R, Alberola TM, García-Mengual E, Pardo M, Urries A, et al. Pregnancy after PGD for recessive dystrophic epidermolysisbullosa inversa: genetics and preimplantation genetics. J Assist Reprod Genet, Springer Science+Business Media, LLC 2011. 2011 2011:28:825–32.

92. Lavery S, Abdo D, Kotrotsou M, Trew G, Konstantinidis M, Wells D. Successful Live Birth following Preimplantation Genetic Diagnosis for Phenylketonuria in Day 3 Embryos by Specific Mutation Analysis and Elective Single Embryo Transfer. JIMD Rep. 2013;7:49-54.

93. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, Strom C, Kuliev A. Preimplantation testing for phenylketonuria. Fertil Steril. 2001 Aug;76(2):346-9.

94. Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, et al. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. Prenat Diagn. 2001 Mar;21(3):223-32.

95. Dean NL, Tan SL, Ao A. The development of preimplantation genetic diagnosis for myotonic dystrophy using multiplex fluorescent polymerase chain reaction and its clinical application. Mol Hum Reprod. 2001 Sep;7(9):895-901.

96. Schulman JD, Stern HJ. Low utilization of prenatal and pre-implantation genetic diagnosis in Huntington disease - risk discounting in preventive genetics. Clin Genet. 2015 Sep;88(3):220-3.

97. Van Rij MC, De Rademaeker M, Moutou C, Dreesen JC, De Rycke M, Liebaers I, et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for Huntington's disease: the experience of three European centres. Eur J Hum Genet. 2012 Apr;20(4):368-75.

98. Chow JF, Yeung WS, Lau EY, Lam ST, Tong T, Ng EH, et al. Singleton birth after preimplantation genetic diagnosis for Huntington disease using whole genome amplification. Fertil Steril. 2009 Aug;92(2):828 e7-10.

99. Chen M, Zhao M, Lee CG, Chong SS. Identification of microsatellite markers <1 Mb from the FMR1 CGG repeat and development of a single-tube tetradecaplex PCR panel of highly polymorphic markers for preimplantation genetic diagnosis of fragile X syndrome. Genet Med. 2016 Sep;18(9):869-75.

100. Kieffer E, Nicod JC, Gardes N, Kastner C, Becker N, Celebi C, et al. Improving preimplantation genetic diagnosis for Fragile X syndrome: two new powerful single-round multiplex indirect and direct tests. Eur J Hum Genet. 2016 Feb;24(2):221-7.

101. Verdyck P, Berckmoes V, De Vos A, Verpoest W, Liebaers I, Bonduelle M, et al. Chromosome fragility at FRAXA in human cleavage stage embryos at risk for fragile X syndrome. Am J Med Genet A. 2015 Oct;167A(10):2306-13.

102. Malcov M, Naiman T, Yosef DB, Carmon A, Mey-Raz N, Amit A, et al. Preimplantation genetic diagnosis for fragile X syndrome using multiplex nested PCR. Reprod Biomed Online. 2007 Apr;14(4):515-21.

103. Nayot D, Chung JT, Son WY, Ao A, Hughes M, Dahan MH. Live birth following serial vitrification of embryos and PGD for fragile X syndrome in a patient with the premutation and decreased ovarian reserve. J Assist Reprod Genet. 2013 Nov;30(11):1439-44.

104. Lavery S. Preimplantation genetic diagnosis of haemophilia. Br J Haematol. 2009 Feb;144(3):303-7.

105. Michaelides K, Tuddenham EG, Turner C, Lavender B, Lavery SA. Live birth following the first mutation specific pre-implantation genetic diagnosis for haemophilia A. Thromb Haemost. 2006 Feb;95(2):373-9.

106. Laurie AD, Hill AM, Harraway JR, Fellowes AP, Phillipson GT, Benny PS, et al. Preimplantation genetic diagnosis for hemophilia A using indirect linkage analysis and direct genotyping approaches. J Thromb Haemost. 2010 April 2010:8(4):783-9.

107. Fernández R, Peciña A, Sánchez B, Lozano-Arana M, García-Lozano J, Pérez-Garrido R, et al. Experience of Preimplantation Genetic Diagnosis for Hemophilia at the University Hospital Virgen Del Rocío in Spain: Technical and Clinical Overview. Biomed Res Int. 2015.

108. Sallevelt SC, Dreesen JC, Drusedau M, Spierts S, Coonen E, van Tienen FH, et al. Preimplantation genetic diagnosis in mitochondrial DNA disorders: challenge and success. J Med Genet. 2013 Feb;50(2):125-32.

109. Treff NR, Campos J, Tao X, Levy B, Ferry KM, Scott RT, Jr. Blastocyst preimplantation genetic diagnosis (PGD) of a mitochondrial DNA disorder. Fertil Steril. 2012 Nov;98(5):1236-40.

110. Hellebrekers DM, Wolfe R, Hendrickx AT, de Coo IF, de Die CE, Geraedts JP, et al. PGD and heteroplasmic mitochondrial DNA point mutations: a systematic review estimating the chance of healthy offspring. Hum Reprod Update. 2012 Jul;18(4):341-9.

111. Davis LB, Champion SJ, Fair SO, Baker VL, Garber AM. A cost-benefit analysis of preimplantation genetic diagnosis for carrier couples of cystic fibrosis. Fertil Steril. 2010 Apr;93(6):1793-804.

112. Vendrell X, Bautista-Llacer R, Alberola TM, Garcia-Mengual E, Pardo M, Urries A, et al. Pregnancy after PGD for recessive dystrophic epidermolysis bullosa inversa: genetics and preimplantation genetics. J Assist Reprod Genet. 2011 Sep;28(9):825-32.

113. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, al e. Preimplantation diagnosis for p53 tumor suppressor gene mutations. ReprodBioMedOnline. 2001(2):102-5.

114. De Rycke M, Belva F, Goossens V, Moutou C, SenGupta SB, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XIII: cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. Hum Reprod. 2015 Aug;30(8):1763-89.

115. Rechitsky S, Kuliev A, Tur-Kaspa I, Morris R, Verlinsky Y. Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. Reprod Biomed Online. 2004 Aug;9(2):210-21.

116. Hu L, Cheng D, Gong F, Lu C, Tan Y, Luo K, et al. Reciprocal Translocation Carrier Diagnosis in Preimplantation Human Embryos. EBioMedicine. 2016 Dec;14:139-47.

117. Goncalves RO, Santos WV, Sarno M, Cerqueira BA, Goncalves MS, Costa OL. Chromosomal abnormalities in couples with recurrent first trimester abortions. Rev Bras Ginecol Obstet. 2014 Mar;36(3):113-7.

118. Testart J, Gautier E, Brami C, Rolet F, Sedbon E, Thebault A. Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. Hum Reprod. 1996 Dec;11(12):2609-12.

119. 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 Mar;13(3):576-82.

120. van der Ven K, Peschka B, Montag M, Lange R, Schwanitz G, van der Ven HH. Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1998 Jan;13(1):48-54.

121. Zhang L, Wei D, Zhu Y, Jiang W, Xia M, Li J, et al. Interaction of acrocentric chromosome involved in translocation and sex of the carrier influences the proportion of alternate segregation in autosomal reciprocal translocations. Hum Reprod. 2019 Feb 1;34(2):380-7.

122. Iews M, Tan J, Taskin O, Alfaraj S, AbdelHafez FF, Abdellah AH, et al. Does preimplantation genetic diagnosis improve reproductive outcome in couples with recurrent pregnancy loss owing to structural chromosomal rearrangement? A systematic review. Reprod Biomed Online. 2018 Jun;36(6):677-85.

123. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castillon G, Guillen A, Vidal C, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. Fertil Steril. 2017 May;107(5):1122-9.

124. Harris DJ, Hankins L, Begleiter ML. Reproductive risk of t(13q14q) carriers: case report and review. Am J Med Genet. 1979;3(2):175-81.

125. Hasanzadeh-NazarAbadi M, Baghbani F, Namazi I, Mirzaee S. Robertsonian translocation between chromosomes (no.21/14) in relation to the history of spontaneous abortion in a family. Iran J Reprod Med. 2014 Aug;12(8):581-5.

126. Engels H, Eggermann T, Caliebe A, Jelska A, Schubert R, Schuler HM, et al. Genetic counseling in Robertsonian translocations der(13;14): frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. Am J Med Genet A. 2008 Oct 15;146A(20):2611-6.

127. Shefi S, Raviv G, Rienstein S, Barkai G, Aviram-Goldring A, Levron J. Fish based preimplantation genetic diagnosis to prevent DiGeorge syndrome. J Assist Reprod Genet. 2009 Jul;26(7):411-3.

128. McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. Dev Disabil Res Rev. 2008;14(1):69-74.

129. Vanneste E, Melotte C, Debrock S, D'Hooghe T, Brems H, Fryns JP, et al. Preimplantation genetic diagnosis using fluorescent in situ hybridization for cancer predisposition syndromes caused by microdeletions. Hum Reprod. 2009 Jun;24(6):1522-8.

130. Arnedo N, Nogues C, Bosch M, Templado C. Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation. Hum Reprod. 2005 Feb;20(2):462-8.

131. Iwarsson E, Ahrlund-Richter L, Inzunza J, Fridstrom M, Rosenlund B, Hillensjo T, et al. Preimplantation genetic diagnosis of DiGeorge syndrome. Mol Hum Reprod. 1998 Sep;4(9):871-5.

132. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, Moutou C, SenGupta S, Traeger-Synodinos J, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. Hum Reprod. 2011 Jan;26(1):33-40.

133. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Fertil Steril. 2002 Sep;78(3):543-9.

134. Munne S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. Reprod Biomed Online. 2006 Feb;12(2):234-53.

135. Popovic M, Dhaenens L, Taelman J, Dheedene A, Bialecka M, De Sutter P, et al. Extended in vitro culture of human embryos demonstrates the complex nature of diagnosing chromosomal mosaicism from a single trophectoderm biopsy. Hum Reprod. 2019 Apr 1;34(4):758-69.

136. Bowen P, Lee CS. Spontaneous abortion. Chromosome studies on 41 cases and an analysis of maternal age and duration of pregnancy in relation to karyotype. Am J Obstet Gynecol. 1969 Aug 1;104(7):973-83.

137. Boue J, Boue A, Lazar P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. 1975. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2013 Jul;97(7):471-86.

138. Niroumanesh S, Mehdipour P, Farajpour A, Darvish S. A cytogenetic study of couples with repeated spontaneous abortions. Ann Saudi Med. 2011 Jan-Feb;31(1):77-9.

139. Kajii T, Ferrier A, Niikawa N, Takahara H, Ohama K, Avirachan S. Anatomic and chromosomal anomalies in 639 spontaneous abortuses. Hum Genet. 1980;55(1):87-98.

140. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, et al. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet. 1980 Oct;44(Pt 2):151-78.

141. Lin CC, De Braekeleer M, Jamro H. Cytogenetic studies in spontaneous abortion: the Calgary experience. Can J Genet Cytol. 1985 Oct;27(5):565-70.

142. Dejmek J, Vojtassak J, Malova J. Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from south Slovakia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1992 Sep 23;46(2-3):129-36.

143. Kim JW, Lee WS, Yoon TK, Seok HH, Cho JH, Kim YS, et al. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. BMC Med Genet. 2010;11:153.

144. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. Morphological and cytogenetic assessment of cleavage and blastocyst stage embryos. Mol Hum Reprod. 2014 Feb;20(2):117-26.

145. Menasha J, Levy B, Hirschhorn K, Kardon NB. Incidence and spectrum of chromosome abnormalities in spontaneous abortions: new insights from a 12-year study. Genet Med. 2005 Apr;7(4):251-63.

146. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. Fertil Steril. 2007 Mar;87(3):534-41.

147. Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. Reprod Biomed Online. 2007 May;14(5):628-34.

148. Victor AR, Griffin DK, Brake AJ, Tyndall JC, Murphy AE, Lepkowsky LT, et al. Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophectoderm biopsy and blastocyst. Hum Reprod. 2019 Jan 1;34(1):181-92.

149. Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. Hum Reprod. 1993 Dec;8(12):2185-91.

150. Fiorentino F, Bono S, Biricik A, Nuccitelli A, Cotroneo E, Cottone G, et al. Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. Hum Reprod. 2014 Dec;29(12):2802-13.

151. Pehlivan T, Rubio C, Rodrigo L, Romero J, Remohi J, Simon C, et al. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. Reprod Biomed Online. 2003 Mar;6(2):232-7.

152. Rubio C, Rodrigo L, Perez-Cano I, Mercader A, Mateu E, Buendia P, et al. FISH screening of aneuploidies in preimplantation embryos to improve IVF outcome. Reprod Biomed Online. 2005 Oct;11(4):497-506.

153. Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakisn K, Cengiz G, et al. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. Hum Reprod. 2000 Sep;15(9):2003-7.

154. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trengia V, Farfalli V, et al. The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. Reprod Biomed Online. 2005 May;10(5):633-40.

155. Ao A, Jin S, Rao D, Son WY, Chian RC, Tan SL. First successful pregnancy outcome after preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in embryos generated from natural-cycle in vitro fertilization combined with an in vitro maturation procedure. Fertil Steril. 2006 May;85(5):1510 e9-11.

156. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. Reprod Biomed Online. 2003 Jul-Aug;7(1):91-7.

157. Munne S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. Hum Reprod. 1999 Sep;14(9):2191-9.

158. Medicine ASfR. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. Fertil Steril. 2018(109):429:36.

159. Morin SJ, Eccles J, Iturriaga A, Zimmerman RS. Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. Fertil Steril. 2017 Jan;107(1):19-26.

160. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. Fertil Steril. 2014 Mar;101(3):656-63 e1.

161. Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. Fertil Steril. 2017 May;107(5):1107-12.

162. Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. Hum Reprod. 2011 Feb;26(2):480-90.

163. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM, Griffin DK. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. Hum Reprod Update. 2014 Jul-Aug;20(4):571-81.

164. Munne S, Blazek J, Large M, Martinez-Ortiz PA, Nisson H, Liu E, et al. Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. Fertil Steril. 2017 Jul;108(1):62-71 e8.

165. Bazrgar M, Gourabi H, Valojerdi MR, Yazdi PE, Baharvand H. Self-correction of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos and embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2013 Sep 1;22(17):2449-56.

166. Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van Opstal D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ, et al. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. Hum Reprod. 2010 Aug;25(8):1916-26.

167. Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N, Kumar P, Theunis K, Fernandez Gallardo E, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. Nat Commun. 2016;7:11165.

168. Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. N Engl J Med. 2015 Nov 19;373(21):2089-90.

169. Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. Fertil Steril. 2009 Sep;92(3):890-6.

170. van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Heineman MJ, van der Veen F, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. Hum Reprod Update. 2011 Sep-Oct;17(5):620-7.

171. CoGen position statement on Chromosomal MosaicismDetected in Preimplantation Blastocyst Biopsies.

172. Pinborg A. IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. Hum Reprod Update. 2005 Nov-Dec;11(6):575-93.

173. Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. N Engl J Med. 2004 Dec 2;351(23):2392-402.

174. Maheshwari A, Griffiths S, Bhattacharya S. Global variations in the uptake of single embryo transfer. Hum Reprod Update. 2011 Jan-Feb;17(1):107-20.

175. Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Jul 29(7):CD003416.

176. Ubaldi FM, Capalbo A, Colamaria S, Ferrero S, Maggiulli R, Vajta G, et al. Reduction of multiple pregnancies in the advanced maternal age population after implementation of an elective single embryo transfer policy coupled with enhanced embryo selection: pre- and post-intervention study. Hum Reprod. 2015 Sep;30(9):2097-106.

177. Alteri A, Corti L, Sanchez AM, Rabellotti E, Papaleo E, Vigano P. Assessment of pre-implantation genetic testing for embryo aneuploidies: A SWOT analysis. Clin Genet. 2019 Apr;95(4):479-87.

178. Lee E, Chambers GM, Hale L, Illingworth P, Wilton L. Assisted reproductive technology (ART) cumulative live birth rates following preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy (PGD-A) or morphological assessment of embryos: A cohort analysis. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2018 Oct;58(5):525-32.

179. Frost M, Condon JT. The psychological sequelae of miscarriage: a critical review of the literature. Aust N Z J Psychiatry. 1996 Feb;30(1):54-62.

180. O'Leary J. Grief and its impact on prenatal attachment in the subsequent pregnancy. Arch Womens Ment Health. 2004 Feb;7(1):7-18.

181. Stern HJ. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. J Clin Med. 2014;3(1):280-309.

182. Traeger-Synodinos JC, Goossens EV. Data from ESHRE PGD Consortium. Human Reproduction. 2013(28, S1).

183. Grifo JA, Boyle A, Fischer E, Lavy G, DeCherney AH, Ward DC, et al. Preembryo biopsy and analysis of blastomeres by in situ hybridization. Am J Obstet Gynecol. 1990 Dec;163(6 Pt 1):2013-9.

184. Munne S. Micromanipulation of gametes and embryos: Biopsy of a blastomere from an 8-cell human embryo. Hum Reprod Update. 1997 Sep-Oct;3(5):529.

185. Munne S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, et al. Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. Hum Reprod. 1997 Apr;12(4):780-4.

186. Munne S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. Biol Reprod. 1994 Sep;51(3):373-9.

187. Kallioniemi A, Visakorpi T, Karhu R, Pinkel D, Kallioniemi OP. Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization. Methods. 1996 Feb;9(1):113-21.

188. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jun 15;89(12):5321-5.

189. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. Am J Hum Genet. 1995 Nov;57(5):1211-20.

190. Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. Mol Hum Reprod. 2000 Nov;6(11):1055-62.

191. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet. 1998 Oct;20(2):207-11.

192. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer. 1997 Dec;20(4):399-407.

193. de Ravel TJ, Devriendt K, Fryns JP, Vermeesch JR. What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH). Eur J Pediatr. 2007 Jul;166(7):637-43.

194. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. Nucleic Acids Res. 1999 Feb 15;27(4):1214-8.

195. Wilton L, Williamson R, McBain J, Edgar D, Voullaire L. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridization. N Engl J Med. 2001 Nov 22;345(21):1537-41.

196. Hui P. Next generation sequencing: chemistry, technology and applications. Top Curr Chem. 2014;336:1-18.

197. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2014 Oct;12(5):190-7.

198. Ma Y, Shi N, Li M, Chen F, Niu H. Applications of Next-generation Sequencing in Systemic Autoimmune Diseases. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2015 Aug;13(4):242-9.

199. Lin B, Wang J, Cheng Y. Recent Patents and Advances in the Next-Generation Sequencing Technologies. Recent Pat Biomed Eng. 2008;2008(1):60-7.

200. Sam LT, Lipson D, Raz T, Cao X, Thompson J, Milos PM, et al. A comparison of single molecule and amplification based sequencing of cancer transcriptomes. PLoS One. 2011 Mar 1;6(3):e17305.

201. Stranneheim H, Lundeberg J. Stepping stones in DNA sequencing. Biotechnol J. 2012 Sep;7(9):1063-73.

202. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008 Oct;26(10):1135-45.

203. Niedringhaus TP, Milanova D, Kerby MB, Snyder MP, Barron AE. Landscape of next-generation sequencing technologies. Anal Chem. 2011 Jun 15;83(12):4327-41.

204. Pavlov I, Ivanova M. Next-generation sequencing: overview of the sequencing technology and application in tissue typing and molecular diagnostics of myeloid neoplasms2016.

205. Friedenthal J, Maxwell SM, Munne S, Kramer Y, McCulloh DH, McCaffrey C, et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. Fertil Steril. 2018 Apr;109(4):627-32.

206. COGEN Position Statement on Chromosomal Mosaicism Detected in Preimplantation Blastocyst Biopsies. VirtualAcademyOfGenetics.

207. https://www.remembryo.com/mosaic-embryo/.

208. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? J Assist Reprod Genet. 2016 Jul;33(7):823-32.

209. Mamas T, Gordon A, Brown A, Harper J, Sengupta S. Detection of aneuploidy by array comparative genomic hybridization using cell lines to mimic a mosaic trophectoderm biopsy. Fertil Steril. 2012 Apr;97(4):943-7.

210. Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, Taylor D, Scott RT, Jr. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. Fertil Steril. 2012 Apr;97(4):819-24.

211. Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Spizzichino L, Cotroneo E, Cottone G, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. Fertil Steril. 2014 May;101(5):1375-82.

212. Zheng H, Jin H, Liu L, Liu J, Wang WH. Application of next-generation sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of human preimplantation embryos. Mol Cytogenet. 2015;8:38.

213. Munne S, Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. Fertil Steril. 2017 May;107(5):1085-91.

214. Keltz MD, Vega M, Sirota I, Lederman M, Moshier EL, Gonzales E, et al. Preimplantation genetic screening (PGS) with Comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages. J Assist Reprod Genet. 2013 Oct;30(10):1333-9.

215. Alikani M, Go KJ, McCaffrey C, McCulloh DH. Comprehensive evaluation of contemporary assisted reproduction technology laboratory operations to determine staffing levels that promote patient safety and quality care. Fertil Steril. 2014 Nov;102(5):1350-6.

216. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. Hum Reprod. 2013 Feb;28(2):509-18.

217. Christopikou D, Handyside AH. Questions about the accuracy of polar body analysis for preimplantation genetic screening. Hum Reprod. 2013:28(6):1732-3.

218. Fragouli E, Wells D. Aneuploidy screening for embryo selection. Semin Reprod Med. 2012 Aug;30(4):289-301.

219. Scott RT, Jr., Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. Fertil Steril. 2013 Sep;100(3):697-703.

220. DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D, DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. Fertil Steril. 2008 Oct;90(4):1049-54.

221. Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A, Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. Fertil Steril. 2005 Nov;84(5):1395-400.

222. Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. Prenat Diagn. 1998 Dec;18(13):1389-401.

223. Harton GL, Munne S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, et al. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. Fertil Steril. 2013 Dec;100(6):1695-703.

224. Pratesa R, Jordana A, Goodalla N, Tortoriellob D, Kiltzc R, Jaroudid S. Multiple advantages of blastocyst versus cleavage stage biopsy for preimplantation genetic diagnosis (PGD) of single gene disorders. Fertil Steril. 2013;100(3 ):S84.

225. Fragouli, Alfarawati, Daphnis, Goodall, Mania, Griffiths, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. Hum Reprod. 2011;26(2):480-90.

226. Adler A, Lee HL, McCulloh DH, Ampeloquio E, Clarke-Williams M, Wertz BH, et al. Blastocyst culture selects for euploid embryos: comparison of blastomere and trophectoderm biopsies. Reprod Biomed Online. 2014 Apr;28(4):485-91.

227. Hodes-Wertz, Grifo, Ghadir, Kaplan, Laskin, Glassner, et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. Fertil Steril. 2012:98(3):675-80.

228. Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendia P, Mateu E, Milan-Sanchez M, et al. False positive rate of an arrayCGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. J Assist Reprod Genet. 2013 Jan;30(1):143-9.

229. Sher G, Keskintepe L, Keskintepe M, Ginsburg M, Maassarani G, Yakut T, et al. Oocyte karyotyping by comparative genomic hybridization [correction of hybrydization] provides a highly reliable method for selecting "competent" embryos, markedly improving in vitro fertilization outcome: a multiphase study. Fertil Steril. 2007 May;87(5):1033-40.

230. Wilton, Voullaire, Sargeant, Williamson, McBain. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. Fertil Steril. 2003; vol. 80:(pg. 860-8).

231. Fishel, Craig, Lynch, Dowell, Ndukwe, Jenneer, et al. Assessment of 19,803 paired chromosomes and clinical outcome from first 150 cycles using array CGH of the first polar body for embryo selection and transfer. Fertiliz In vitro. 2011:1-8.

232. Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. Hum Reprod. 2011 Nov;26(11):3173-80.

233. Chen YL, Hung CC, Lin SY, Fang MY, Tsai YY, Chang LJ, et al. Successful application of the strategy of blastocyst biopsy, vitrification, whole genome amplification, and thawed embryo

transfer for preimplantation genetic diagnosis of neurofibromatosis type 1. Taiwan J Obstet Gynecol. 2011 Mar;50(1):74-8.

234. Kuo SJ, Ma GC, Chang SP, Wu HH, Chen CP, Chang TM, et al. Preimplantation and prenatal genetic diagnosis of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency with an amplification refractory mutation system-quantitative polymerase chain reaction. Taiwan J Obstet Gynecol. 2011 Dec;50(4):468-73.

235. Galluzzi L, Palini S, Stefani S, Andreoni F, Primiterra M, Diotallevi A, et al. Extracellular embryo genomic DNA and its potential for genotyping applications. Future Sci OA. 2015 Nov;1(4):FSO62.

236. Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Oct 18;113(42):11907-12.

237. Li P, Song Z, Yao Y, Huang T, Mao R, Huang J, et al. Preimplantation Genetic Screening with Spent Culture Medium/Blastocoel Fluid for in Vitro Fertilization. Sci Rep. 2018 Jun 18;8(1):9275.

238. Kuznyetsov V, Madjunkova S, Antes R, Abramov R, Motamedi G, Ibarrientos Z, et al. Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach. PLoS One. 2018;13(5):e0197262.

239. WHO. Infertility. WHO int. 19 Mar 2013.

240. Makar RS, Toth TL. The evaluation of infertility. Am J Clin Pathol. 2002 Jun;117 Suppl:S95-103.

241. Chowdhury SH, Cozma AI, Chowdhury JH. Infertility. Essentials for the Canadian Medical Licensing Exam: Review and Prep for MCCQE. 2017;Part I, 2nd Ed.

242. Embryology ESoHRa. ART fact sheet. Jul 2014.

243. te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. Hum Reprod Update. 2002 Mar-Apr;8(2):141-54.

244. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet. 2016 Oct 8;388(10053):1545-602.

245. Service NH. Causes of infertility. 23 Oct 2017.

246. Barratt CLR, Cooke ID. Donor Insemination. Cambridge University Press. 1993:13.

247. Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. Hum Reprod Update. 2011 Sep-Oct;17(5):575-88.

248. Rutstein SO, Shah IH. Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries. WHO int. 2004.

249. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 2004 Jan;81(1):19-25.

250. American Society for Reproductive Medicine B, Alabama. Fibroids and fertility. 2015.

251. Lotti F, Maggi M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. Hum Reprod Update. 2015 Jan-Feb;21(1):56-83.

252. Butt F, Akram N. Semen analysis parameters: experiences and insight into male infertility at a tertiary care hospital in Punjab. J Pak Med Assoc. May 2013:63(5):558-62.

253. Ikyernum JA, Agbecha A, Hwande S. Semen Profile of Men Presenting with Infertility at First Fertility Hospital Makurdi, North Central Nigeria. Clinical Medicine and Diagnostics. 2019:9(2): 26-35.

254. Martinez MC, Mendez C, Ferro J, Nicolas M, Serra V, Landeras J. Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. Fertil Steril. 2010 Jan;93(1):289-92.

255. Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V, et al. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. Eur J Hum Genet. 2012 May;20(5):521-6.

256. Babariya D, Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Wells D. The incidence and origin of segmental aneuploidy in human oocytes and preimplantation embryos. Hum Reprod. 2017 Dec 1;32(12):2549-60.

257. Johnson DS, Gemelos G, Baner J, Ryan A, Cinnioglu C, Banjevic M, et al. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. Hum Reprod. 2010 Apr;25(4):1066-75.

258. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. Hum Genet. 2013 Sep;132(9):1001-13.

259. Treff NR, Franasiak JM. Detection of segmental aneuploidy and mosaicism in the human preimplantation embryo: technical considerations and limitations. Fertil Steril. 2017 Jan;107(1):27-31.

260. Fragouli E, Wells D. Aneuploidy in the human blastocyst. Cytogenet Genome Res. 2011;133(2-4):149-59.

261. Zhang X, Wang Y, Zhao N, Liu P, Huang J. Variations in chromosomal aneuploidy rates in IVF blastocysts and early spontaneous abortion chorionic villi. J Assist Reprod Genet. 2020 Jan 6.

262. Escriba MJ, Vendrell X, Peinado V. Segmental aneuploidy in human blastocysts: a qualitative and quantitative overview. Reprod Biol Endocrinol. 2019 Sep 16;17(1):76.

263. Ajduk A, Zernicka-Goetz M. Quality control of embryo development. Mol Aspects Med. 2013 Oct;34(5):903-18.

264. Bolton H, Graham SJL, Van der Aa N, Kumar P, Theunis K, Fernandez Gallardo E, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. Nat Commun. 2016 Mar 29;7:11165.

265. Pellestor F, Gatinois V, Puechberty J, Genevieve D, Lefort G. Chromothripsis: potential origin in gametogenesis and preimplantation cell divisions. A review. Fertil Steril. 2014 Dec;102(6):1785-96.

266. Pellestor F. Chromothripsis: how does such a catastrophic event impact human reproduction? Hum Reprod. 2014 Mar;29(3):388-93.

267. Kloosterman WP, Guryev V, van Roosmalen M, Duran KJ, de Bruijn E, Bakker SC, et al. Chromothripsis as a mechanism driving complex de novo structural rearrangements in the germline. Hum Mol Genet. 2011 May 15;20(10):1916-24.

268. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. Cell. 2011 Jan 7;144(1):27-40.

269. Ly P, Cleveland DW. Rebuilding Chromosomes After Catastrophe: Emerging Mechanisms of Chromothripsis. Trends Cell Biol. 2017 Dec;27(12):917-30.

270. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Reprint of: Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil Steril. 2019 Oct;112(4S1):e71-e80.

271. Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. Am J Hum Genet. 1991 Nov;49(5):995-1013.

272. Lee A, Kiessling AA. Early human embryos are naturally aneuploid-can that be corrected? J Assist Reprod Genet. 2017 Jan;34(1):15-21.

273. Mantikou E, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. Biochim Biophys Acta. 2012 Dec;1822(12):1921-30.

274. Martin RH. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. Reprod Biomed Online. 2008 Apr;16(4):523-31.

275. Verpoest W, Fauser BC, Papanikolaou E, Staessen C, Van Landuyt L, Donoso P, et al. Chromosomal aneuploidy in embryos conceived with unstimulated cycle IVF. Hum Reprod. 2008 Oct;23(10):2369-71.

276. Sagi L, Zuckerman-Levin N, Gawlik A, Ghizzoni L, Buyukgebiz A, Rakover Y, et al. Clinical significance of the parental origin of the X chromosome in turner syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2007 Mar;92(3):846-52.

277. Chiang T, Schultz RM, Lampson MA. Meiotic origins of maternal age-related aneuploidy. Biol Reprod. 2012 Jan;86(1):1-7.

278. Munne S, Bahce M, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Velilla E, et al. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. Reprod Biomed Online. 2004 Jan;8(1):81-90.

279. Rubio C, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Buendia P, Pehlivan T, et al. Impact of chromosomal abnormalities on preimplantation embryo development. Prenat Diagn. 2007 Aug;27(8):748-56.

280. Jamieson ME, Coutts JR, Connor JM. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. Hum Reprod. 1994 Apr;9(4):709-15.

281. Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M, Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. Reprod Biomed Online. 2000;1(1):17-26.

282. Ford JH, Schultz CJ, Correll AT. Chromosome elimination in micronuclei: a common cause of hypoploidy. Am J Hum Genet. 1988 Nov;43(5):733-40.

283. Hunt P, LeMaire R, Embury P, Sheean L, Mroz K. Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. Hum Mol Genet. 1995 Nov;4(11):2007-12.

284. Shi Q, Martin RH. Spontaneous frequencies of aneuploid and diploid sperm in 10 normal Chinese men: assessed by multicolor fluorescence in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet. 2000;90(1-2):79-83.

285. Sandalinas M, Marquez C, Munne S. Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. Mol Hum Reprod. 2002 Jun;8(6):580-5.

286. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Sandalinas M, Brenner CA. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. Mol Hum Reprod. 2001 Jan;7(1):49-55.

287. Cohen-Fix O. Sister chromatid separation: falling apart at the seams. Curr Biol. 2000 Nov 16;10(22):R816-9.

288. van Heemst D, Heyting C. Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. Chromosoma. 2000;109(1-2):10-26.

289. Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, et al. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. Hum Mol Genet. 1997 Sep;6(9):1391-9.

290. Pellestor F, Andreo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. Hum Reprod. 2002 Aug;17(8):2134-45.

291. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. Hum Genet. 1985;70(1):11-7.

292. Snijders RJ, Holzgreve W, Cuckle H, Nicolaides KH. Maternal age-specific risks for trisomies at 9-14 weeks' gestation. Prenat Diagn. 1994 Jul;14(7):543-52.

293. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. N Engl J Med. 2007 Jul 5;357(1):9-17.

294. Gleicher N, Kushnir VA, Barad DH. Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. Reprod Biol Endocrinol. 2014;12:22.

295. Sugiura-Ogasawara M, Suzumori K. Can preimplantation genetic diagnosis improve success rates in recurrent aborters with translocations? Hum Reprod. 2005 Dec;20(12):3267-70.

296. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in patients with unexplained recurrent miscarriages. Fertil Steril. 2005 Feb;83(2):393-7; quiz 525-6.

297. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, et al. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis. Fertil Steril. 2004 Aug;82(2):302-3.

298. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, et al. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. Fertil Steril. 2004 Aug;82(2):292-4.

299. Carp HJ, Dirnfeld M, Dor J, Grudzinskas JG. ART in recurrent miscarriage: preimplantation genetic diagnosis/screening or surrogacy? Hum Reprod. 2004 Jul;19(7):1502-5.

300. Bielanska M, Tan SL, Ao A. Different probe combinations for assessment of postzygotic chromosomal imbalances in human embryos. J Assist Reprod Genet. 2002 Apr;19(4):177-82.

301. Sher G, Keskintepe L, Keskintepe M, Maassarani G, Tortoriello D, Brody S. Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. Fertil Steril. 2009 Dec;92(6):1886-94.

302. Fragouli E, Katz-Jaffe M, Alfarawati S, Stevens J, Colls P, Goodall NN, et al. Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure. Fertil Steril. 2010 Aug;94(3):875-87.

303. Forman EJ, Upham KM, Cheng M, Zhao T, Hong KH, Treff NR, et al. Comprehensive chromosome screening alters traditional morphology-based embryo selection: a prospective study of 100 consecutive cycles of planned fresh euploid blastocyst transfer. Fertil Steril. 2013 Sep;100(3):718-24.

304. Forman EJ, Tao X, Ferry KM, Taylor D, Treff NR, Scott RT, Jr. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. Hum Reprod. 2012 Apr;27(4):1217-22.

305. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. Fertil Steril. 2010 Oct;94(5):1700-6.

306. Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT, Jr. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. Fertil Steril. 2011 Sep;96(3):638-40.

307. Traversa MV, Marshall J, McArthur S, Leigh D. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. Reprod Biol. 2011 Dec;11 Suppl 3:51-60.

308. Lee HL, McCulloh DH, Hodes-Wertz B, Adler A, McCaffrey C, Grifo JA. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening improves implantation and live birth in women age 40 through 43. J Assist Reprod Genet. 2015 Mar;32(3):435-44.

309. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, et al. Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. Fertil Steril. 2013 Apr;99(5):1400-7.

310. Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, et al. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. Fertil Steril. 2010 Feb;93(2):364-73.

311. Kim HO, Sung N, Song IO. Predictors of live birth and pregnancy success after in vitro fertilization in infertile women aged 40 and over. Clinical and experimental reproductive medicine. 2017;44(2):111-7.

312. Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG. Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. Oxford University Press. 2012;4.

313. Warburton D. Cytogenetics of reproductive wastage: from conception to birth. Medical Cytogenetics. 2000:pp 213-46.

314. Schreiber CA, Sammel M, Hillier SL, Barnhart KT. A little bit pregnant: modeling how the accurate detection of pregnancy can improve HIV prevention trials. American journal of epidemiology. 2009;169(4):515-21.

315. Magnus MC, Wilcox AJ, Morken NH, Weinberg CR, Haberg SE. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. BMJ. 2019 Mar 20;364:l869.

316. Twisk M, Mastenbroek S, van Wely M, Heineman MJ, Van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Jan 25(1):CD005291.

317. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Cytogenetic and molecular analysis of male infertility: Y chromosome deletion during nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. Cell Biochem Biophys. 2006;44(1):171-7.

318. 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 Mar;26(2-3):119-22.

319. 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 Nov-Dec;25(11-12):559-65.

320. Azimi C, Khaleghian M, Farzanfar F. Cytogenetic studies among Iranian infertile men: The first 20-year long-term report. Afr J Biotechnol. 2012:11(37):8973–8.

321. 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 Feb;20(2):437-42.

322. Rosenbusch B. Somatic chromosomal abnormalities in couples undergoing infertility treatment by intracytoplasmic sperm injection. J Genet. 2010 Apr;89(1):105-8.

323. 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 Jan;16(1):82-90.

324. Gersen SL, Keagle MB. Human chromosome nomenclature An overview and definition in terms. Humana Press. 2005;The Principles of Clinical Cytogenetics:pp. 541–4.

325. Elghezal H, Hidar S, Braham R, Denguezli W, Ajina M, Saad A. Chromosome abnormalities in one thousand infertile males with nonobstructive sperm disorders. Fertil Steril. 2006 Dec;86(6):1792-5.

326. Raziel A, Friedler S, Schachter M, Kasterstein E, Strassburger D, Ron-El R. Increased frequency of female partner chromosomal abnormalities in patients with high-order implantation failure after in vitro fertilization. Fertil Steril. 2002 Sep;78(3):515-9.

327. Yatsenko AN, Yatsenko SA, Weedin JW, Lawrence AE, Patel A, Peacock S, et al. Comprehensive 5-year study of cytogenetic aberrations in 668 infertile men. J Urol. 2010 Apr;183(4):1636-42.

328. Ravel C, Berthaut I, Bresson JL, Siffroi JP. Prevalence of chromosomal abnormalities in phenotypically normal and fertile adult males: large-scale survey of over 10,000 sperm donor karyotypes. Hum Reprod. 2006 Jun;21(6):1484-9.

329. Vicdan A, Vicdan K, Gunalp S, Kence A, Akarsu C, Isik AZ. Genetic aspects of human male infertility: The frequencies of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004:117(1):49–54. 204.

330. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. Fertil Steril. 2015 Jun;103(6):e44-50.

331. Munne S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J. Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. Cytogenet Cell Genet. 2000;90(3-4):303-8.

332. Ko DS, Cho JW, Lee HS, Kim JY, Kang IS, Yang KM, et al. Preimplantation genetic diagnosis outcomes and meiotic segregation analysis of robertsonian translocation carriers. Fertil Steril. 2013 Apr;99(5):1369-76.

333. Berger R. [The incidence of constitutional chromosome aberrations]. J Genet Hum. 1975 Oct;23 SUPPL:42-9.

334. Baer RJ, Flessel MC, Jelliffe-Pawlowski LL, Goldman S, Hudgins L, Hull AD, et al. Detection Rates for Aneuploidy by First-Trimester and Sequential Screening. Obstet Gynecol. 2015 Oct;126(4):753-9.

335. Retief AE, Van Zyl JA, Menkveld R, Fox MF, Kotze GM, Brusnicky J. Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. Hum Genet. 1984;66(2-3):162-4.

336. Kosar PA, Ozcelik N, Kosar A. Cytogenetic abnormalities detected in patients with non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia. J Assist Reprod Genet. 2010 Jan;27(1):17-21.

337. Tempest HG. Meiotic recombination errors, the origin of sperm aneuploidy and clinical recommendations. Syst Biol Reprod Med. 2011 Feb;57(1-2):93-101.

338. Sarrate Z, Blanco J, Anton E, Egozcue S, Egozcue J, Vidal F. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. Asian J Androl. 2005 Sep;7(3):227-36.

339. Madan K. Balanced structural changes involving the human X: effect on sexual phenotype. Hum Genet. 1983;63(3):216-21.

340. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, et al. Cytogenetics of infertile men. Hum Reprod. 1996 Dec;11 Suppl 4:1-24; discussion 5-6.

341. Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. Hum Reprod. 1999 Aug;14(8):2097-101.

342. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. Fertil Steril. 2000 Jun;73(6):1209-18.

343. Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM. Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. Prenat Diagn. 1998 Dec;18(13):1437-49.

344. Nielsen J, Wohlert M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. Hum Genet. 1991 May;87(1):81-3.

345. Mackie Ogilvie C, Scriven PN. Meiotic outcomes in reciprocal translocation carriers ascertained in 3-day human embryos. Eur J Hum Genet. 2002 Dec;10(12):801-6.

346. Oliver-Bonet M, Navarro J, Carrera M, Egozcue J, Benet J. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. Mol Hum Reprod. 2002 Oct;8(10):958-63.

347. Dul E, van Echten-Arends J, Groen H, Kastrop P, Wissen LA, Engelen J, et al. Can Characteristics of Reciprocal Translocations Predict the Chance of Transferable Embryos in PGD Cycles? J Clin Med. 2014 Apr 2;3(2):348-58.

348. Zhang Y, Zhu S, Wu J, Liu S, Sun X. Quadrivalent asymmetry in reciprocal translocation carriers predicts meiotic segregation patterns in cleavage stage embryos. Reprod Biomed Online. 2014 Oct;29(4):490-8.

349. Munne S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities. Mol Cell Endocrinol. 2001 Oct 22;183 Suppl 1:S55-8.

350. Ye Y, Qian Y, Xu C, Jin F. Meiotic segregation analysis of embryos from reciprocal translocation carriers in PGD cycles. Reprod Biomed Online. 2012 Jan;24(1):83-90.

351. Therman E, Susman B, Denniston C. The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. Ann Hum Genet. 1989 Jan;53(1):49-65.

352. Wang B, Nie B, Tang D, Li R, Liu X, Song J, et al. Analysis of Meiotic Segregation Patterns and Interchromosomal Effects in Sperm from 13 Robertsonian Translocations. Balkan J Med Genet. 2017 Jun 30;20(1):43-50.

353. Findikli N, Kahraman S, Kumtepe Y, Donmez E, Biricik A, Sertyel S, et al. Embryo development characteristics in Robertsonian and reciprocal translocations: a comparison of results with non-translocation cases. Reprod Biomed Online. 2003 Nov;7(5):563-71.

354. Pylyp LY, Zukin VD, Bilko NM. Chromosomal segregation in sperm of Robertsonian translocation carriers. J Assist Reprod Genet. 2013 Sep;30(9):1141-5.

355. Shaffer LG, Jackson-Cook CK, Stasiowski BA, Spence JE, Brown JA. Parental origin determination in thirty de novo Robertsonian translocations. Am J Med Genet. 1992 Aug 1;43(6):957-63.

356. Cassuto NG, Le Foll N, Chantot-Bastaraud S, Balet R, Bouret D, Rouen A, et al. Sperm fluorescence in situ hybridization study in nine men carrying a Robertsonian or a reciprocal translocation: relationship between segregation modes and high-magnification sperm morphology examination. Fertil Steril. 2011 Oct;96(4):826-32.

357. Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR. Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. Cytogenet Cell Genet. 1984;38(1):14-22.

358. Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 4th ed. ed: Oxford University Press; 2011.

359. Boue A, Gallano P. A collaborative study of the segregation of inherited chromosome structural rearrangements in 1356 prenatal diagnoses. Prenat Diagn. 1984 Spring;4 Spec No:45-67.

360. Gardner RJM, Sutherland GR. Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. 2nd ed. ed. Oxford: Oxford University Press; 1996.

361. Kolgeci S, Kolgeci J, Azemi M, Daka A, Shala-Beqiraj R, Kurtishi I, et al. Dermatoglyphics and Reproductive Risk in a Family with Robertsonian Translocation 14q;21q. Acta Inform Med. 2015 Jun;23(3):178-83.

362. Mutton D, Alberman E, Hook EB. Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome, England and Wales 1989 to 1993. National Down Syndrome Cytogenetic Register and the Association of Clinical Cytogeneticists. J Med Genet. 1996 May;33(5):387-94.

363. Emery A, Mueller R. Elements of medical genetics. 8th Edition ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1992.

364. Morris JK, Alberman E, Mutton D, Jacobs P. Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome: England and Wales 1989-2009. Am J Med Genet A. 2012 May;158A(5):1151-7.

365. Flores-Ramirez F, Palacios-Guerrero C, Garcia-Delgado C, Morales-Jimenez AB, Arias-Villegas CM, Cervantes A, et al. Cytogenetic profile in 1,921 cases of trisomy 21 syndrome. Arch Med Res. 2015 Aug;46(6):484-9.

366. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. Hum Reprod. 2011 Jul;26(7):1925-35.

367. Fischer J, Colls P, Escudero T, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. Fertil Steril. 2010 Jun;94(1):283-9.

368. Zhang S, Lei C, Wu J, Sun H, Zhou J, Zhu S, et al. Analysis of segregation patterns of quadrivalent structures and the effect on genome stability during meiosis in reciprocal translocation carriers. Human Reproduction. 2018 February 23, 2018;33(4):757–67.

369. Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. Cytogenet Genome Res. 2005;111(3-4):317-36.

370. Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. Am J Med Genet A. 2012 Apr;158A(4):947-63.

371. Hemmat M, Yang X, Chan P, McGough RA, Ross L, Mahon LW, et al. Characterization of a complex chromosomal rearrangement using chromosome, FISH, and microarray assays in a girl with multiple congenital abnormalities and developmental delay. Mol Cytogenet. 2014;7:50.

372. Kleczkowska A, Fryns JP, Van den Berghe H. Complex chromosomal rearrangements (CCR) and their genetic consequences. J Genet Hum. 1982 Oct;30(3):199-214.

373. Kousseff BG, Papenhausen P, Essig YP, Torres MP. Complex chromosome rearrangement with ankyloblepharon filiforme adnatum. J Med Genet. 1993 Feb;30(2):167-70.

374. Walker EL, Robbins TP, Bureau TE, Kermicle J, Dellaporta SL. Transposon-mediated chromosomal rearrangements and gene duplications in the formation of the maize R-r complex. EMBO J. 1995 May 15;14(10):2350-63.

375. Gorski JL, Emanuel BS, Zackai EH, Mennuti M. Complex chromosomal rearrangement and multiple spontaneous abortions. Hum Genet. 1986 Nov;74(3):326.

376. Tupler R, Maraschio P, Gerardo A, Mainieri R, Lanzi G, Tiepolo L. A complex chromosome rearrangement with 10 breakpoints: tentative assignment of the locus for Williams syndrome to 4q33----q35.1. J Med Genet. 1992 Apr;29(4):253-5.

377. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. Pathogenetics. 2008 Nov 03;1(1):4.

378. Emanuel BS, Shaikh TH. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. Nat Rev Genet. 2001 Oct;2(10):791-800.

379. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet. 1998 Oct;14(10):417-22.

380. Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. Cell. 2007 Dec 28;131(7):1235-47.

381. Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. PLoS Genet. 2009 Jan;5(1):e1000327.

382. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem. 2010;79:181-211.

383. Tsai AG, Lieber MR. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. BMC Genomics. 2010 Feb 10;11 Suppl 1:S1.

384. Timar L, Beres J, Kosztolanyi G, Nemeth I. De novo complex chromosomal rearrangement in a woman with recurrent spontaneous abortion and one healthy daughter. Hum Genet. 1991 Feb;86(4):421.

385. Kotzot D, Holland H, Kohler M, Froster UG. A complex chromosome rearrangement involving chromosome 8, 11, and 12 analyzed by conventional cytogenetic investigations, fluorescence in situ hybridisation, and spectral karyotyping. Ann Genet. 2001 Jul-Sep;44(3):135-8.

386. Park JK, Lee JI, Jo HC, Shin JK, Choi WJ, Lee SA, et al. Molecular cytogenetic investigation of a balanced complex chromosomal rearrangement carrier ascertained through a neonate with partial trisomies of 13 and 22. Am J Med Genet A. 2007 Jul 01;143A(13):1502-9.

387. Zhang Y, Dai Y, Tu Z, Li Q, Zhang L, Wang L. Array-CGH detection of three cryptic submicroscopic imbalances in a complex chromosome rearrangement. J Genet. 2009 Dec;88(3):369-72.

388. Siffroi JP, Benzacken B, Straub B, Le Bourhis C, North MO, Curotti G, et al. Assisted reproductive technology and complex chromosomal rearrangements: the limits of ICSI. Mol Hum Reprod. 1997 Oct;3(10):847-51.

389. Rodriguez MT, Martin MJ, Abrisqueta JA. A complex balanced rearrangement involving four chromosomes in an azoospermic man. J Med Genet. 1985 Feb;22(1):66-7.

390. Lee IW, Su MT, Hsu CC, Lin YH, Chen PY, Kuo PL. Constitutional complex chromosomal rearrangements in azoospermic men--case report and literature review. Urology. 2006 Dec;68(6):1343 e5-8.

391. Bartels I, Starke H, Argyriou L, Sauter SM, Zoll B, Liehr T. An exceptional complex chromosomal rearrangement (CCR) with eight breakpoints involving four chromosomes (1;3;9;14) in an azoospermic male with normal phenotype. Eur J Med Genet. 2007 Mar-Apr;50(2):133-8.

392. Salahshourifar I, Shahrokhshahi N, Tavakolzadeh T, Beheshti Z, Gourabi H. Complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 1, 4 and 22 in an infertile male: case report and literature review. J Appl Genet. 2009;50(1):69-72.

393. Chandley AC. The origin of chromosomal aberrations in man and their potential for survival and reproduction in the adult human population. Ann Genet. 1981;24(1):5-11.

394. Schwanitz G, Hagner M. Double trisomy as a mosaic. Case history (48, XYY, + 21/47,XY, +21) and survey of the literature of mixed autosomal-gonosomal trisomies. Acta Genet Med Gemellol (Roma). 1978;27:67-74.

395. Meer B, Wolff G, Back E. Segregation of a complex rearrangement of chromosomes 6, 7, 8, and 12 through three generations. Hum Genet. 1981;58(2):221-5.

396. Rothlisberger B, Kotzot D, Brecevic L, Koehler M, Balmer D, Binkert F, et al. Recombinant balanced and unbalanced translocations as a consequence of a balanced complex chromosomal rearrangement involving eight breakpoints in four chromosomes. Eur J Hum Genet. 1999 Dec;7(8):873-83.

397. Gruchy N, Barreau M, Kessler K, Gourdier D, Leporrier N. A paternally transmitted complex chromosomal rearrangement (CCR) involving chromosomes 2, 6, and 18 includes eight breakpoints and five insertional translocations (ITs) through three generations. Am J Med Genet A. 2010 Jan;152A(1):185-90.

398. Grasshoff U, Singer S, Liehr T, Starke H, Fode B, Schoning M, et al. A complex chromosomal rearrangement with a translocation 4;10;14 in a fertile male carrier: ascertainment through an offspring with partial trisomy 14q13-->q24.1 and partial monosomy 4q27-->q28 [corrected]. Cytogenet Genome Res. 2003;103(1-2):17-23.

399. Weier HU, Munne S, Fung J. Patient-specific probes for preimplantation genetic diagnosis of structural and numerical aberrations in interphase cells. J Assist Reprod Genet. 1999 Apr;16(4):182-91.

400. Escudero T, Estop A, Fischer J, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis for complex chromosome rearrangements. Am J Med Genet A. 2008 Jul 01;146A(13):1662-9.

401. Otani T, Roche M, Mizuike M, Colls P, Escudero T, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and unsuccessful pregnancies. Reprod Biomed Online. 2006 Dec;13(6):869-74.

402. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. Hum Reprod Update. 2005 Jan-Feb;11(1):33-41.

403. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. BMC Med. 2013 Jun 26;11:154.

404. Treff NR, Northrop LE, Kasabwala K, Su J, Levy B, Scott RT, Jr. Single nucleotide polymorphism microarray-based concurrent screening of 24-chromosome aneuploidy and unbalanced translocations in preimplantation human embryos. Fertil Steril. 2011 Apr;95(5):1606-12 e1-2.

405. Fodina V, Dudorova A, Alksere B, Dzalbs A, Vedmedovska N, Andersone S, et al. The application of PGT-A for carriers of balanced structural chromosomal rearrangements. Gynecol Endocrinol. 2019;35(sup1):18-23.

406. Zhang W, Liu Y, Wang L, Wang H, Ma M, Xu M, et al. Clinical application of next-generation sequencing in preimplantation genetic diagnosis cycles for Robertsonian and reciprocal translocations. J Assist Reprod Genet. 2016 Jul;33(7):899-906.

407. Ghevaria H, SenGupta S, Shmitova N, Serhal P, Delhanty J. The origin and significance of additional aneuploidy events in couples undergoing preimplantation genetic diagnosis for translocations by array comparative genomic hybridization. Reprod Biomed Online. 2016 Feb;32(2):178-89.

408. Zhang S, Lei C, Wu J, Zhou J, Sun H, Fu J, et al. The establishment and application of preimplantation genetic haplotyping in embryo diagnosis for reciprocal and Robertsonian translocation carriers. BMC Med Genomics. 2017 Oct 17;10(1):60.

409. Munne S. Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes. Cytogenet Genome Res. 2005;111(3-4):305-9.

410. Traversa MV, Carey L, Leigh D. A molecular strategy for routine preimplantation genetic diagnosis in both reciprocal and Robertsonian translocation carriers. Mol Hum Reprod. 2010 May;16(5):329-37.

411. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne S, Balicchia B, Escudero T, et al. Possible interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. Hum Reprod. 2002 Dec;17(12):3201-7.

412. Rius M, Obradors A, Daina G, Ramos L, Pujol A, Martinez-Passarell O, et al. Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hibridization. Fertil Steril. 2011 Jul;96(1):134-42.

413. Neri G, Serra A, Campana M, Tedeschi B. Reproductive risks for translocation carriers: cytogenetic study and analysis of pregnancy outcome in 58 families. Am J Med Genet. 1983 Dec;16(4):535-61.

414. Chen CK, Wu D, Yu HT, Lin CY, Wang ML, Yeh HY, et al. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization of reciprocal and Robertsonian translocations. Taiwan J Obstet Gynecol. 2014 Mar;53(1):48-52.

415. Idowu D, Merrion K, Wemmer N, Mash JG, Pettersen B, Kijacic D, et al. Pregnancy outcomes following 24-chromosome preimplantation genetic diagnosis in couples with balanced reciprocal or Robertsonian translocations. Fertil Steril. 2015 Apr;103(4):1037-42.

416. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. Fertil Steril. 2000 Feb;73(2):300-4.

417. Lee H, McCulloh DH, Macanas E, McCaffrey C, Grifo J. Gender ratio and live birth after preimplantation genetic screening (PGS). Fertil Steril. 2016;106(3):e161–e2.

418. Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. Hum Reprod. 2003 Jan;18(1):182-8.

419. Magli MC, Gianaroli L, Munne S, Ferraretti AP. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. J Assist Reprod Genet. 1998 May;15(5):297-301.

420. Coulam CB, Jeyendran RS, Fiddler M, Pergament E. Discordance among blastomeres renders preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy ineffective. J Assist Reprod Genet. 2007 Jan;24(1):37-41.

421. Blockeel C, Drakopoulos P, Santos-Ribeiro S, Polyzos NP, Tournaye H. A fresh look at the freeze-all protocol: a SWOT analysis. Hum Reprod. 2016 Mar;31(3):491-7.

422. Engmann L, Benadiva C, Humaidan P. GnRH agonist trigger for the induction of oocyte maturation in GnRH antagonist IVF cycles: a SWOT analysis. Reprod Biomed Online. 2016 Mar;32(3):274-85.

423. Massin N. New stimulation regimens: endogenous and exogenous progesterone use to block the LH surge during ovarian stimulation for IVF. Hum Reprod Update. 2017 Mar 1;23(2):211-20.

424. Garcia-Velasco JA, Fauser BC. Preimplantation genetic screening - what a wonderful world it would be! Reprod Biomed Online. 2016 Apr;32(4):337-8.

425. He H, Jing S, Lu CF, Tan YQ, Luo KL, Zhang SP, et al. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. Fertil Steril. 2019 Jul;112(1):82-8.

426. Chambers GM, Hoang VP, Lee E, Hansen M, Sullivan EA, Bower C, et al. Hospital costs of multiple-birth and singleton-birth children during the first 5 years of life and the role of assisted reproductive technology. JAMA Pediatr. 2014 Nov;168(11):1045-53.

427. Polinder S, Heijnen EM, Macklon NS, Habbema JD, Fauser BJ, Eijkemans MJ. Cost-effectiveness of a mild compared with a standard strategy for IVF: a randomized comparison using cumulative term live birth as the primary endpoint. Hum Reprod. 2008 Feb;23(2):316-23.

428. Chambers GM, Sullivan EA, Ishihara O, Chapman MG, Adamson GD. The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries. Fertil Steril. 2009 Jun;91(6):2281-94.

429. Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, Wu J, Lee Y, Suzuki K, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. Nature. 2017 Aug 24;548(7668):413-9.

430. Greely HT. CRISPR'd babies: human germline genome editing in the 'He Jiankui affair'. J Law Biosci. 2019 Oct;6(1):111-83.

431. Cohen J. Inside the circle of trust. Science. 2019 Aug 2;365(6452):430-7.