МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

СЛАВЯНА ЯНУШЕВА ЯНЕВА СТАЙКОВА

ГЕНОМНИ НАРУШЕНИЯ В ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННИ ЧОВЕШКИ ЕМБРИОНИ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

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

Изследванията са извършени в МБАЛ „Надежда“.

Дисертацията обхваща съдържа 198 стандартни страници, от които 160 страници основен текст и включва 56 фигури и 35 таблици. Оформена е в 6 глави *(въведение – 2 стр., литературен обзор – 39 стр., цел и задачи – 1 стр. материали и методи – 45 стр., резултати – 28 стр., дискусия, заключение, изводи и приноси – 45 стр.)*, заключение, бъдещи насоки на PGT, изводи, приноси, литературни източници и декларация за оригиналност. Библиографията обхваща 431 източника.

Докторантът е задочен докторант към Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет в Катедрата по Медицинска генетика към Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 17.03.2020 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Медицинска генетика, 6-ти етаж на СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. „Здраве”2, София, 1431.

Публичната защита ще се състои на 20.07.2020 г. от 13.00 часа в семинарната зала на 14 етаж на СБАЛАГ „Майчин дом“, пред научно жури в състав:

Председател:

1. **Доц. д-р Петя Николова Купенова-Шербанова**, дм – вътрешен член за МУ-София, пенсиониран преподавател по-малко от пет години от академичния състав на Катедра по физиология на Медицински факултет при МУ-София

Членове:

2. **Проф. д-р Катя Стефанова Ковачева-Коцева**, дм - външен член за МУ-София, Катедра „Микробиология, вирусология и медицинска генетика“ на МУ-Плевен
3. **Доц. д-р Елка Бориславова Йорданова-Попова**, дм – вътрешен член за МУ-София, Катедра по физиология на Медицински фаултет при МУ-София
4. **Доц. д-р Мария Николаева Симеонова**, дм - външен член за МУ-София, МУ-Плевен
5. **Доц. Светослав Георгиев Димов**, дб - външен член за МУ-София, Катедра “Генетика” - Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

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.

СЪДЪРЖАНИЕ:

Използвани в текста съкращения 6

ВЪВЕДЕНИЕ 7

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 8

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 8

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 9

I. **Конвенционален цитогенетичен метод** 10

II. **Предимплантационен генетичен тест с aCGH базирани ДНК микрочипове** 10

1. Изолиране на ДНК от трофектодермални клетки чрез SurePlex за aCGH 10
2. Оценка на качеството и количеството на тестваната ДНК 11
3. Сравнителна геномна хибридизация върху aCGH базирани ДНК микрочипове 11

III. **Предимплантационен генетичен тест с новогенерационно секвениране** 13

1. Изолиране и амплификация на ДНК чрез SurePlex за NGS 13
2. Приготвяне на библиотеки за секвениране 13
3. Секвениране 15
4. Софтуерен анализ на получените данни 16

РЕЗУЛТАТИ 16

1. Възраст на участниците 16
2. Брой и разпределение на балансираните и небалансираните ембриони 17
3. Разпределение на ембрионите по възрастови групи 17
4. Анализ на причините за репродуктивни неблагополучия 19
5. Вид и честота на хромозомните аберации от проведения PGT анализ 20
6. Честота на анеуплоидиите по възрастови групи 22
7. Резултати от PGT-SR при пациенти, носители на хромозомни мутации 23
8. Разределение на типовете мутации в ембриони при фамилни преустройства 25
9. Критерии за трансфер на приоритетни ембриони 36
10. Процент на живо раждане, биохимична бременност и спонтанни аборти при пациентките в проучването 37

ОБСЪЖДАНЕ 38

1. Подбор на метод за PGT 38
2. Подбор на техника за биопсиране 40
3. Обсъждане на причините за репродуктивни неблагополучия 42
4. Обсъждане на хромозомните аберации 45
5. Анеуплоидии, напреднала възраст и PGT-A 51
6. Генетични фактори за инфертилитет 54
7. PGD-SR за балансирани хромозомни преустройства 56
8. Живо раждане, биохимична бременност и спонтанни аборти 64
9. Трансфер на мозаични ембриони 69
10. Проверка на резултатите от PGT с хорионбиопсия или амниоцентеза 70
11. PGT в момента 70

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 71
БЪДЕЩИ НАСОКИ НА PGT 72
ИЗВОДИ 73
ПРИНОСИ 74
Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд 75
Summary 77

Използвани в текста съкращения

Съкращения на кирилица:

АРТ - асистирани репродуктивни технологии

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

ПГТ - предимплантационен генетичен тест

Съкращения на латиница:

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

CCR - Complex Chromosome Rearrangements (сложни хромозомни преустройства)

IVF - In Vitro Fertilization (инвитро оплождане)

NGS - Next Generation Sequencing (секвениране от ново поколение)

PGT - Preimplantation Genetic Test (предимплантационен генетичен тест)

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

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

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

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 инвитро 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.

PGT представлява допълнение към инвитро оплождането (IVF) и се извършва преди настъпване на бременността. Трстът е метод за ранна генетична диагноза и подбор на инвитро 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. 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 PGT 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. 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.

ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзор включва следните основни раздели:

I. Мястото на PGT в инвитро технологиите
II. Исторически план на методите за PGT
III. Етапи на PGT анализа
IV. Същност на инвитро технологиите
V. Наследствени болести и предразположения, подлежащи на ПГД
VI. Видове предимплантационни генетични тестове
VII. Преимущества и приложения на PGT-A процедурата
VIII. PGT в световен мащаб
IX. Методи за генетичен анализ при PGT
X. Обобщение

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

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.

За изпълване на така определената цел бяха поставени следните **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 инвитро опити или при повтарящи се случаи на ембриони с лошо качество. 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 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. Тази процедура нормално не уврежда по-нататъшното развитие на ембриона. Предимство на биопсията на трофектодермални клетки е, че анализът на по-голям брой клетки увеличава точността и достоверността на диагнозата.

Използвани методи:

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

I. **Конвенционален цитогенетичен метод**

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. Клетъчните култури се обработват, изготвят се микроскопски препарати и се оцветяват посредством **GTG – техника.**

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.

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**

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

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. 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)).

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.

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 (CS-300V, Cleaver). 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 (трансилюминатор с дължина на вълната 315 nm Mini BIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems).

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

микрочипове

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).

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

Всяка белязана с Cy3 проба се комбинира с белязана с Cy5 контрола. Смесените тествана и контролна ДНК хибридизират върху микрочипа на принципа на конкурентното свързване.

Към всяка проба, съдържаща комбинирани белязани с Cy3/ Cy5 ДНК, се добавя човешка Cot. 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. Пробара се центрофугира се в евапорателна центрофуга, течността се изпарява и се получава суха утайка. Към всяка ДНК-утайка се добавят предварително загрят хибридизационен буфер. Разбърква се до видимо разтваряне на утайката. Сместа се инкубира до пълното разтваряне на утайката.

Подготвя се хибридизационната камера. В пластмасова непрозрачна кутия се поставя лигнин и се напоява с 4 ml 2xSSC/50% формамид. 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. Микрочиповите стъкла се оставят от 3 до 16 часа в хибридизационна камера в предварително подгрята до 47°C печка.

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.

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 скенирането.

Препоръчително е микрочиповете да се скенират 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 скенирани 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).

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 скенирането 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) (фиг. 16).

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.

III. Предимплантационен генетичен тест с новогенерационно секвениране

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

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. 1x PBS негативна контрола, 2.5 ng/μl позитивна контрола, 25 pg/μl позитивна контрола и 6.25 pg/μl позитивна контрола

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. 25). Той изисква 1 ng непречистена SurePlex двойноверижна ДНК (dsDNA) и предоставя иновативна нормализация на пробите, като елиминира нуждата от измерване количеството на пробите (квантификация) преди пула на пробите и секвенирането. VeriSeq PGS Library Prep използва специално приготвени транспозоми за едновременно фрагментиране и тагментация ("tagment") на SurePlex ДНК, като прибавя уникални адапторни секвенции в процеса. Лимитиран брой PCR реакции използва адапторните секвенции, за да амплифицира инсертираната SurePlex ДНК. PCR реакцията прехвърля индексни секвенции към двата края на ДНК, спомагайки самостоятелно-индексирано секвениране на до 12 пул библиотеки или до 24 пул библиотеки при двойно-индексирано секвениране на MiSeq System. В настоящата работа е използван Qubit dsDNA HS Assay Kit за самостоятелно-индексирано секвениране на до 12 пул библиотеки.

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.

Препоръчително е да се използва 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. 29).

Следва пречистване на ДНК библиотеката и разделяне по размер, като се елиминират нежеланите реагенти от PCR реакцията от пула - къси фрагменти и праймери. Пречистването се осъществява посредством AMPure XP beads (пречиствателна мъниста).

ДНК библиотеките се нормализират, за да се осигури по-уеднаквено библиотечно представяне в библиотечния пул.

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.

3. Секвениране

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

Върху поточната клетка има ковалентно фиксирани огромен брой олигонуклеотиди, които са два типа. В началото на процеса на секвенирането чрез микроканалчета подготвените ДНК фрагменти навлизат в поточната клетка. Първият тип олигонуклеотиди са комплементарни на адапторните региони на единия край на ДНК фрагментите, преминаващи през поточната клетка, и хибридизират с тях. Полимераза синтезира комплементарен на хибридизиралия фрагмент. Следва денатурация на оригиналния ДНК фрагмент и той се отмива. Осъществява се т. нар. мостова (bridge) амплификация - веригата се огъва, така че в другия й край адапторната молекула да хибридизира с втория тип олигонуклеотиди, разположени върху поточната клетка. Полимерази амплифицират моста и се получава двоен мост. Мостът се денатурира и се формират две едноверижни копия на веригата, които са закрепени върху поточната клетка. Този процес се повтаря многократно, като става едновременно формиране на милиони клъстери, всеки съдържащ хиляди копия на един специфичен ДНК фрагмент. Като резултат се получава клонална амплификация на всички, преминали през поточната клетка ДНК фрагменти от библиотеката. След като приключи мостовата амплификация reverse-веригите се разкачат и отмиват. Остават само forward-веригите, като техните 3‘-краища се блокират, за да не се включат нежелани праймери.

След генерирането на клъстърите започва самото разчитане на нуклеотидната последователност – клъстерите се визуализират с помощта на LED и комбинации от филтри, специфични за всеки един от четирите флуоресцентно белязани дидезоксинуклеотида. MiSeq апаратът позволява 4-канално секвениране, като четирите бази в ДНК са белязани така, че да излъчват интензитет с различна дължина на вълната. Секвенционни праймери, комплементарни на част от адапторната секвенция, се хибридизират с намножените фрагменти. Секвенирането се извършва по време на синтез (sequencing-by-synthesis - SBS) чрез използването на dNTP-та, всеки от които е

свързан с флуресцентно белязан терминатор. При инкорпориране на дадена база флуресцентният сигнал се отчита от лазер и базата се идентифицира. След това терминаторът се отстранява, за да позволи инкорпорирането на следващата флуресцентно белязана база и удължаването на веригата. Крайният резултат е генерирането на секвенции с висока степен на прецизност.

4. **Софтуерен анализ на получените данни**

След приключване на разчитането на базите, автоматично се включва MiSeq Reporter софтуерът за анализ и започва първичният анализ на получените секвенции от самия секвенатор. 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. В настоящата работа за допълнителен анализ на получените данни е използвана програмата BlueFuse Multi version 4.3, (Illumina).

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 NGS секвениране. След анализ на данните и подробна консултация с пациентите беше достигнато до решение кои ембриони са годни за трансфер.

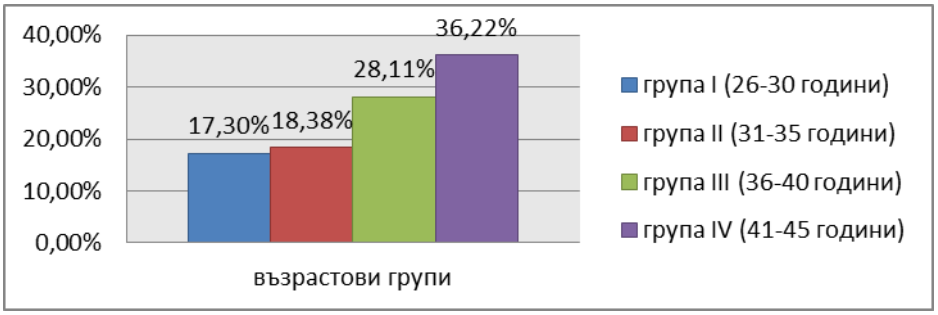
1. **Възраст на участниците**

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.1).

Фиг. 1. Възрастово разпределение на жените, участнички в проучването:

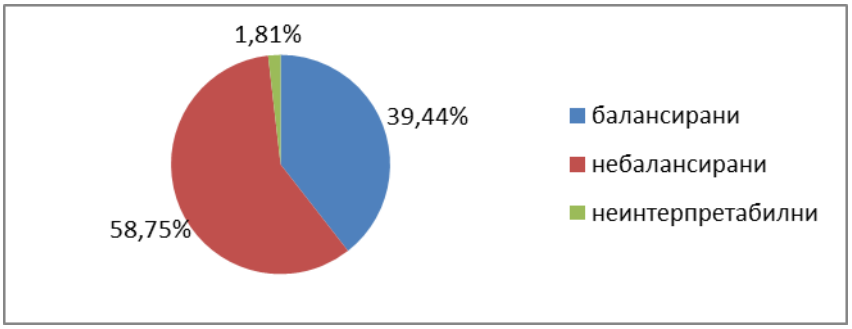


2. Брой и разпределение на балансираните и небалансираните ембриони

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. 2). 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. 2. Процентно разпределение на изследваните в проучването ембриони:



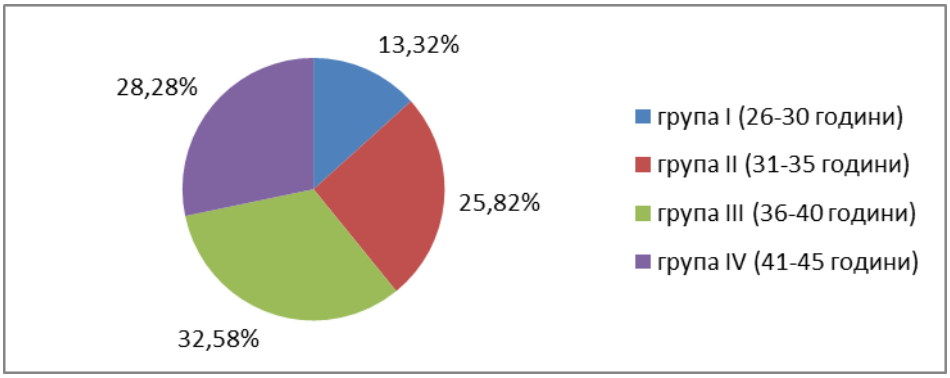
3. Разпределение на ембрионите по възрастови групи

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

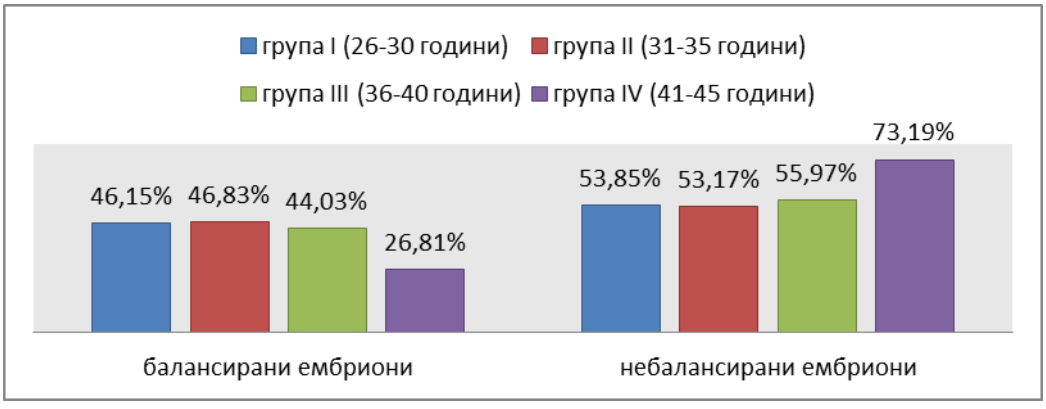
ембриони), като 30 от тях бяха балансирани (15.31% от всички нормални ембриони) и 35 – небалансирани (11.99% от всички небалансирани ембриони). В група II попадаха 126 ембриони (25.82%), от които 59 балансирани (30.10%) и 67 небалансирани (22.95%). В група III бяха анализирани 159 ембриони (32.58%): 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. 3).

Фиг. 3. 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. 4).

Фиг. 4. Процентно разпределение на балансирани и небалансирани ембриони по възрастови групи:

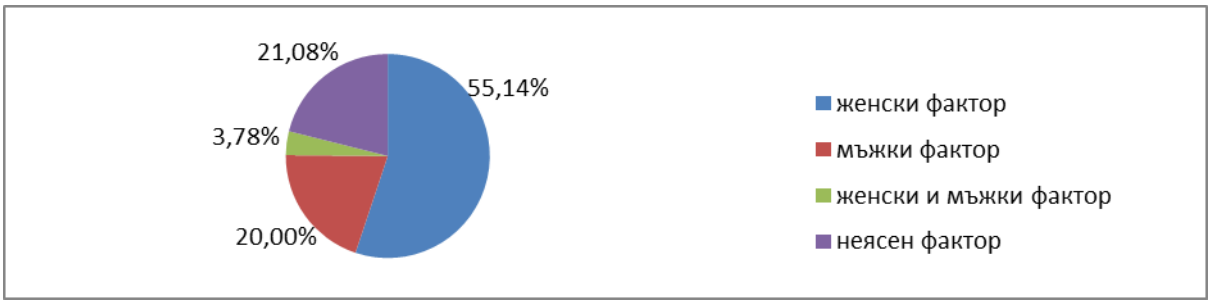


4. Анализ на причините за репродуктивни неблагополучия

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%).

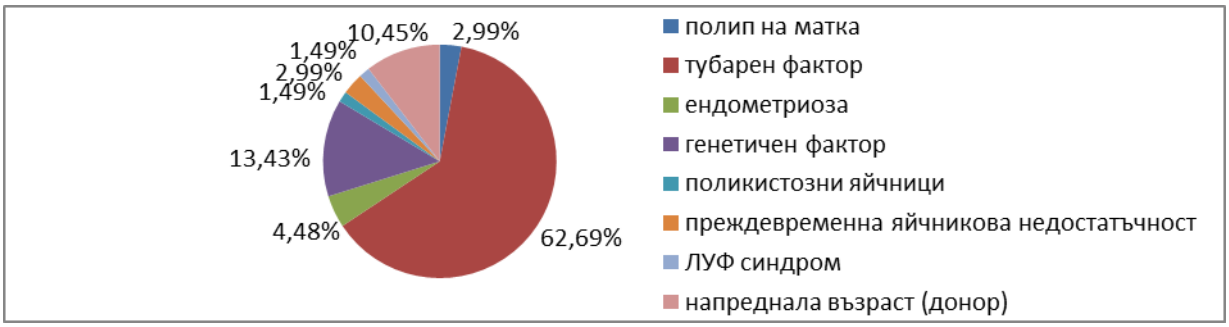
Комбинация от проблеми както при жената, така и при мъжа от двойката, бяха установени при 7 двойки (3.78% от всички двойки). Не беше установена ясна причина за репродуктивни неблагополучия при 39 двойки (21.08%) (фиг. 5).

Фиг. 5. Основни фактори за инфертилитет при пациентите в проучването:



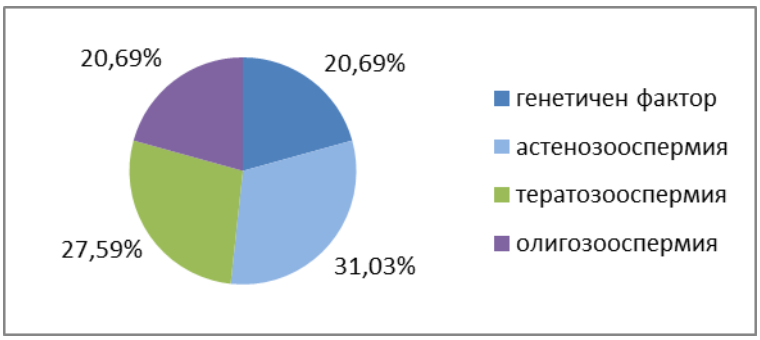
Беше извършена детайлна разбивка на причините за репродуктивни проблеми от страна на партньорките в проучването. Водещ фактор при повече от половината жени беше тубарният фактор (62.69%). Следващи по честота се подреждаха генетични причини – балансирани инверсии и транслокации (13.43%). Донорство на 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. 6).

Фиг. 6. 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. 7).

Фиг. 7. 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%).

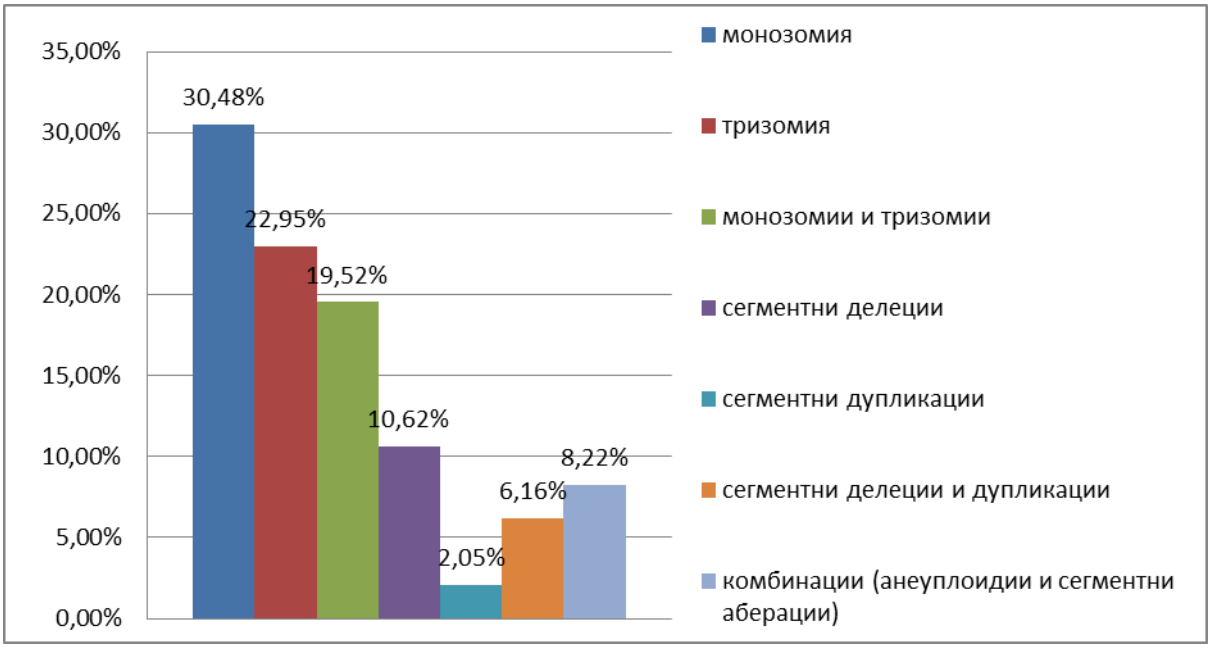
Структурните аберации бяха разделени на сегментни аберации при пациенти с нормален кариотип и сегментни аберации при пациенти с балансирано хромозомно преустройство. От всички 79 ембриони, съдържащи структурни аберации, 61 (77.22%) бяха на двойки, при които единият партньор е носител на балансирано хромозомно 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%).

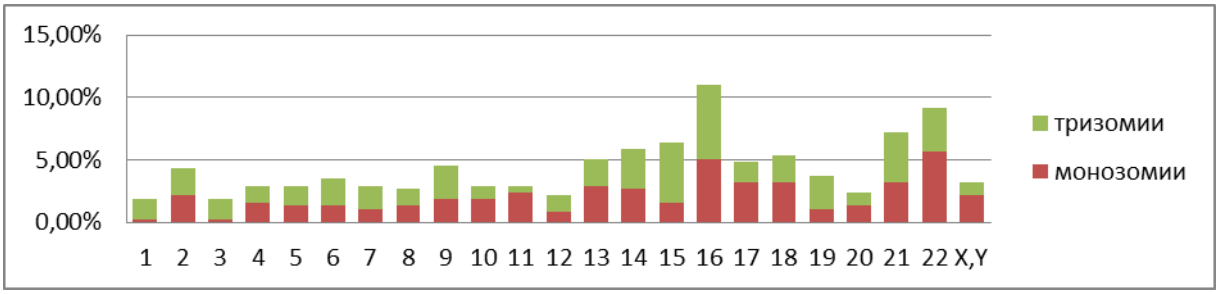
При 213 от всички небалансирани ембриони се срещаха само анеуплоидии – монозомия (30.48%), тризомия (22.95%), комбинация от монозомия и тризомия (19.52%). При 55 небалансирани ембриони се срещаха само сегментни аберации – делеция (10.62%), дупликация (2.05%), комбинация от делеция и дупликация (6.16%). Общо 24 ембриони имаха комбинация от анеуплоидия и сегментна аберация или 8.22% от всички 292 небалансирани ембриони (фиг. 8).

Фиг. 8. 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-често 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. 9).

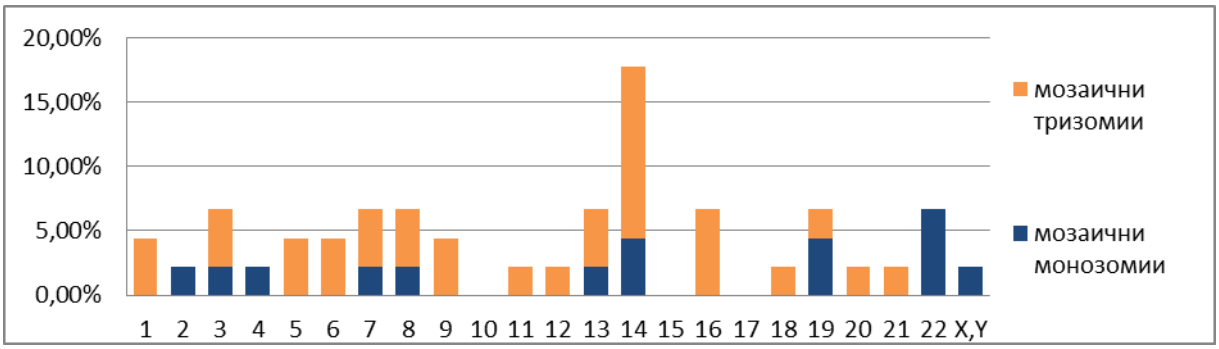
Фиг. 9. Процентно разпределение на анеуплоидиите по хромозоми:



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%).

Беше извършена оценка на мозаичните анеуплоидии. Най-често в мозаично състояние с дял 17.78% от всички мозаични анеуплоидии се срещаше хромозома 14 (фиг. 10).

Фиг. 10. 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.

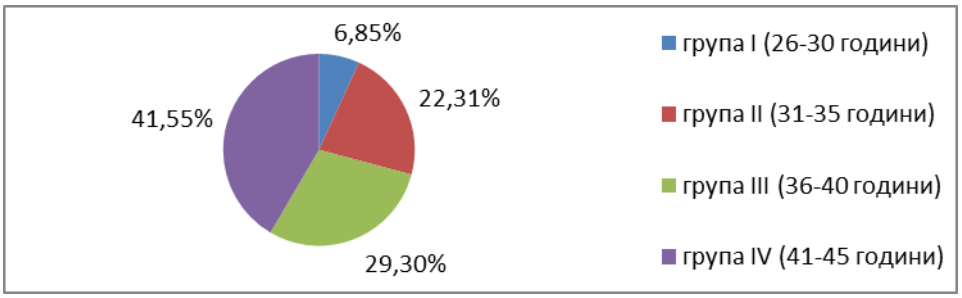
6. Честота на анеуплоидиите по възрастови групи

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. 11).

Фиг. 11. 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. 12, табл. 1).

Фиг. 12. Процентно разпределение на ембриотрансфер, биохимична бременност и живо раждане при пациенти с патологичен кариотип:

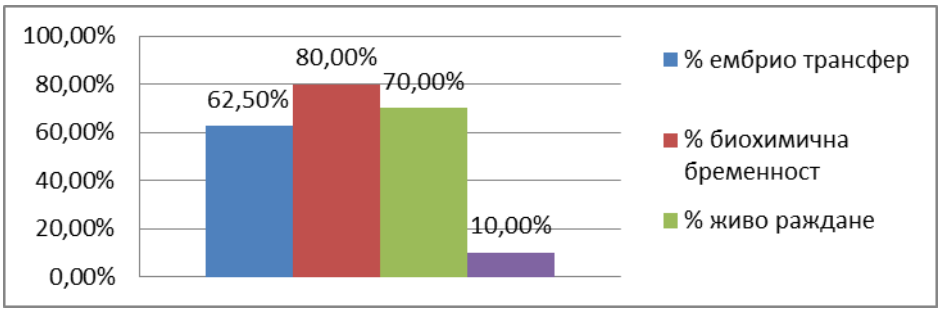


Табл. 1. Брой изследвани ембриони, балансирани и небалансирани ембриони, биохимична бременност и живо раждане при пациенти с патологичен кариотип:

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.

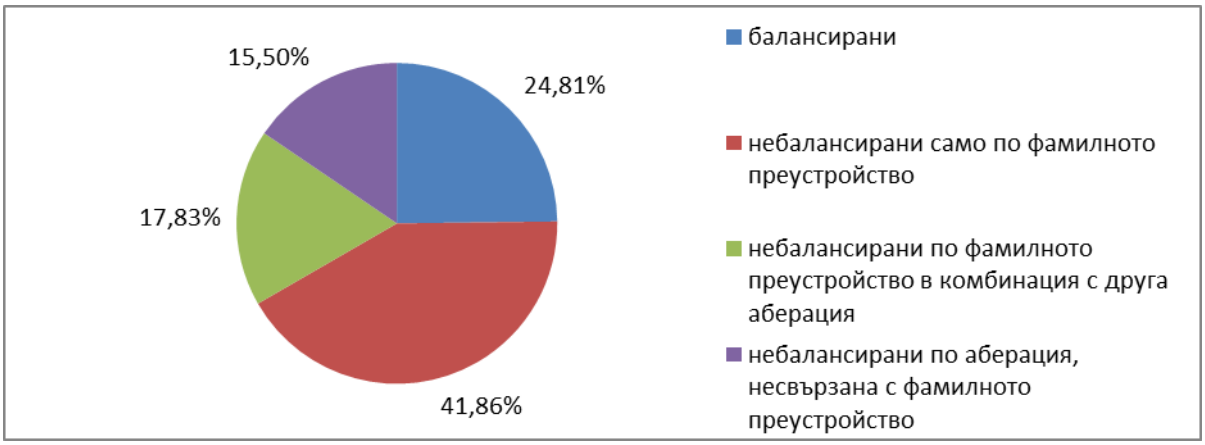
При носителите на реципрочни транслокации бяха анализирани общо 123 ембриона, двадесет и девет, от които бяха балансирани (23.58%) и 94 бяха небалансирани (76.42%). При девет от двойките с реципрочни транслокации (69.23%), които имаха един или повече еуплоидни ембриони, беше извършен трансфер. Останалите 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. Разределение 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 13. Разределение 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 ин витро процедури. 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 ин витро оплождане 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. 2). След ембриотрансфер беше постигната биохимична бременност, а впоследствие и живо раждане на дете, незасегнато от транслокацията на майката.

Табл. 2. 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. 3). Беше реализирана бременност, довела до раждане на здраво дете.

Табл. 3. 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. 4).

Табл. 4. Резултати от PGT:

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

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

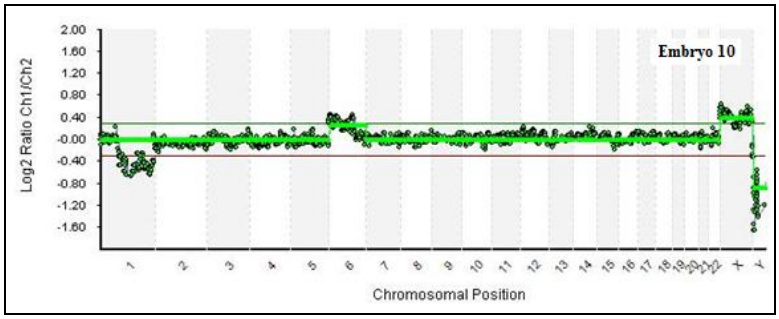
Касае се за двойка с репродуктивни неудачи – жена на 36 години и мъж на 44 години. Двойката има едно здраво родено дете, един аборт по желание и три последващи спонтанни аборти. При кариотипирането при партньора беше открита балансирана реципрочна транслокация между хромозоми 1 и 6 - 46,XY,t(1;6)(p31;q22). 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. 5, фиг. 14). След извършен емрбиотрансфер, беше установена биохимична бременност и постигнато раждане на здраво дете.

Табл. 5. 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. 14. 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)

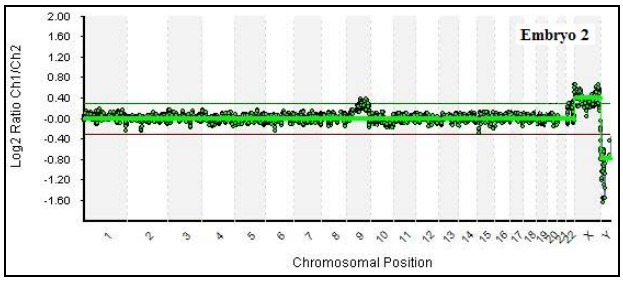
Касае се за двойка с няколко спонтанни аборта – жена на 41 години и мъж на 42 години. При жената с цитогенетичен анализ беше открит патологичен кариотип с балансирана транслокация между хромозоми 9 и 14 - 46,XX,t(9;14)(q12.1;p11.2). Чрез предимплантационен генетичен тест бяха установени 2 небалансирани 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 IVF-PGT-SR процедури, при които бяха установени 2 балансирани ембриона и 17 небалансирани ембриона. При първия и втория IVF-PGT-SR 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 IVF-PGT-SR цикъл бяха изследвани 3 ембриона, от които 1 беше балансиран и 2 бяха небалансирани (табл. 6, фиг. 15). Ембрионът беше с лоша морфология и не беше трансферириан.

Табл. 6. 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. 15. 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 IVF-PGT-SR процедура; като резултат беше установен един еуплоиден ембрион, който беше трансферириан. 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. 7). По настоящем двойката чака за следващ ин витро опит.

Табл. 7. 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,XY, 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,XY, t(11;13)(p15;q12). Чрез PGT-SR бяха анализирани 13 ембриона, 4 от които се оказаха балансирани и 9 небалансирани (табл. 8). Последва ембриотрансфер и биохимична бременност, която завърши с раждане на здраво дете.

Табл. 8. 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. 9). По настоящем двойката обмисля следващ ин витро опит.

Табл. 9. 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,XY,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,XY,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. 10). След извършения ембриотрансфер не беше установена биохимична бременност.

Табл. 10. 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. 11).

Табл. 11. 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. 12). Последва ембриотрансфер, но не беше отчетена биохимична бременност.

Табл. 12. 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. 13). Семейството обмисля следваща ин витро процедура.

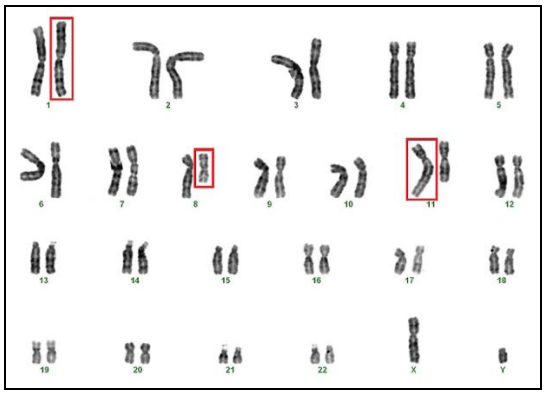
Табл. 13. Резултати от PGT:

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. 16).

Фиг. 16. 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→11q22::1p22→1pter):

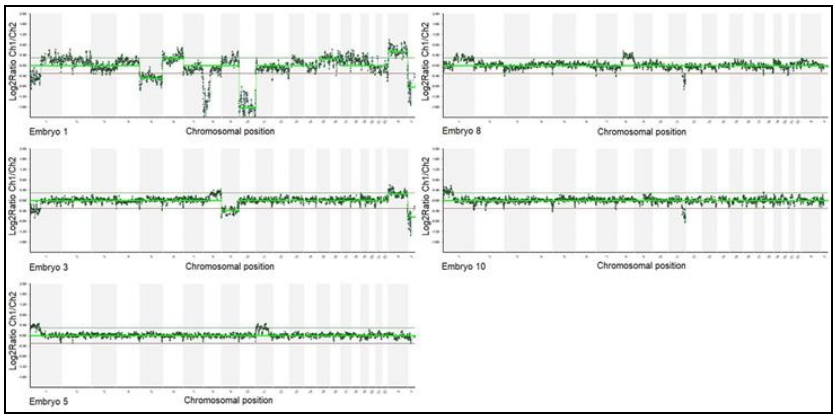


По дълъг протокол за стимулация на яйчниците бяха получени общо 9 яйцеклетки и беше извършена ICSI процедура със свежи сперматозоиди. Всички яйцеклетки бяха успешно оплодени и получените ембриони достигнаха етап бластомер. Беше размразен един ембрион на ден 3 от предишен ин витро цикъл. От общо 10 ембриона само 5 оцеляха до стадий бластоцист. От всички 5 ембриона, биопсирани за PGT, нито един не беше балансиран и не беше осъществен ембриотрансфер (табл. 14, фиг. 17). В момента семейството преминава втори IVF-PGT-SR цикъл.

Табл. 14. 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. 17. Геномен профил на изследваните с PGT-SR ембриони.

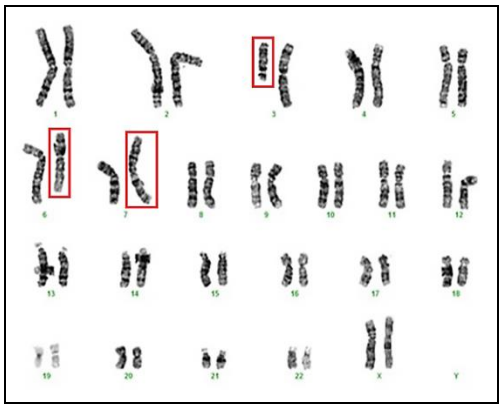


Клиничен случай 16 - 46,XX,t(3;6;7)(3pter->3q13.2::7p22-<7pter;6pter->6q21::3q13.2-

>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. 18).

Фиг. 18. 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 ICSI процедури. 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 IVF 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. 15, фиг. 19).

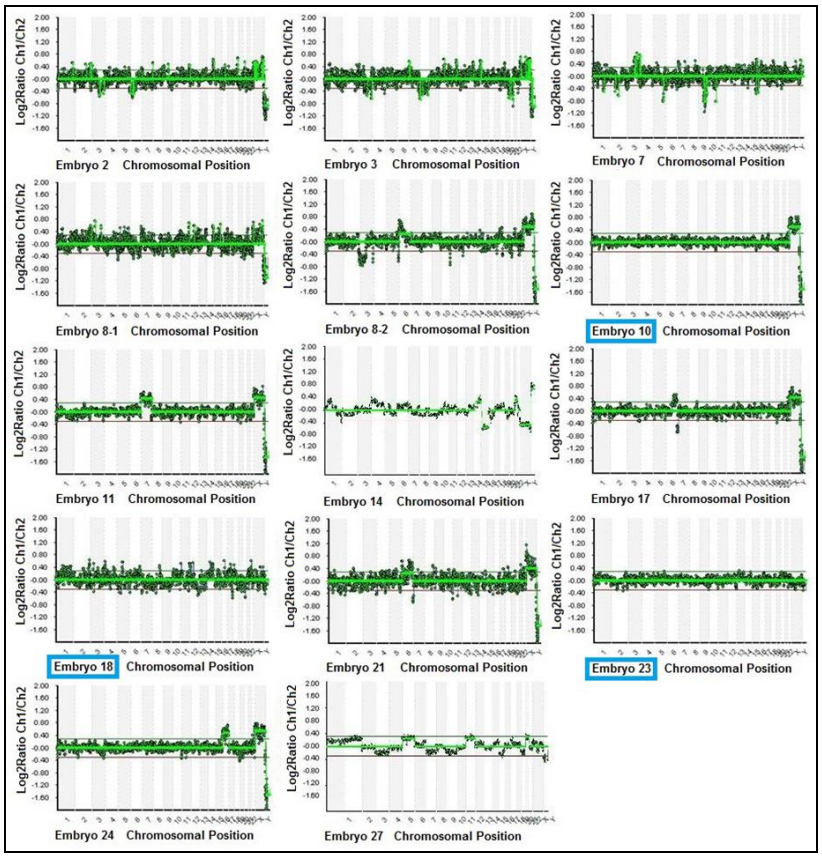
Два еуплоидни ембриона бяха прехвърлени на 6-ия ден след оплождането. Третият балансиран ембрион беше замразен за евентуален бъдещ трансфер.

Реализирана беше едноплодна бременност. Двойката беше посъветвана да проведе пренатална диагностика като част от стандартната PGT процедура 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. 15. 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. 19. 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:

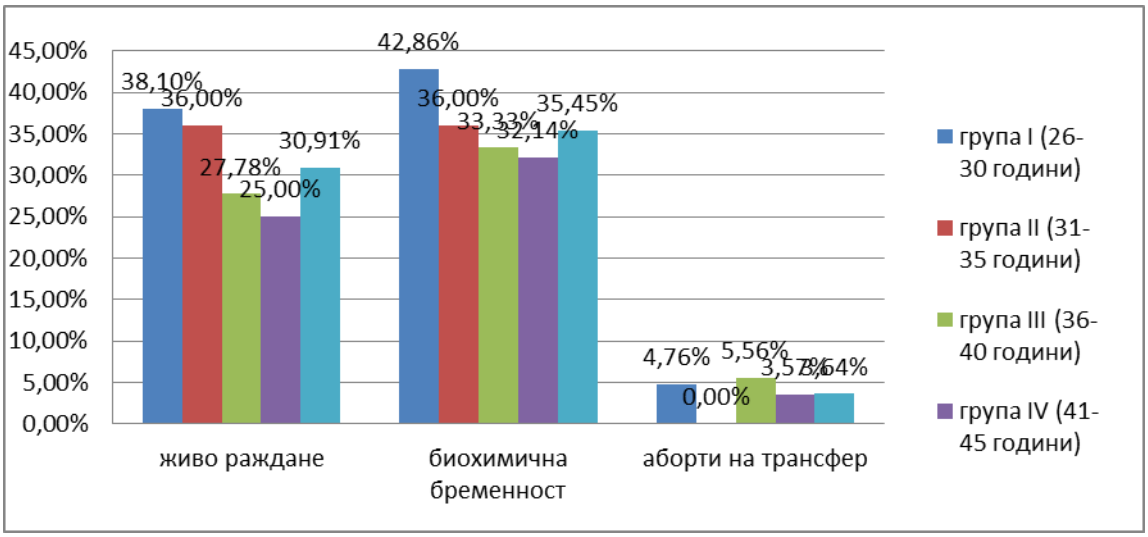
	Трансфер
група I	**да**
еуплоидни ембриони	
група II	**да**
1 или 2 анеуплоидии под 50%	
тризомия 1,3,4,5,6,8,9,10,12,17,19,20,22	
монозомия 1,2,3,4,5,6,8,9,10,12,13,16,17,18,19,20,21	
1 сегментна анеуплоидия под 50%	
хромозоми 1,2,3,4,5,6,8,9,10,12,16,17,19,20,22	
група III	**да**
1 или 2 анеуплоидии 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. 20).

Фиг. 20. 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. 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. SNP array може да открие небалансирани транслокации, частични анеуплоидии, унипарентални дизомии, но може да идентифицира мозаицизмите само при наличен значителен брой трофектодермални клетки. 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. NGS е най-новата платформа за PGT – техниката идентифицира небалансирани транслокации, частични анеуплоидии и подобрява откриването на мозаицизми. 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.

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

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. В допълнение, NGS методиката 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.

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

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. 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. В допълнение, наличието на единичен бластомер за анализ може да е причина за неубедителни или погрешни резултати.

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 IVF-PGT цикли 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. 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.

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%. Fragouli et al. доказват, че по-

малко от 6% от анализираните ембриони на стадий бластоцист са високостепенни мозайки.

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 инвитро цикъл.

Сравнение между тринадесет PGT-A проучвания, 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) съобщават за повишаване на степента на постигната бременност при трофектодермалната биопсия в сравнение с другите две техники.

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. 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. 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.

В настоящата работа, поради висок риск от мозаицизъм на 3-тия ден от ембриоталното 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.

Алтернативно 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.

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. Необходими са допълнителни добре разработени проучвания, за да се оцени ефикасността на използването на свободноклетъчната ДНК за целите на PGT.

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. Предполага се, че над 5% от всички хетеросексуални двойки са засегнати от безплодие. 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.

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 рядко след 35-годишна възраст. 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. Една трета от женския инфертилитет е причинен от тубарен фактор. Ендометриозата заема второ място като причина за безплодие с 25-30%. Честа причина за инфертилитет при жените са овулаторните проблеми, които се проявяват чрез оскъдни или липсващи менструални периоди. 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. 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%. 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.

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 IVF-PGT процедурата 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 IVF-PGT процедурите 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. 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%).

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.

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.

Установяването на вътрехромозомни сегментни аберации е от съществено значение за PGT диагностиката, 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.

Zhang et al. изследват 1014 бластоцисти, получени от 1220 PGT цикъла, 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. Превес взимат делециите с 71.6%, а дупликации се срещат в 28.4% от сегментните анеуплоидии.

Escriba et al. правят ретроспективно проучване на 822 PGT цикъла, 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.

Babariya et al. изследват 1327 бластоцисти от 635 инвитро 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.

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.).

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.

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. Сравнително нов феномен, известен като хромотрипсис, се изтъква като потенциална причина за сегментните хромозомни дисбаланси в предплантационните ембриони. 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. 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 нехомоложно свързване на краищата). 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.

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.

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. 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.

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. Въпреки това, тези небалансирани хромозомни преустройства често са летални и засегнатите ембриони най-вероятно се губят в началните стадии на развитие.

Бройни хромозомни аберации

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

Обстоятелствата, допринасящи за неправилното разпределение на хромозомите по време на мейозата при мъжете, не са добре разбрани. Доказано е, че грешките в анафазата при мейоза I, или мейоза II се появяват по-често с напредване на възрастта на майката. Някои изследвания, предполагат, че протоколите за индукция на овулация, използвани при стандартните IVF процедури, могат да засилят честотата на мейотичните грешки в ооцитите, като по този начин вторично увеличават анеуплоидията в получените ембриони. 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.

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.

Zhang et al. изследват 1014 бластоцисти, получени от 1220 PGT цикъла, 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%).

Редица други проучвания потвърждават, че хромозоми 22, 16 и 21 са най-податливи на тризомии в стадия на бластоцист. 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.

Установено е, че монозомията е по-честа от тризомията. 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. 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.

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.

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-често 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.

Проучвания при сперматозоиди показват, че тризомия 22 е значително по-често от останалите, въпреки че този факт не може да обясни високите проценти на тризомия 22, открити в ембрионите. 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. Sandalinas et al. твърдят, че дегенерацията на яйцеклетки при по-възрастни жени може да се дължи на дефицитен синтез на протеини, както предполагат и Steuerwald et al. По този начин се засягат протеините, които поддържат кохезията между сестринските хроматиди. Всяко

нарушаване на равновесието на тези протеини, 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. Установено е също, че хромозомите от групи E и G имат най-висок процент на анеуплоидия, предимно свързан с нарушения в разделянето на хроматидите.

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. 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. 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%).

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, докато други не откриват нарастване на имплантационния потенциал и процента живи раждания.

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 PGT-A техниката увеличава ембриоланлния имплантационен потенциал, намалява процентът спонтанни аборти, но въпреки това не успява да подобри процента живородени деца.

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.

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.

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.

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.

Тринадесет научни проучвания изследват клиничните резултати от приложението на PGT-A при пациентки в напреднала възраст (средна възраст 35 години). 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.

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.

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.

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.

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.

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%. 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-

А. 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.

6. Генетични фактори за инфертилитет

Хромозомните аномалии могат да доведат до репродуктивна недостатъчност, спонтанни аборти, пери- и постнатална смърт на плода. 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. 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. 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%, а честотата на хромозомните аномалии при инфертилни жени е 10,0%.

По неизвестни причини женските гамети са по-податливи на мейотични рекомбинационни грешки и са с по-голяма вероятност от анеуплоидия. 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. 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%).

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%). Общата честота на хромозомните аномалии се определя като 8,2%, което е повече от десеткратно увеличение спрямо нормозооспермичната популация (0,6%).

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. 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.

Транслокациите представляват 1,8–3,3% от автозомните аномалии при безплодни мъже. 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. 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.

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%).

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.

7. PGD-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 *in vitro* циклъла и 9.2 % от пациентите с три или повече спонтанни аборта в първия триместър.

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. 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.

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

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.

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.

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

Реципрочни транслокации

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.

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.

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. Въпреки това, за разлика от Робертсоновите транслокации, процентът на ембрионите, съответстващ на алтернативната сегрегация при реципрочните транслокации, е сравнително малък. При някои PGT цикли с 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.

Робертсонови транслокации

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. Въпреки това, при жените се наблюдават по-нисък оплодителен потенциал на ооцитите, забавено развитие на ембрионите и по-бавно формиране на бластоцисти. 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.

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

При Робертсоновите транслокации, през профаза на първото мейотично делене 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. 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.

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.

Fiorentino et al. провеждат двадесет и осем последователни PGT-SR цикъла 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.

Предишни проучвания показват, че предимплантационният генетичен тест за сегментни пренареждания 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.

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. Реципрочните транслокации представляват обмен на крайни сегменти между хромозоми от различни хромозомни двойки.

Сложните хромозомни преустройства 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. 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. 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.

Повечето носители на фамилни случаи на сложни хромозомни преустройства (CCR), включващи три или четири хромозоми с три или четири точки на разкъсване, са фенотипно нормални. Привидно балансираният CCR носител, обаче, може да е със значително увеличен риск от репродуктивни неблагополучия (181). 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%.

Предлагани са различни класификации на CCR - според тяхното естество, брой хромозомни разкъсвания, разпределение или участие на вътрехромозомни преустройства. 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 пренареждания 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.

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). 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). 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.

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. Повечето от носителките на CCR са идентифицирани поради напреднала възраст, многократни спонтанни аборти или раждане на анормално дете. По-голямата част от CCR при мъжете са документирани главно при случаи на мъжко безплодие. Обикновено мъжете, носители на сложни хромозомни преустройства, са инфертилни или субфертилни поради хипосперматогенеза или сперматогенен арест вследствие на сложните мейотични конфигурации. Следователно, унаследяването на CCR по бащина линия се счита за ограничено, но въпреки този факт подобни случаи са докладвани в няколко проучвания.

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.

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).

Потенциалните ползи от прилагането на PGT при носители на CCR са очевидни - увеличаване на шанса за раждане на здраво дете, подобряване на успеха на IVF 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.

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. 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. 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%.

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. В аналогично проучване честотата на спорадичната анеуплоидия, свързана с Робертсоновите транслокации, е 31%, докато при реципрочните транслокации е само 6%. 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%.

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. 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. 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. 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.

Още през 60-те години на 20 век е наблюдавана корелация между спонтанните аборти и хромозомните аномалии. 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. В следващите години са публикувани редица изследвания, свързващи спонтанните аборти с хромозомни аномалии, като процентът на абнормни кариотипи варира в рамките на 40-60%.

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 Х. 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.

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.

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.

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. 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. 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.

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%.

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. 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 PGT процедура

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.

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%).

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%).

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%).

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.

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.

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%).

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%). Те предполагат, че ембрионалната биопсия намалява процента на имплантация в сравнение с контролната група.

Въпреки че някои проучвания посочват ползи от PGT за реализирането на бременност, други автори не откриват подобрение в честотата на имплантация и живо раждане. 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. 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.

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.). 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

Най-хромозомно абнормните ембриони 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.

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.

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.

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.

В настоящия дисертационен труд 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 PGT цикъла 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.

11. PGT в момента

През последните години бяха анализирани редица нови стратегии, които навлизат драстично в клиничната практика на IVF (242-244). Въпреки че основното предимство на PGT процедурата 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.

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. APT 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

PGT-A има потенциала да се превърне в рентабилна процедура, в случаите, в които успее да намали броя на АРТ 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.

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 процедурата. 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.

PGT е ефективен начин за увеличаване на шанса за раждане на здраво дете. PGT повишава успеваемостта на IVF трансферите, 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 НА 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. 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.

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.

ИЗВОДИ

1. Основен фактор за репродуктивни неуспехи при повече от половината двойки е женският. При жените водещ фактор за инфертилитет е тубарният фактор, а при мъжете – отклонения в спермограмата, по-специално астенозооспермия и тератозооспермия.
2. PGT-A увеличава значително шанса за настъпване на бременност и живо раждане при жени в напреднала възраст.
3. PGT-A редуцира риска от настъпване на спонтанна загуба на бременността при жени в напреднала възраст.
4. PGT-SR е ефективен начин за подбор на балансирани ембриони в семейства с балансирани хромозомни преустройства, предотвратява предаването на фамилното преустройство в поколението и увеличава шанса за раждане на здраво дете.
5. PGT-SR значително намалява риска от аборт при носители на балансирани хромозомни преустройства.
6. Близо три четвърти от небалансираните ембриони при носители на балансирани хромозомни преустройства са засегнати от фамилното преустройство.

7. Наблюдава се статистически значим превес на небалансирани ембриони при жени, носители на фамилни преустройства.
8. Разпространението на хромозомните аберации при небалансираните ембриони в низходящ ред е следното: монозомия, тризомия, комбинация от монозомия и тризомия, делеция, комбинация от анеуплоидия и сегментна аберация, дупликация, комбинация от делеция и дупликация.
9. Най-голям процент хромозоми, включени в анеуплоидии, са хромозоми 16, 22 и 21, следвани от хромозоми 15, 14, 18 и 13.
10. Най-честа хромозома, включена в мозаични анеуплоидии, е хромозома 14, следвана от хромозоми 3, 7, 8, 13, 19 и 22.

ПРИНОСИ

1. Разработени, оптимизирани и въведени са 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. Доказано е, че PGT-A намира приложение сред техниките за подбор на ембриони при двойки с напреднала майчина репродуктивна възраст и множество спонтанни аборти.
3. Установено е, че PGT-SR осигурява правилна оценка на репродуктивния риск и профилактика при фамилни хромозомни преустройства.
4. Определени са честотата и типът на геномни нарушения в предимплантационни човешки ембриони.
5. За първи път в България е осъществено толкова обширно проучване на генетични нарушения в предимплантационни човешки ембриони.
6. Създадена е електронна база данни, съдържаща клинични данни за пациенти с репродуктивни неблагополучия и генетичен статус на техни ембриони.

Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд

Научни публикации във връзка с дисертационния труд:

1. Янева С.,Стайкова, Р. Станева, Г. Стаменов, Д. Тончева, С. Хаджидекова. Предимплантационни генетични тестове при ин-витро ембриони. Акушерство и гинекология, 2018; vol (57) 16-24
2. Yaneva Staykova S., Staneva R., Stamenov G., Pancheva M., Serafimova M., Nikolova K., Toncheva D., Hadjidekova S. Preimplantation genetic testing: method and two case studies of familial three-way complex translocations, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2019; vol (33), 1p.1663-1670 https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2019.1694435
3. S. Hadjidekova and S. Yaneva Staykova, R. Staneva, M. Pancheva, M. Serafimova, K. Nikolova, D. Toncheva, G. Stamenov, The utility of preimplantation genetic test in couples with history of infertility and pregnancy loss, Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 2020

Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд:

1. S. P. Hadjidekova, G. S. Stamenov, S. Y. Yaneva Staykova, B. B. Rukova, R. G. Staneva, K. S. Nikolova, D. I. Toncheva. Preimplantation genetic diagnosis by aCGH in woman with familial complex translocation - 46,XX,t(3;6;7); page 69: P01.079 https://www.eshg.org/fileadmin/www.eshg.org/conferences/2016/downloads/ESHG2016_Abstracts_final.pdf
2. R. Staneva, S. Hadjidekova, S. Andonova, A. Savov, S. Bitchev, S. Yaneva, M. Pancheva, M. Serafimova, T. Chaushev, K. Nikolova, D. Toncheva, G. Stamenov; Various approaches to preimplantation genetic testing - experience from seven monogenic disorders. European Human Genetics Conference, JUNE 16–19, 2018, Milan, Italy. P01.71C/C https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4652/presentation/885
3. S. Y. Yaneva Staykova, G. Stamenov, R. Staneva, M. Pancheva, M. Serafimova, K. Nikolova, O. Antonova, D. Toncheva, S. Hadjidekova. Preimplantation genetic test in couples with history of infertility and pregnancy loss. European Human Genetics Conference, June 15–18, 2019, Gothenburg, Sweden; P01.67C https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/7874/presentation/779
4. Янева Стайкова С, Станева Р, Рукова Б, Николова К, Тончева Д, Стаменов Г, Хаджидекова С. Предимплантационна генетична диагностика при пациенти с редки балансирани хромозомни аберации. Седма национална конференция за редки болести и лекарства сираци, 9-10 септември 2016, гр. Пловдив, стр.20. П23 https://www.eshg.org/fileadmin/www.eshg.org/conferences/2016/downloads/ESHG2016_Abstracts_final.pdf
5. Янева Стайкова С, Станева Р, Рукова Б, Николова К, Тончева Д, Стаменов Г, Хаджидекова С, Предимплантационна генетична диагностика при пациенти с редки балансирани хромозомни аберации, Седма национална конференция за редки болести и лекарства сираци, 9-10 септември 2016 г., Пловдив, България

6. Slavyana Yaneva Staykova, Rada Staneva, Blaga Rukova, Kristina Nikolova, Draga Toncheva, Gueorgui Stamenov, Savina Hadjidekova, Preimplantation genetic diagnosis for mosaic fragile chromosome 16, Младежка конференция Климентови дни“, 2016 г., София, България
7. Savina Hadjidekova Rada Staneva, Silvia Andonova, Alexey Savov, Stoyan Bitchev, Slaviyana Yaneva, Maria Pancheva, Maria Serafimova, Draga Toncheva, Georgi Stamenov, Pre-implantational genetic testing for monogenic and chromosomal disorders: the experience in Bulgaria, 12th Balkan Congress of Human Genetics, 8th National Conference for Rare Diseases, 8-10 September 2017, p.140-145, Plovdiv, Bulgaria

Summary

Preimplantation genetic test (PGT) is cutting-edge technology for early detection of genetic abnormalities in embryos prior to their implantation in the uterus. PGT prevents the transfer of affected embryos during in vitro fertilization (IVF) procedures and termination of pregnancy in pathological cases.

PGT is applied for monogenic disorders (PGT-M), structural rearrangements (PGT-SR) and aneuploidy (PGT-A). PGT-M is applied in families in which one or both parents are carriers of known monogenic defect; thus ensuring selection of unaffected embryos and prevention of the transmission of specific genetic mutations to the offspring. PGT-SR identifies embryos carrying unbalanced chromosomal rearrangements in families where one or both parents have a structural chromosomal abnormality. PGT-A detects embryos with de novo aneuploidies, deletions or duplications in couples with advanced maternal age, recurrent pregnancy losses, previous unsuccessful IVF procedures or severe male infertility.

In our study we report the results from 185 couples with history of infertility and pregnancy loss that had undergone IVF procedures with PGT. Maternal age ranged from 26 to 45 years. Patients were divided in 4 age groups – 26-30 (17.30%), 31-35 (18.38%), 36-40 (28.11%) and 41-45 years old (36.22%) respectively. Trophectoderm biopsy was carried out on 497 blastocyst stage embryos originating from 231 oocyte retrieval cycles.

Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) and next-generation sequencing (NGS) were subsequently performed. Of all 497 embryos tested 9 were non-interpretable (1.81%) and were excluded from further statistical analysis. 196 embryos had balanced profile (40.16%) and 292 embryos showed unbalanced profile (59.84%). Embryo transfer was performed in 109 cases (58.92%) and biochemical pregnancy was reported in 35.45%. Live birth rate was 30.91% and pregnancy loss occurred in 3.64% of cases. Our results show that the most significant increase in live birth rate was observed in the most advanced age group.

PGT-SR by aCGH and NGS were performed on 16 couples with balanced chromosomal rearrangements (15 translocation and 1 inversion carriers). 126 embryos

were analyzed - 32 (24.81%) showed balanced genetic profile and 97 (75.19%) – unbalanced. Embryo transfer was performed in 10 cases (62.50%). Biochemical pregnancy was reported in 80.00%. Live birth rate was 70.00%.

PGT decreases the number of meaningless transfers and reduces: the number of cases that require termination of desired pregnancy, the possible medical complications, and the associated psychological trauma. In couples with reproductive problems PGT increases the chance of conceiving with chromosomally balanced embryo, improves live birth rate per transfer and decreases the risk for pregnancy loss.