

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Жилкової Євгенії Станіславівни
**" ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ЗНИЖЕННЯ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ
ЧОЛОВІКІВ У СХІДНІЙ УКРАЇНІ",**

представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика

Актуальність теми дисертації.

За останні десятиріччя стало зрозуміло, що частка непліддя подружжя за наявності чоловічого фактору складає 40 -50 % за даними різних авторів. Причиною чоловічого непліддя можуть бути як перенесені інфекційні хвороби, захворювання ендокринної системи, анатомічні особливості, пов'язані з недиференційованою дисплазією сполучної тканини, так і генетичні фактори - хромосомні аномалії, мікрodelеції та генні мутації. Але майже у третини чоловіків з порушенням фертильності не вдається з'ясувати етіологію непліддя, що вказує на необхідність розширення сучасних уявлень про генетичні фактори регуляції сперматогенезу. У країнах Європи актуальними є вивчення впливу віку на рівень анеуплоїдій та фрагментації ДНК у чоловічих гаметах, тоді як в Україні дані щодо віку, критичного для репродуктивної функції чоловіків, практично відсутні. Разом з цим все більше подружніх пар обирає метод екстракорпорального запліднення для лікування різних форм непліддя. В рамках репродуктивних технологій актуальним є розробка підходів до вибору найкращого ембріону з високим імплантаційним потенціалом з метою отримання здорових нащадків. Крім цього, не можна забувати, що реформування вітчизняної медицини передбачає створення комплексу превенційних, прекоцепційних заходів профілактики народження хворої дитини як в самостійній вагітності, так при вагітності, отриманої методами IVF. У зв'язку з цим дисертаційна робота Жилкової Є.С. є актуальною, оскільки вона може мати як теоретичне

значення в розділі онтогенезу людини, так і суттєво вплинути на вибір тактики лікування пацієнтів з репродуктивними проблемами методами ДРТ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у рамках НДР «Вивчення клініко-патогенетичних механізмів розвитку недиференційованої дисплазії сполучної тканини в ремоделюванні еластично-тканинних структур організму людини» (номер державної реєстрації 0112U001027, 2014–2015 рр.) і «Генетичні передумови розвитку та корекції спадкової патології на різних етапах онтогенезу людини та тварин» (номер державної реєстрації 0116U005341, 2016–2017 рр.) медичного факультету ХНУ імені В. Н. Каразіна.

Наукова новизна одержаних результатів.

Новизна роботи полягає у визначенні критеріїв, за якими з великою долею вірогідності можна розрахувати ризики для групи чоловіків Східної України з порушенням фертильності: рівень фрагментації ДНК в сперматозоїдах вищий за 20%, діапазон рівнів фрагментації ДНК та анеуплоїдій відповідно 20–75% та 1,3–4,5 % у чоловіків старше 35 років. Крім цього, показано асоціацію підвищеного індексу фрагментації ДНК ($DFI > 20\%$) з поліморфними варіантами G919A і A2039G гена *FSHR* та рівня фрагментації ДНК і анеуплоїдій у чоловічих гаметах з поліморфними варіантами генів *MTHFR*, *MTRR*. Описані відповідні генотипи. Оцінено рівні DFI та анеуплоїдій у сперматозоїдах для чоловіків Східної регіону України, при досягненні яких знижується частота формування бластоцист високої якості в програмах ДРТ.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Результати дослідження мають теоретичну значимість для розуміння того, що резерв фертильності чоловіків залежить від нормальної диференціації клітин сперматозоїдів. Диференціація ж сперматозоїдів - складний багаторівневий процес, який контролюється багатьма генами. Маркерами

порушення процесу диференціації цих клітин можуть бути як морфологічні характеристики (показники спермограми), так і зміни в самій ДНК – її фрагментація чи дисперсія хроматину. В кінці-кінців ці зміни можуть приводити до порушень на рівні хромосом - анеуплоїдії, мікроделеції та ін., зменшуючи потенціал фертильності чоловіків. Генотипування з урахуванням поліморфізму певних генів допоможе при виборі тактики лікування даної групи пацієнтів.

Отримані дані складають основу для розробки в подальшому алгоритму генетичного обстеження чоловіків з порушенням фертильності та можуть бути використані у відповідних медичних закладах при консультуванні пацієнтів та виборі методу лікування, з метою підвищення ефективності останнього та профілактики народження генетично хворої дитини.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій(аналіз змісту дисертації).

Представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук робота побудована за традиційним зразком. Вона складається зі вступу, розділів "Огляд та аналіз літератури", "Матеріали і методи", експериментальної частини, яку викладено у чотирьох розділах, аналізу та узагальнення результатів, висновків, переліку використаних джерел, що включають 282 посилання. Дисертаційна робота викладена на 158 сторінках, проілюстрована 16 рисунками та 27 таблицями досліджень. Мета та задачі роботи чіткі, реальні для виконання.

У "Вступі" автором обґрунтована актуальність роботи, аргументована мета, з якої впливають завдання досліджень, визначена наукова новизна та практична цінність роботи.

В розділі "Огляд літератури" здобувачем описані найсучасніші дані літератури щодо частки чоловічого фактору у структурі непліддя в Європі та, зокрема, в Україні. Дисертантом також наведені дані, які вказують на

можливу хромосомну чи генну причини репродуктивних розладів у чоловіків як етіологічних чинників порушення сперматогенезу: особливості каріотипу, мікрodelеції, генні мутації / однонуклеотидні поліморфізми. В зв'язку з цим зроблено висновок про необхідність розширення сучасних уявлень про механізми генетичної регуляції сперматогенезу та, як результат цього, розробки нових протоколів лікування чоловічого непліддя, особливо ідіопатичного. Крім того, необхідність удосконалення вибору генетично здорових ембріонів при лікуванні непліддя з використанням методів ДРТ залишається актуальною проблемою в Україні так само, як у світі. Відпрацювання етапів консультування чоловіків з порушенням фертильності, адекватного діагностичного тестування та вибору тактики лікування може привести до зниження репродуктивних втрат у даній групі пацієнтів.

В розділі **“Матеріали та методи досліджень”** дисертаційної роботи показано, що дисертантом в більшості самостійно проведено дослідження великої групи пацієнтів (3 819) із залученням різноманітних методів. Дослідження проведено стандартним цитогенетичним, сперміологічним, молекулярно генетичним (ПЛР в реальному часі), молекулярно-цитогенетичним (FISH з використанням різних ДНК проб та SCD), імуноферментним (визначення рівня ФСГ і тестостерону у сироватці крові) та статистичним методами. Також проводилась оцінка розвитку та морфології ембріонів *in vitro* в циклах ЕКЗ. Матеріалу достатньо за об'ємом. В даному розділі представлена детальна його характеристика та описані методи. Методи сучасні, адекватні поставленим завданням, отримані результати не викликають сумнівів.

Результати досліджень та їх обговорення викладено у чотирьох розділах з узагальненням та списком опублікованих робіт в кінці кожного розділу.

В розділі 3.1. **“Обстеження та репродукційні особливості чоловіків”**

дисертант дає загальну характеристику груп чоловіків, які проходили обстеження стосовно порушення репродуктивної функції за різними ознаками та використовує при цьому такі показники як вік, характеристики еякуляту, інфекційні захворювання, каріотип, мутація delF508 гена CFTR, мікрделеція Y хромосоми в локусі AZF.

У розділі 3.2. "Дослідження молекулярно-генетичних основ зниження чоловічої фертильності" показаний зв'язок однонуклеотидних поліморфізмів A1298C гена *MTHFR* та A66G гена *MTRR* з рівнем анеуплоїдій та фрагментацією ДНК в ядрах сперматозоїдів у чоловіків з порушеннями фертильності. Відомо, що анеуплоїдний сперматозоїд чи сперматозоїд з фрагментованою ДНК здатний до запліднення, але процеси подальшого формування бластоцисти та імплантації ембріона можуть бути заблоковані на різних стадіях розвитку. В Україні дослідження однонуклеотидних замін в гені *FSHR*, як потенціальних причин азооспермії у чоловіків, практично відсутні. Тому представлені в роботі дані зв'язку поліморфних варіантів G919A і A2039G гена *FSHR* з рівнем фолікулостимулюючого гормону і тестостерону у чоловіків з азооспермією мають велике значення для диференціації типів такого порушення сперматогенезу. Мутація delF508 у 10 екзоні гена *CFTR* становить практично 70 % всіх мутацій гена *CFTR* і є однією з найбільш поширених причин порушення фертильності з приводу відсутності сім'явивідної протоки. В даній роботі мутація delF508 гена *CFTR* у гетерозиготному стані виявлена у 7,3 % (n = 3) пацієнтів з азооспермією і лише серед чоловіків з обструктивною її формою. Здобувачем розраховані частоти алелів і генотипів досліджуваних поліморфних варіантів генів у чоловіків зі зниженою репродуктивною функцією та порівняні з контрольною групою. Далі автор слушно зазначає, що певна частка секреторної форми азооспермії може бути пов'язана з хромосомними

аномаліями в каріотипі, наприклад такими, для синдром Клайнфельтера (47, ХХУ), що був діагностований у 7,3 % випадків.

Розділ 3.3. "Дослідження генетичних порушень у ядрах сперматозоїдів у чоловіків зі зниженою фертильністю" присвячений вивченню хромосомних аберацій і порушенню компактизації хроматину чоловічих гамет. Автор наголошує, що морфологічний аналіз сперматозоїдів не дає інформації про наявність хромосомних або генних порушень в ядрах сперматозоїдів так самі, як не дає відповіді на питання впливу вікового фактору на фертильність чоловіків. Останнє майже не досліджувалось в Україні. В даній роботі виявлена статистично значуща негативна кореляція між рівнем фрагментації ДНК сперми і часткою зрілих сперматозоїдів в еякуляті. Таку ж кореляцію виявлено між рівнем гамет, анеуплоїдних за хромосомою 21, і часткою зрілих сперматозоїдів в еякуляті у чоловіків зі зниженою фертильністю. При цьому морфологічні показники сперми були нормальні. Виходить так, що незрілість сперматозоїдів - це не лише порушення рухливості чи поява патологічних клітинних форм. Це є підвищений ризик народження дітей з хромосомними аномаліями. Крім цього, виявлена статистично значуща пряма кореляція між рівнем анеуплоїдій за статевими хромосомами і рівнем фрагментації ДНК у сперматозоїдах в еякуляті у чоловіків старше 35 років. Таким чином, вперше на прикладі населення Східної України показано, що вік понад 35 років може бути фактором ризику зниження чоловічої фертильності.

В розділі 3.4. "Зв'язок генетичних порушень у чоловічих гаметах з процесом раннього ембріогенезу" здобувач ставить питання про здатність зразків сперми низької якості до генерації ембріонів з нормальним потенціалом розвитку та досліджує вплив рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах на загальну частоту формування бластоцист та частоту формування бластоцист високої морфологічної якості у програмах ЕКЗ серед 30 чоловіків з різними змінами у спермограмі. Наведені дані показують

статистично значущу негативну кореляцію між рівнем фрагментації сперми ДНК і загальною частотою формування бластоцист серед ембріонів, отриманих у програмах ЕКЗ у чоловіків зі зниженою фертильністю. Встановлено, що критичним для процесу формування бластоцист у ході раннього ембріогенезу є рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів вищий 5,0 %. Також доведена статистично значуща кореляція між часткою сперматозоїдів, анеуплоїдних за хромосоми 13, 18, віком пацієнта та частотою формування бластоцист морфологічно високої якості. Таким чином, рівень фрагментації ДНК та анеуплоїдій сперматозоїдів має прогностичне значення щодо кількості і якості бластоцист, отриманих при проведенні ЕКЗ, у пацієнтів з порушеннями фертильності

У розділі **“Аналіз та узагальнення результатів дослідження”** Євгенія Станіславівна провела узагальнення експериментальних результатів у порівнянні їх з даними літератури. Це виглядає переконливо, бо свідчить про глибокі знання автора в цій галузі, вміння поставити завдання, методично їх вирішувати та об'єктивно оцінити отримані результати.

За результатами власних досліджень автором сформульовано 9 висновків, які чіткі, логічні, відображають основні положення дисертації, адекватні сформульованим автором меті та завданням дослідження. Дисертантом запропоновано ряд практичних рекомендацій, які впливають із результатів досліджень та можуть бути використані при створенні алгоритму обстеження чоловіків з порушенням фертильності з метою підвищення ефективності методів ДРТ та зниження ризиків народження хворої дитини. Результати досліджень включені до навчальної програми загального курсу «Медична генетика», який викладається на медичному факультеті ХНУ імені В. Н. Каразіна та використані при підготовці методичних рекомендацій «Диагностика нарушений эякулята и вспомогательные репродуктивные технологии : метод. указ. для студентов IV–V курсов мед. вузов и врачей-урологов, андрологов и гинекологов». Таким чином, результати проведених

досліджень узагальнені, викладені в основних положеннях та висновках дисертаційної роботи, які статистично обґрунтовані, аргументовані та достовірні.

Дискусійні запитання:

1. В цитогенетиці відомо таке явище, як прихований мінімальний мозаїцизм хромосом, особливо за статевими хромосомами. Насправді, пацієнти з репродуктивними проблемами можуть мати нестабільність по певним хромосомам, що буде проявлятися як мозаїцизм. Але, крім цього, відомий мозаїцизм як культуральний артефакт. Як Ви диференціювали справжній і псевдомозаїцизм у своїй роботі?
2. В своїй роботі Ви показали, що встановлено зворотній зв'язок між рівнем сперматозоїдів, анеуплоїдними за хромосомою 21 і часткою зрілих сперматозоїдів. Цим Ви, начебто, довели необхідність проведення передімплантаційної діагностики (ПГД) та пренатальної інвазивної діагностики, зокрема процедури амніоцентезу при отриманні вагітності методами ДРТ від чоловіків з порушеннями фертильності. На мій погляд це дуже прямолінійна заява, якщо порівнювати рівень анеуплоїдії $0,97 \pm 0,39$ %, частку зрілих форм $75,65 \pm 15,78$ % та ризики від проведення ПГД, інвазивної пренатальної діагностики в циклах ЕКЗ. Яка Ваша думка?
3. Ви стверджуєте, що перевищення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті значення 5,0 % визначено як критичне для процесу формування бластоцист при лікуванні непліддя з використанням допоміжних репродуктивних технологій. Це невелике значення цього показника. Чи не пробували провести якесь експериментальне дослідження і з'ясувати, можливо, це якийсь базовий рівень фрагментації ДНК клітин різних типів?
4. Щоб погодитись з Вашим ствердженням "... рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів має прогностичне значення щодо кількості і якості бластоцист, отриманих при проведенні ЕКЗ, у пацієнтів з порушеннями

фертильності..." мені не вистачає чистоти експерименту. Скільки разів було проведено таке дослідження для кожного пацієнта із досліджуваної групи? Чому саме метод SCD був використаний?

5. Які критерії оцінки високої морфологічної якості бластоцисти? Вони в роботі не прописані чітко. Залежність морфологічних властивостей бластоцист від показників сперми пояснюється не тільки наявністю хромосомних відхилень у ембріонах внаслідок запліднення ооцитів анеуплоїдними сперматозоїдами. Це невірне ствердження.

6. Ви рекомендуєте проведення передімплантаційної генетичної діагностики ембріонів подружжю, коли у чоловіка рівень анеуплоїдій за хромосомами 13, 16 і 18 у сперматозоїдах вищий за 1,3%. Треба пам'ятати про мозаїцизм хромосом, існування якого доведено саме на цій стадії розвитку ембріонів, тому метод ПГД, який до речі призводить до зниження частоти настання вагітності, Ви не вирішите це питання.

7. Треба відмітити, що робота наповнена дуже зрозумілими, статистично обґрунтованими і не перевантаженими інформацією таблицями, які легко читаються. Але, нажаль, Ви не змогли так само чітко представити малюнки, які мають деякі неточності.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 19 робіт, у тому числі 8 статей у наукових фахових виданнях зі списку МОН України, 2 — в іноземних наукових фахових виданнях, 2 — у наукових фахових виданнях України з суміжних галузей науки, 1 — в інших наукових виданнях України, 5 доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних конференцій, конгресів і з'їздів, 1 методичні рекомендації МОЗ України. Автореферат написаний у відповідності до змісту дисертаційної роботи і повністю віддзеркалює її суть.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту і оформлення. Оформлення дисертації та автореферату відповідає сучасним вимогам.

Принципових зауважень до оформлення та змісту дисертаційної роботи та автореферату немає. Водночас, слід зауважити, що в тексті дисертації зустрічаються невдалі стилістичні звороти, однак це не впливає суттєво на загальне позитивне враження від змісту та оформлення дисертації.

Висновок. Робота відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 26.562.02. Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну отриманих результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування вважаю, що дисертаційна робота Жилкової Євгенії Станіславівни “Генетичні аспекти зниження репродуктивної функції чоловіків в Східній Україні” відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор Жилкова Є.С. заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Завідувач молекулярно-цитогенетичної лабораторії
Медичного центру ТОВ "Ісіда-IVF", к.б.н.

Тавокіна Л.В.



Людмила Тавокіна

НАЧАЛЬНИК ВК

Л.В. Рябинчук
РЯБИНЧУК Л.В.
16.06.2017