

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Ткач Ірини Романівни "Особливості хромосомного статусу при ранніх репродуктивних втратах у людини", представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми дисертації.

Накопичений за останні десятиліття в науковій літературі досвід показує, що ранні репродуктивні втрати (РРВ) до 14 тижнів гестаційного розвитку серед усіх пренатальних втрат складають 75-80%. Важливо зазначити, що близько 50% ранніх мимовільних переривань вагітності до 14 тижнів спричинені аномаліями каріотипу. В основному це є чисельні зміни каріотипу, які, як правило виникають *de novo*. Тому вивченню етіології такого явища, як нестабільність хромосом, присвячена значна кількість досліджень. Це призвело до розуміння, що існує багато екзо- (радіація, екологія, віруси, нездоровий спосіб життя та ін.) та ендогенних факторів (вік жінки, соматичні захворювання та ін.), які можуть призводити до порушень в каріотипі, але це питання залишається відкритим з точки зору механізмів нерозходження хромосом. Гіпотетично однією з причин хромосомної нестабільності може бути вкорочення довжини теломерних ділянок та злипання критично коротких теломерних кінців хромосом. Роль теломер на етапі постнатального життя людини поки що неоднозначна, широко вивчається та обговорюється як у нормі, так і при патологічних процесах. Слід наголосити, що роль теломер на етапі пренатального розвитку людини, особливо на стадіях доімплантаційного ембріонального розвитку, ще остаточно не з'ясована. Припускають, що однією з обов'язкових умов успішного запліднення як *in vivo*, так і *in vitro* є цілісність теломерних ділянок хромосом. А патологічні процеси,

старіння, смерть, непліддя, невдалі запліднення як природні, так і в циклах ЗІВ можуть асоціюватися з вкороченими теломерами.

У зв'язку з цим дисертаційна робота Ткач І.Р. є актуальною, оскільки вона може мати теоретичне значення в розділі онтогенезу людини, а саме зв'язку РРВ з хромосомною патологією та нестабільністю теломерних ділянок хромосом. Це, в свою чергу, наштовхує на пошук маркерів хромосомної нестабільності та на створення профілактичних заходів з метою її усунення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідницьких робіт відділення діагностики спадкової патології ДУ "Інститут спадкової патології НАМН України" і виконувалась в рамках комплексних НДР: «Генетична природа репродуктивних втрат на різних етапах онтогенезу людини» (№ держреєстрації 0111U002657, 2010–2012 рр.); «Генетичні маркери навикового невиношування вагітності» (№ держреєстрації 0113U004155, 2013–2015 рр.); «Пошук маркерів нестабільності геному у реалізації порушень репродуктивної функції людини» (№ держреєстрації 0116U003799, 2016–2018 рр.), а також отриманих на конкурсних засадах двох грантів від Західноукраїнського Біо-Медичного Наукового Центру (WUBMRC).

Наукова новизна одержаних результатів.

Здобувач вперше у матеріалі ранніх репродуктивних втрат в терміні до 14 тижнів вагітності західного регіону України визначив частоту та спектр аномалій каріотипу шляхом комплексного застосування стандартного цитогенетичного та молекулярно-цитогенетичного (iFISH) методів аналізу препаратів, отриманих «прямим» способом з некультивованих ворсин хоріону.

У дисертаційній роботі вперше отримано дані відносної довжини теломер у матеріалі втрачених вагітностей 5-12 тижнів гестації та проаналізовано отримані

результати в залежності від типу втрат (спонтанні завмерлі вагітності чи артифіційні аборти). Вперше з високим ступенем вірогідності ($P=0.000001$) показано, що зменшення довжини теломерних ділянок хромосом у плода 5-12 тижнів внутрішньоутробного розвитку може призвести до хромосомного дисбалансу та бути провокативним фактором репродуктивних втрат у людини.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Результати дослідження мають теоретичну значимість для розуміння того, що хромосомний дисбаланс в каріотипі клітин може залежати від структурної або функціональної нестабільності теломерних ділянок хромосом. Тому, наприклад, такі фактори ризику, як вік жінки, недиференційованість статевих клітин, які швидше входять в апоптоз, ніж диференційовані, стрес, соматичні захворювання, екзогенні фактори та ін. може бути підґрунтям для репродуктивних втрат. Провокативними маркерами такої нестабільності може виступати багато факторів і серед них – зменшення довжини теломерних ділянок. Припустимо, що такі зміни можуть приводити до порушень на рівні хромосом – чисельних та структурних перебудов, які, в свою чергу, у високому відсотку приводять до ранніх репродуктивних втрат. Отримані результати дозволяють висловити припущення, що процес вкорочення теломер задіяний в комплексному механізмі, який приводить до ранньої загибелі ембріону.

Представлені дані складають основу для подальшого вдосконалення алгоритму генетичного обстеження подружніх пар при навиковому невиношуванні вагітності в першу чергу та можуть бути використані у відповідних медичних закладах при консультуванні пацієнтів.

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 літератури", "Матеріали і методи", експериментальної частини, яку викладено в п'яти підрозділах, аналізу та узагальнення результатів, висновків, переліку використаних джерел, що включають 305 посилань. Дисертаційна робота викладена на 141 сторінці, проілюстрована 15 рисунками та 27 таблицями із результатами 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 підрозділі 1.1. **“Огляду літератури”** дисертантом охарактеризоване саме поняття «втрачена вагітність». Автор зазначає, що за узагальненими даними, 15-20% клінічно діагностованих вагітностей закінчується мимовільним перериванням. У переважній більшості порушення фертильності має поліетіологічну природу, значну роль в якій відіграє генетична предриспови́зність. Автором чітко обґрунтована відмінність та описані границі між станами – спорадична (разова) втратами вагітності, навикове 'невиношування (ННВ), «первинний звичний викидень», «вторинний звичний викидень». ННВ є надзвичайно серйозною проблемою в репродуктивній медицині. Здобувачем наведені сучасні дані літератури стосовно частоти цього захворювання, етіології, генетичної складової та факторів ризику ННВ.

Підрозділ 1.2. присвячений раннім репродуктивним втратам, а саме генетичній складовій цього явища. Ранні репродуктивні втрати (РРВ) – це втрата вагітності у терміні до 14 тижнів гестаційного розвитку. Доведено, що хромосомні аномалії є найчастішою причиною спорадичних репродуктивних втрат (СРВ) у першому триместрі вагітності. Натомість внесок хромосомних аномалій у

ембріональному матеріалі при ННВ на сьогодні однозначно не окреслений. Опираючись на літературні дані автором детально охарактеризовані дослідження РРВ з точки зору біологічного матеріалу, традиційних та сучасних методів аналізу, спектру хромосомних аномалій, хромосомного мозаїцизму, будови та реплікації теломер.

Підрозділи 1.2.3. та 1.2.4 несуть висвітлену в науковій літературі найсучаснішу, але малочисельну та подекуди суперечливу інформацію, про будову теломерних ділянок хромосом, їх реплікацію, роль теломерази у видовженні теломер та ін. Назагал показано, що середня довжина теломер може залежати від віку, статі, наявності хронічних захворювань, мати популяційну залежність та змінюватись на різних етапах онтогенезу людини.

В розділі “Матеріали та методи досліджень” дисертаційної роботи детально описані застосовані цитогенетичні та молекулярно-цитогенетичні методи дослідження клітин ворсин хоріона мимовільно втрачених вагітностей (760 зразків). Визначення відносної довжини теломер методом ПЛР з детекцією флюоресценції в реальному часі (RT-PCR) здійснено на ДНК, виділеній з клітин ворсин хоріону 80-ти спонтанно елімінованих ембріонів та 25 артифіційних абортусів. Матеріалу достатньо за об'ємом. В даному розділі представлена детальна його характеристика та описані методи, які включають статистичний аналіз. Методи сучасні, адекватні поставленим завданням, отримані результати не викликають сумнівів.

Результати досліджень та їх обговорення викладено у п'яти підрозділах з узагальненням та списком опублікованих робіт в кінці кожного підрозділу.

В підрозділі 3.1. " Аналіз частоти та спектру аномалій каріотипу у матеріалі ранніх репродуктивних втрат" дисертант надає дані загальної частоти каріотипів з хромосомними аномаліями в зразках РРВ, яка становила

39.34%. Найчастіше зустрічались аутосомна анеуплоїдія – 48.49%. Основними аутосомними трисоміями були трисомія 16 (21.1%), анеуплоїдія по хромосомі 15 (8.4%), трисомія 22 (6.4%) та трисомія 21 (6.0%). Такі відхилення каріотипу в клітинах ВХ РРВ як поліплоїдія та гоносомна анеуплоїдія зустрілись приблизно з однаковою частотою – 29.09% та 22.42%.

У розділі 3.2. "**Частота та спектр аномалій каріотипу залежно від терміну втрати вагітності**" автор звертає увагу на існування трьох періодів розвитку вагітності: преємбріональний (від першого дня останньої менструації і до 5 тижнів), ембріональний (триває від 6 до 9 тижнів вагітності) та період плода (з 10-го тижня і до завершення вагітності). Дисертант дає характеристику кожному з трьох етапів. За даними, викладеними в цьому розділі, найвищий відсоток патології – 41.53% - зафіксували у матеріалі вагітностей, втрачених протягом 6-10 тижнів гестаційного розвитку. Дослідження проводилось стандартним цитогенетичним та молекулярно-цитогенетичним методами. Автор підтверджує отриманими результатами той факт, що повна форма трисомії по хромосомі 16 несумісна з розвитком плоду в другому триместрі, так само, як і постнатально. Її частота є статистично значуще нижчою у матеріалі РРВ після 11 тижня гестації ($p < 0.025$). Автором підтверджено, що частота трисомії по хромосомі 21 та гоносомна анеуплоїдія, які сумісні з життям, вірогідно зростає із збільшенням терміну гестації втрачених вагітностей.

Розділ 3.3. "**Особливості каріотипу втрачених вагітностей залежно від репродуктивного анамнезу та віку жінок**" викладені дані по дослідженню структури та частки певних аномалій каріотипу (поліплоїдій, аутосомних трисомій та моносомії X) у матеріалі втрачених вагітностей залежно від віку та репродуктивного анамнезу жінок. Для жінок старшого віку встановлене статистично значуще зростання частки аутосомних трисомій та зменшення

частоти поліплоїдій та моносомії Х у матеріалі ранніх репродуктивних втрат. Серед аутосомних трисомій у матеріалі втрачених вагітностей від жінок до 35-ти років найчастішими були 16, 21 та 15, 22, 13 та 18 у порядку спадання частоти, а від жінок старшої вікової групи - 16, 15, 22, 21, 13 та 14.

В розділі 3.4. "Відносна довжина теломер у матеріалі ранніх репродуктивних втрат" здобувач виклав результати дослідження відносної довжини теломер у матеріалі РРВ та артифіційних абортусів. З високим ступенем вірогідності ($P=0.000001$) показано, що для РРВ характерні короткі теломери хромосом у порівнянні з індукованими артифіційними абортами природної вагітності. Це може вказувати на зв'язок між довжиною теломер та життєздатністю ембріонів.

У розділі 3.5. **"Відносна довжина теломер у матеріалі ранніх репродуктивних втрат із хромосомними аномаліями"** дисертантом показана статистично значуща відмінність показників відносної довжини теломер в еуплоїдних зразках між досліджуваною групою РРВ та контрольною групою АА (0.64 ± 0.12 і 1.17 ± 0.14 відповідно, $P=0.006$). Цей показник також вірогідно вищий в еуплоїдних зразках в порівнянні зі зразками із порушенням каріотипу при РРВ. Особливо короткими теломерами характеризувалися РРВ з аномальним (трисомія по хромосомі 21 або 16, триплоїдія та моносомія Х) каріотипом. В літературі дані стосовно цього факту суперечливі. Але на думку здобувача, наявність аномалій каріотипу та коротких теломер є важливими чинниками ранніх репродуктивних втрат у людини.

В кожному підрозділі **"Результатів досліджень та їх обговорення"** Ірина Романівна провела узагальнення експериментальних результатів та порівняла 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 6 висновків, які чіткі, логічні, відображають основні положення дисертації, адекватні сформульованим автором меті та завданням дослідження. Отримані результати використані при підготовці методичних рекомендацій «Методичні підходи до дослідження генетичних передумов ранніх репродуктивних втрат у людини», Київ, 2016.

Таким чином, результати проведених досліджень узагальнені, викладені в основних положеннях та висновках дисертаційної роботи, які статистично обґрунтовані, аргументовані та вірогідні.

Дискусійні запитання.

1. Що вкладає автор в поняття геномні та хромосомні аномалії? Чим відрізняє їх?
2. В розділі “Огляд літератури” Ви посилаєтесь на роботу, автори якої нібито стверджують, що при відсутності аномалій каріотипу у матеріалі РВ ризик наступної втрати вагітності є вищим. Чи не могли б Ви детальніше на цьому зупинитись?
3. В цьому ж розділі Ви говорите про дисфункцію теломер хромосом внаслідок їх критичного вкорочення? Скажіть, будь-ласка, чи може бути дисфункція теломер без їх вкорочення? Що говорить з цього приводу література?
4. В своїй роботі Ви провели дослідження молекулярно-цитогенетичним методом з використання проб ДНК для обмеженої кількості хромосом. Як на Вашу думку, якби такі самі дослідження провести сучасними методами, наприклад, NGS на 24 хромосоми, чи були б виявлені суттєві розбіжності в результатах?

5. В таблиці 3.1 Ви наводите дані про цитогенетичні знахідки в матеріалі ранніх репродуктивних втрат. Скажіть, будь-ласка, як Ви пояснюєте той факт, що моносомія по X хромосомі не виявлялась традиційним каріотипуванням, а тільки iFISH?

6. У розділі “Огляд літератури” Ви наголошуєте , що до 90% вагітностей, які зупинилися в розвитку під час першого місяця вагітності (3-4тижні гестації), складають пусті плідні мішки без ембріону (анембріонія). Ця інформація надзвичайно важлива для лікарів репродуктологів як показник їхньої роботи. За даними літератури та моїми особистими спостереженнями для анембріонії характерний високий відсоток хромосомних аномалій в каріотипі (65-70%). Чи зустрічались у Вашому дослідженні втрачені вагітності з діагнозом анембріонія?

7. Скажіть, будь-ласка, як на Вашу думку можна використати представлені Вами дані в діагностиці та лікуванні пацієнтів з проблемами репродукції методами ДРТ?

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Відповідно до теми дисертації надруковано 19 публікацій (8 статей, 10 тез, 1 методичні рекомендації). Основний зміст дисертаційної роботи особисто здобувачем представлено на 7 міжнародних та вітчизняних з міжнародною участю конференціях та з’їздах. 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.

Рекомендації щодо використання результатів дослідження в практиці.

Автором вирішена наукова задача щодо створення реєстру родин Західноукраїнського регіону із групи ризику навікового невиношування вагітності. Впровадження у практику медико-генетичного консультування розроблених методичних підходів до цито- та молекулярно-цитогенетичного обстеження втрачених вагітностей дозволить оптимізувати підходи для преконцепційної профілактики ранніх репродуктивних втрат.

Робота відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 26.562.02.

Висновок. Враховуючи актуальність та обсяг проведених досліджень, наукову новизну отриманих результатів, обґрунтованість висновків, перспективи наукового та практичного застосування вважаю, що дисертаційна робота Ткач Ірини Романівни “Особливості хромосомного статусу при ранніх репродуктивних втратах у людини” відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» МОН України щодо кандидатських дисертацій, а її автор Ткач І.Р. заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Кандидат біологічних наук

Приватний вищий навчальний заклад

"Інститут загальної практики - сімейної медицини"

завідувач цитогенетичної лабораторії

МОЗ УКРАЇНИ
МЕДИЧНИЙ ЦЕНТР
ПВНЗ «ІНСТИТУТ ЗАГАЛЬНОЇ ПРАКТИКИ -
СІМЕЙНОЇ МЕДИЦИНИ»

Місцезнаходження:

02002, м. Київ, вул. Р. Окіпної, 85

Місце провадження господарської діяльності:

02132, м.Київ, Дніпровська набережна, 26-к

Код ЄДРПОУ: 34875712

Л.В. Тавокіна

