

ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Гонтарь Юлии Викторовны
«Цитогенетические характеристики разных онтогенетических этапов человека в рамках
ВРТ», представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.00.15 – генетика

Актуальность выбранной темы. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) – это относительно новая область медицины репродукции. Разработка данной системы стала возможной благодаря фундаментальной работе британских ученых Эдвардса и Стептоу. Благодаря использованию этой технологии в 1978 г. родился первый ребенок Луиза Браун. ВОЗ признает ВРТ самым эффективным методом лечения бесплодия. В мире ежегодно до 700 тыс. супружеских пар лечится от бесплодия с помощью экстракорпорального оплодотворения. По данным литературы в 2002 г. было отмечено рождение миллионного ребенка, зачатого с помощью данного метода. Количество пар с бесплодием ежегодно возрастает во всем мире, в том числе и в Украине. Как известно, причиной нарушения имплантации, спонтанных абортов или множественных пороков развития плода зачастую являются количественные хромосомные аномалии, возникающие на различных стадиях развития гамет и эмбрионов вследствие аномального мейоза, кроссинговера, диспермии и т.д. В этой связи актуальным является углубленный анализ частоты и спектра хромосомных нарушений на разных этапах развития человека, так как полученная информация позволит оценить вклад цитогенетических аномалий в этиологию бесплодия, в том числе мужского. Так, в соответствии с официальной статистикой, в 2012 г. зарегистрировано почти 12 тыс. случаев мужского бесплодия в Украине.

Как указано выше, в решении данных проблем помогают вспомогательные репродуктивные технологии, благодаря которым возможно провести хромосомный анализ ранних эмбрионов. Такой преимплантационный скрининг позволяет отсеять анеуплоидные эмбрионы, предупреждая их имплантацию, самопроизвольное прерывание беременности и рождение ребенка с патологией.

Учитывая вышеизложенное и принимая во внимание демографическую ситуацию в Украине, тема диссертации Гонтарь Юлии Викторовны, направленная на разработку цитогенетических характеристик сперматозоидов, клеток ранних эмбрионов, абортусов,

развивающихся плодов, а также лиц, лечившихся от бесплодия с помощью ВРТ, является чрезвычайно актуальной в научном и практическом аспектах.

Диссертационное исследование выполнено в рамках плановых научно-исследовательских работ ГУ «Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины» «Исследование факторов женского и мужского бесплодия в отдалённом периоде после аварии на Чернобыльской АЭС» (номер госрегистрации 0111U000755) за период 2011–2013 гг., а также Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина «Изучение клинико-патогенетических механизмов развития недифференцированной дисплазии соединительной ткани в ремоделировании эластично-тканых структур организма человека» (номер госрегистрации 0112U001027) за период, 2014–2015 гг.

Работа изложена в традиционном стиле на 174 стр. печатного текста и состоит из введения, разделов «Обзор и анализ литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследований и их обсуждение», заключения, выводов и списка использованных источников литературы, который содержит 220 наименований, среди которых 178 – зарубежных авторов. Диссертация иллюстрирована 35 таблицами и 36 рисунками.

Во **введении** представлены все обязательные структурные компоненты диссертации. Обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и 9 задач для ее достижения, научная новизна, теоретическое и практическое значение полученных данных работы, сведения о персональном вкладе соискателя, апробации и публикации результатов.

Раздел **«Обзор литературы»** изложен на 23 стр. Соискатель выделяет особенности кариотипа пациентов с нарушением фертильности, тяжелыми формами бесплодия и заключает, что «... получение здорового потомства в подобных случаях возможно лишь с применением ВРТ.»; наряду с традиционной спермограммой, соискатель описывает такие диагностические методы, как определение фрагментации ДНК сперматозоидов, числа анеуплоидий в них методом FISH, а также оценку зрелости половых клеток в эякуляте. Детально описана связь степени фрагментации ДНК сперматозоидов с апоптозом, повышением частоты самопроизвольных выкидышей, влияние оксидативного стресса на фертильность. Подробно проанализированы результаты цитогенетических исследований в доимплантационном и пренатальном периодах и т.д. Желательно было бы немного внимания уделить истории развития ВРТ, а также влиянию Чернобыльского радиационного фактора на фертильность. Данный раздел заканчивается резюме, в

котором, на наш взгляд, не хватило убедительности в обосновании чрезвычайной актуальности темы работы. По тексту встречаются некоторые опечатки и стилистические погрешности, которые не влияют на позитивное восприятие этого раздела.

Раздел **«Материалы и методы»** изложен на 17 стр. Представлена исчерпывающая информация о методах исследования, которые были использованы в работе: методика культивирования лимфоцитов периферической крови и приготовления препаратов метафазных и интерфазных клеток, методика культивирования клеток амниотической жидкости, прямой метод получения препаратов хромосом из ворсин хориона, а также с предварительным культивированием, окраска цитогенетических препаратов G- и C-методом, исследование амниотической жидкости FISH-методом, молекулярно-цитогенетическое исследование сперматозоидов FISH-методом с предварительной их деконденсацией, метод преимплантационной генетической диагностики на бластомерах и профэктодерме, метод определения степени фрагментации ДНК сперматозоидов, анилиновый тест с целью оценки степени конденсации хроматина сперматозоидов и, наконец, определения уровня их оксидативного стресса. Для обработки результатов исследований использованы статистические методы. Указано программное обеспечение.

Получение первичной информации и лабораторные исследования проводились на базе «Медицинского центра ИГР». Общее количество проанализированных образцов составило 8 663. Все вышеотмеченное свидетельствует об огромной, кропотливой и сложной работе, проведенной соискателем (это касается, прежде всего, трудоемкого цитогенетического анализа, его объема), а также о достоверности полученных данных. В этом плане выполненная работа уникальна. Сценарий выполненного масштабного систематического цитогенетического исследования воспринимался бы с еще большим интересом, если бы в этом разделе была представлена таблица, в которой содержалась бы основная информация о группах обследования, методах и объеме исследований.

Раздел **«Результаты исследований и их обсуждение»** изложен на 88 стр. и состоит из 5 подразделов. Каждый подраздел начинается с краткой аннотации, что улучшает восприятие фактического материала. Позитивным в изложении фактического материала является то, что соискатель сопоставляет его с данными литературы на протяжении всего текста, обсуждает и формирует свою точку зрения на выявленные особенности цитогенетических характеристик сперматозоидов. Автор показала, что среди обследованных пар с бесплодием наиболее часто встречающейся хромосомной аномалией была инверсия, среди полиморфных вариантов увеличение спутников и спутничных нитей акроцентриков, увеличение гетерохроматиновых районов аутосом. Это свидетельствует о

том, что при установлении этиологии бесплодия необходимо проводить исследование кариотипа супружеской пары. Существенным результатом работы является вывод о том, что повышенный уровень фрагментации ДНК сперматозоидов оказывает более негативное влияние на морфологию эмбрионов по сравнению с их аномальной конденсацией и показателями анеуплоидии. В работе выявлена прямая связь между возрастом матери и числом обнаруженных хромосомных аномалий. По результатам преимплантационного генетического скрининга установлена обратная зависимость между возрастом пациенток и количеством эмбрионов на цикл. Иными словами, чем выше возраст женщины, тем меньше эмбрионов можно получить после одной стимуляции. Аргументирована целесообразность повторной диагностики эмбрионов на 5 сутки после оплодотворения и необходимость проведения преимплантационной генетической диагностики для женщин возрастной группы старше 35 лет. На основании проведенных исследований соискатель аргументировано рекомендует при планировании беременности уделять пристальное внимание физиологическому состоянию не только женского, но и мужского организма и проводить **комплексную** оценку нескольких качественных характеристик сперматозоидов.

Сформулировано 10 выводов, которые полностью отражают решение поставленных 9 задач и, таким образом, достижение цели исследования. В первой строке выводов желательно было указать, что это «новое решение актуальной задачи...». Представлено 6 чрезвычайно важных для медицины и репродукции практических рекомендаций. Почему бы не оформить их в виде методических рекомендаций и, таким образом, утвердить МЗ Украины? Это однозначно повысило бы практическую ценность работы и способствовало внедрению полученных результатов в практику репродуктивных клиник.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы.

По материалам диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 6 статей в специализированных научных изданиях Украины, 2 — в иностранных специализированных научных изданиях, 8 — в других научных изданиях, Результаты и научные положения работы апробированы на отечественных и зарубежных форумах.

Научная новизна полученных результатов.

Впервые определены хромосомные аномалии, являющиеся этиологическим фактором развития трубной беременности и привычного невынашивания. Впервые выполнена корректная оценка влияния комплекса характеристик сперматозоидов, показатели которых достоверно превышают значения нормы, на морфологию и эуплоидность эмбрионов. Выявлена частота распространенных и редких (нуллисомий, тетрасомий)

анеуплоидий в доимплантационных эмбрионах по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X/Y. Впервые в Украине показана и обоснована эффективность повторной диагностики доимплантационных эмбрионов на стадии бластоцисты на пятые сутки с целью выявления мозаицизма и сохранения потенциально эуплоидных эмбрионов.

Полученные Юлией Викторовной данные расширяют современные представления о роли хромосомных аномалий в нарушении фертильности человека. Данные работы и их интерпретация открывают перспективы для дальнейшего развития медицины репродукции.

Практическое значение полученных результатов.

Практическую значимость работы сложно переоценить. Доказана необходимость комплексного исследования качественных характеристик сперматозоидов, влияющих на морфологию и хромосомный набор ранних эмбрионов, для проведения коррекции показателей и повышения выхода нормальных (эуплоидных) эмбрионов. Убедительно показана целесообразность повторной диагностики эмбрионов на пятые сутки после оплодотворения на стадии бластоцисты с целью повышения эффективности проведения ВРТ. Рекомендовано, чтобы оптимальное число получаемых в следствии стимуляции эмбрионов с эуплоидным набором хромосом составляло 5-7 на цикл ВРТ. Показана необходимость проведения преимплантационной генетической диагностики для женщин старше 35 лет. Модифицирована методика культивирования лимфоцитов периферической крови человека с целью получения высококачественных препаратов хромосом в более короткие сроки по сравнению с традиционным методом. Получен патент Украины на полезную модель № 83863, 2013.

Результаты, полученные Гонтарь Ю.В. – это весомый вклад в установление этиологии репродуктивных проблем человека. Рекомендовано проведение комплекса диагностических обследований супружеских пар с целью профилактики развития хромосомной патологии у детей.

Можно заключить, что полученные соискателем данные обусловили не только практическое значение, но и научную новизну работы.

Вопросы для дискуссии:

1. Как Вы правильно отмечаете в работе, что высокий уровень фрагментации ДНК сперматозоидов может приводить к нарушению оплодотворения, явиться причиной низкого качества эмбрионов, а также вызвать повторные самопроизвольные прерывания беременности. В Вашей работе высокий уровень фрагментации ДНК (около 60%) отмечался в возрастной группе 31-35 лет. Прошу подробнее объяснить этот факт.

2. В цель работы входило определение факторов риска возникновения хромосомных аномалий и нарушения фертильности. Конкретизируйте, наблюдалась ли при этом зависимость этих изменений от пола обследуемых лиц?
3. Возраст обследуемых лиц, которым проводили анализ кариотипа, был в интервале 16-71 г. Для каких возрастных групп показано использование ВРТ? Разработаны ли нормы в этом направлении и регламентирован ли официально максимальный возраст для лиц, которые обращаются к репродуктологам Украины с целью назначения программ ВРТ?
4. Из данных литературы следует, что в практической деятельности соответствующих европейских клиник допускается перенос ранних эмбрионов с выявленным мозаицизмом до 20%. Если при повторной диагностике раннего эмбриона на 5 сутки выявлен мозаицизм, то при каком его уровне в вашей практике все-таки допускается перенос эмбрионов в полость матки?
5. Какой оптимальный комплекс тестов цитогенетического обследования Вы рекомендуете при первичном и повторном обращении пациентов в репродуктивную клинику?
6. Вы являлись соисполнителем НДР «Исследование факторов женского и мужского бесплодия в отдалённом периоде после аварии на Чернобыльской АЭС». Каково Ваше мнение о влиянии радиационного фактора Чернобыльской катастрофы на возникновение хромосомных аномалий в мужских половых клетках, опираясь на данные диссертационной работы?
7. В обзоре литературы Вы акцентируете внимание о негативном влиянии курения и кофе на качественные характеристики хроматина сперматозоидов. Что мешало Вам учитывать действие этих факторов в работе?
8. На стр. 36 Вы пишете, что использовалась общебиологическая информация. Что она подразумевает?

Указанные замечания и вопросы ни в коей мере не влияют на высокую оценку представленной диссертационной работы Гонтарь Ю.В..

Вывод. Считаю, что диссертационная работа Гонтарь Юлии Викторовны «Цитогенетические характеристики разных онтогенетических этапов человека в рамках ВРТ» является завершённой научной работой и заслуживает высокой оценки. По актуальности, объёму выполненных цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований, углубленному анализу и интерпретации полученных результатов, новизне и практической значимости диссертационная работа Ю.В. Гонтарь полностью соответствует требованиям МОН Украины, предъявляемым к кандидатским

диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник Института
экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р.Е.
Кавецкого НАН Украины,
доктор биологических наук, ст. н. с.



Э.А. Дёмина



Е.В. Дюліної

М.В. Водичка

