

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Гонтар Юлії Вікторівни
«Цитогенетичні характеристики різних онтогенетичних етапів людини в
рамках ДРТ», яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата
біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика

1.Актуальність теми дисертації.

В останні десятиріччя стан репродуктивного здоров'я населення України, як і у всьому світі, має тенденцію до погіршення. Складовими цього процесу є непліддя (первинне/вторинне), звичне невиношування вагітності, народження в сім'ї дитини із ВВР. Не викликає сумніву той постулат, що певна частина репродуктивних проблем обумовлена генетичними факторами (хромосомними, генними). Хромосомні аномалії, які можуть виникати на різних стадіях розвитку гамет та ембріонів, приводять до порушення імплантації, самовільних викиднів, ВВР плода. Крім того, в групі пацієнтів із репродукційними проблемами з частотою приблизно 4-9 % зустрічаються такі, які є носіями хромосомних перебудов (сбалансованих/несбалансованих). В таких сім'ях ризик народження хворої дитини вищий.

За даними ВОЗ, на сьогодні у світі приблизно 17% населення звертається по допомогу в клініки, де проводиться лікування методами ДРТ. Накопичується все більше інформації, яка потребує аналізу, осмислення з подальшим використанням отриманих знань для ефективного лікування такої групи пацієнтів. Згідно існуючої в Україні нормативної бази постнатальне каріотипування являється базовим генетичним дослідженням для певної групи пацієнтів із проблемами репродукції (непліддя, невиношування вагітності, обтяжений генетичний анамнез). Але воно не відображає повної картини всіх онтогенетичних етапів розвитку зародків/плодів людини із прорахуванням можливих ризиків репродуктивних втрат. На етапі реформування вітчизняної медицини, як ніколи, стає актуальним створення комплексу превенційних, прекоцепційних заходів профілактики народження хворої дитини як в самотійній вагітності, так і при вагітності, отриманої методами IVF.

У зв'язку з цим дисертаційна робота Гонтар Юлії Вікторівни являється дуже важливою, своєчасною та актуальною. Вона висвітлює такі аспекти онтогенезу людини саме в рамках ДРТ, які можуть мати як теоретичне значення, так і суттєво вплинути на вибір тактики лікування пацієнтів із метою зменшення ризиків виникнення хромосомних аномалій плода.

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

Дана робота виконана в рамках НІР «Вивчення клініко-патогенетичних механізмів розвитку недиференційованої дисплазії сполучної тканини в рамках ремоделювання еластично-тканинних структур організму людини» (номер держреєстрації 0112U001027, 2014–2015рр., кафедра загальної практики-сімейної медицини ХНУ імені В.Н.Каразіна) та «Дослідження факторів жіночого та чоловічого безпліддя у віддаленому періоді після аварії на Чорнобильській АЕС» (номер держреєстрації 0111U000755, 2011–2013 рр., лабораторія генетики раннього розвитку людини відділу медичної генетики ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»).

3. Наукова новизна одержаних результатів.

Новизна роботи полягає у виявленні закономірності розподілу за статтю еуплоїдних, анеуплоїдних і поліплоїдних наборів хромосом в клітинах на різних етапах розвитку людини. Також дисертантом виділені хромосомні аномалії, які можуть опосередковано вказувати на ризик трубно́ї вагітності та звичного невиношування. Показано, що одночасне вивчення декількох характеристик сперматозоїдів, показники яких перевищують норму, може мати значення для підвищення ефективності при ЗІВ. Виявлено частоту поширених і рідких (нулісомій, тетрасомій) анеуплоїдій у доїмплантаційних ембріонах по хромосомах 13, 16, 18, 21, 22, X/Y. Запропоновано оптимальну кількість ембріонів для циклів ДРТ з високим виходом еуплоїдних ембріонів. Уперше в Україні показано ефективність повторної діагностики доїмплантаційних ембріонів на стадії бластоцисти на п'яту добу, які попередньо були досліджені на третю добу після запліднення, з метою виявлення мозаїцизму та збереження потенційно еуплоїдних ембріонів. Продемонстровано залежність виникнення анеуплоїдій від віку жінки.

4. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Результати дослідження мають теоретичну значимість, котра вказує на те, що процес розвитку здорового плода та народження здорової дитини перебуває в прямій залежності від якості кожного етапу розвитку.

Отримані дані носять прикладний характер, враховуючи те, що лікування методами ДРТ подружніх пар з проблемами репродукції з кожним роком все більше використовується в цілому світі та в Україні. Оптимізація та удосконалення таких технологій лікування неможливі без знання процесів, які відбуваються на кожному етапі онтогенезу людини. Отримані здобувачем дані можуть бути використані в клініках лікування безпліддя методами ДРТ.

5. 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 із вступу, розділів "Огляд літератури", "Матеріали і методи", результатів дослідження та їх обговорення, висновків, переліку використаних джерел, що включають 220 посилань, серед яких 178 - іноземних авторів. Дисертаційна робота викладена на 174 сторінках, проілюстрована 36 рисунками та 35 таблицями. досліджень. Мета та задачі роботи чіткі, реальні для виконання.

У Вступі автором обґрунтована актуальність роботи, аргументована мета, з якої чітко випливають завдання досліджень, визначена наукова новизна та практична цінність роботи. В цьому розділі здобувач дуже детально зупинився на частоті безпліддя - чоловічого, жіночого, охарактеризував етіологічні аспекти непліддя, вказав можливі етапи виникнення хромосомних порушень в онтогенезі, відмітив ідіопатичне безпліддя, при якому переважають генетичні фактори.

В розділі **“Огляд літератури”** автором описані сучасні літературні дані щодо частки чоловічого фактору у структурі безпліддя в Європі та, зокрема, в Україні. Дисертантом також наведені дані, які вказують на можливу хромосомну чи генну причини репродуктивних розладів у чоловіків, як етіологічні чинники порушення сперматогенезу. Автором детально обговорюються основні гіпотези виникнення фрагментованої ДНК у сперматозоїдах, що може впливати як на фертильність, так і на розвиток ембріонів на ранніх етапах при заплідненні *in vitro*. Важливо відмітити, що

Гонтарь Ю.В. розуміє, узгоджуючи це з даними літератури, можливий зв'язок між якістю сперматозоїдів (недиференційовані клітини з фрагментованою ДНК) та ризиком виникнення зародків з генною/хромосомною патологією.

Гіперстимуляція, вибір протоколу стимуляції жінок, якість ембріонів, в кінці-кінців народження здорової дитини - це ті питання, які постійно обговорюються на всіх симпозиумах. Ясно одне, що підхід має бути індивідуальним з урахуванням причини безпліддя, але мета одна - отримання якісних ембріонів. Автор посилається на роботи українських дослідників, які вносять свій вклад у світову наукову думку з приводу досліджень етапів онтогенезу людини в рамках програми ДРТ.

У розділі 2 дисертаційної роботи представлені **матеріали та методи дослідження**. Слід відмітити, що дисертантом самостійно досліджено велика група пацієнтів із використанням клітин різного походження. Дослідження проведено стандартним цитогенетичним та молекулярно-цитогенетичними методами. Використовували декілька методів вивчення стану хроматину сперматозоїдів. Матеріалу достатньо по об'єму. В даному розділі представлена детальна його характеристика. Методи, які використані в роботі, сучасні, адекватні поставленим завданням, отримані результати не викликають сумнівів.

Результати досліджень викладено у 5-ти розділах з узагальненням та списком опублікованих робіт в кінці кожного розділу. **В першому підрозділі автором показано**, що найчастіше зустрічались такі ХА, як інверсії хромосом (4,2 %) та варіабельність хромосом - збільшення супутників і супутничних ниток акроцентричних хромосом (4,0 %) і збільшення гетерохроматинових регіонів аутосом (4,0 %). Останні являються варіантами норми хромосом, але в групі пацієнтів із безпліддям частка таких змін вища та сягає 15 % (Чистяков В. В., 2011). Розрахунки показали, що мінімальний прихований мозаїцизм (наприклад, 45,X/46,XX, 45,X/47,XXX/46,XX, 47,XXY/46,XY) за статевими хромосомами як жінок, так і чоловіків підвищує ризик звичного невиношування вагітності у 6 разів і виникнення трубної вагітності — у 7,6 разу. Дисертантом імовірно показано, що за окремими відхиленнями у каріотипі пацієнти жіночої статі знаходяться в зоні ризику серед групи інфертильних пацієнтів. Ці дані збігаються із даними літератури.

У підрозділі **Цитогенетичні характеристики сперматозоїдів** здобувач робить висновок, що підвищений ступінь фрагментації ДНК сперматозоїдів

чинить більш негативний вплив на морфологічні характеристики ембріонів, ніж показники аномальної конденсації хроматину сперматозоїдів (у 2 рази) і ніж показники анеуплоїдії сперматозоїдів (у 3,7 разу). При підвищених показниках анеуплоїдності сперматозоїдів еуплоїдний набір хромосом ембріонів спостерігається в 1,5 разу частіше, ніж при комбінації підвищеної фрагментації і анеуплоїдності сперматозоїдів, а відсутність бластуляції — майже у 3,5 разу рідше. Це вказує на необхідність проведення дослідження фрагментації ДНК в усіх репродуктивних клініках.

В підрозділі **Цитогенетичне дослідження доімплантаційних ембріонів** дисертант доводить, що серед ембріонів, визначених як анеуплоїдні на третю добу, при повторному дослідженні їх трофектодерми на п'яту добу 19 % бластоцист визначаються як еуплоїдні. Такі помилкові втрати еуплоїдних ембріонів значно знижують ефективність процедури запліднення *in vitro* (ЗІВ). В цьому ж розділі міститься дуже важлива інформація: результати кореляційного аналізу показали, що відзначається зворотний зв'язок між віком пацієнток і середньою кількістю ембріонів на цикл, позитивний зв'язок виявлений між середньою кількістю ембріонів на цикл і середньою кількістю еуплоїдних ембріонів на цикл. Ці дані необхідно враховувати при корегуванні доз стимуляції жінок. Найбільші значення частки нормальних ембріонів у групі отримано для жінок, що дають 1–5 і 21–25 ембріонів на цикл.

Дуже важлива інформація стосується ембріони від батьків-носіїв збалансованих транслокацій: збалансованість геному бластомерів (незалежно від статі батьків) становила $\frac{1}{4}$ від усіх досліджених ембріонів, еуплоїдні ембріони зі збалансованими транслокаціями — $\frac{1}{8}$. Ці дані вказують на очікувану ефективність проведення передімплантаційної генетичної діагностики в такій групі пацієнтів.

Дослідження клітин різних етапів онтогенезу автором показало, що в геномі сперматозоїдів найчастіше зустрічається анеуплоїдії з 18-ї (27 %) та статевими хромосомами (30,3 %), в геномі преімплантаційних ембріонів — з 13-ї хромосоми (31,1 %), в геномі клітин абортусів — з 18-ї (40,6 %), у плодів — з 21-ї (72,2 %). Це може вказувати на значущість генів певних хромосом на окремих стадіях розвитку. Не менш важливим є висновок стосовно того, що співвідношення анеуплоїдій та еуплоїдного набору хромосом є збіжним для обох статей серед усіх об'єктів дослідження, крім ембріонів, які зупинилися у розвитку. Для жіночої статі воно складає 1:1, для чоловічої — 1,8:1. Це

означає, що ембріони жіночої статі мають більше шансів пройти ранні етапи розвитку.

Загалом Юлія Вікторівна провела узагальнення експериментальних результатів та порівняння 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 10 висновків, які чіткі, логічні, відображають основні положення дисертації, адекватні сформульованим автором меті та завдань дослідження.

Дисертантом запропоновано ряд практичних рекомендацій, які впливають із результатів досліджень та можуть бути використані при створенні алгоритму обстеження та лікування пацієнтів із проблемами репродукції із метою підвищення ефективності циклів та зниження ризиків народження хворої дитини.

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

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

Матеріал усіх головних розділів дисертації повністю викладено в опублікованих за результатами дисертації 24 друкованих працях (фахових наукових виданнях, внесених до переліку ДАК МОН України, міжнародних журналах), 8 тезах матеріалів наукових форумів, одного патенту України.

7. Відповідність автореферату щодо змісту і оформлення дисертації. Автореферат написаний у відповідності до змісту дисертаційної роботи і повністю віддзеркалює її суть. Основні положення дисертації та її висновки ідентичні за змістом автореферату. Оформлення дисертації та автореферату відповідає сучасним вимогам.

8. Рекомендації щодо використання результатів дослідження в практиці.

Отримані результати являються підґрунтям для розробки алгоритму цитогенетичного обстеження пацієнтів із проблемами репродукції на матеріалі різних етапів онтогенетичного розвитку людини. Таке обстеження

пацієнтів має використовуватись ще на етапі медико-генетичного консультування подружжя, коли можна запобігти народженню генетично хворої дитини.

9. Відповідність дисертації встановленим вимогам.

Рецензована робота за структурою та обсягом відповідає вимогам ДАК України і складається із вступу, розділів "Огляд літератури", "Матеріали і методи", результатів дослідження та їх обговорення, висновків, переліку використаних джерел, що включають 220 посилань, серед яких 178 - іноземних авторів. Дисертаційна робота викладена на 174 сторінках, проілюстрована 36 рисунками та 35 таблицями.

Дискусійні питання та зауваження:

1. 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 на загальне позитивне враження від змісту та оформлення дисертації.
2. На жаль, в цій роботі Ю.В.Гонтар віддала перевагу чоловічим гаметам, хоча, добре відомо, що вивчення жіночих гамет по полярним тільцям має не менше значення. Чи планує автор доповнити свою роботу в майбутньому такою інформацією?
3. Чи вважає за необхідне дисертант завжди використовувати декілька методів вивчення стану хроматину сперматозоїдів, а не один, наприклад, рівень фрагментації ДНК?
4. При проведенні традиційного каріотипування бажано чітко розділяти будь-які хромосомні перебудови (збалансовані, незбалансовані, кількісні, структурні) від поліморфізму хромосом за гетерохроматиновими районами. Відповідно до міжнародної номенклатури хромосом вони є варіантами норми і не несуть для пацієнтів такого ризику, як хромосомні аномалії, хоча мають тенденцію до накопичення серед пацієнтів із репродуктивними проблемами.
5. Роблячи висновок про можливий вплив мінімального прихованого мозаїцизму за статевими хромосомами (наприклад, 45,X/46,XX, 45,X/47,XXX/46,XX, 47,XXY/46,XY) на підвищення ризику звичного невиношування вагітності / трубної вагітності автор повинен проводити контрольне дослідження на некультивованих клітинах для виключення артефактів культивації. Чи проводилось таке дослідження?

6. Проведення на п'яту добу повторної FISH-діагностики ембріонів, що досягли бластуляції, анеуплоїдних за результатами діагностики на третю добу, підвищує вихід еуплоїдних ембріонів, але може знижувати частоту настання вагітності. Чи відслідковував дисертант це у своїй роботі?

7. Дисертантом надана рекомендація стосовного того, що оптимальною кількістю отриманих у програмах стимуляції ембріонів, що мають еуплоїдний набір хромосом, є 5–7 ембріонів на програму ДРТ. На мою думку, це спірне питання і воно потребує більш детального пояснення.

Таким чином, автором вирішена наукова задача щодо вивчення цитогенетичних характеристик статевих клітин (сперматозоїдів), доїмплантаційних ембріонів, ембріонів, які зупинились у розвитку (абортусів), плодів, які розвиваються, дорослих людей для виявлення факторів ризику появи хромосомних аномалій та порушення фертильності при використанні допоміжних репродуктивних технологій. Отримані дані можуть бути використані при виборі оптимального методу лікування в клініках ВРТ та відповідно медико-генетичного консультування з метою профілактики народження генетично хворої дитини. Ця наукова робота має фундаментальну і практичну значимість для розвитку репродуктивної генетики та медицини і відповідає профілю спеціалізованої вченої ради Д 26.562.02.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Гонтар Юлії Вікторівни «Цитогенетичні характеристики різних онтогенетичних етапів людини в рамках ДРТ» є завершеною науковою роботою. За актуальністю, новизною, глибиною, обсягом проведених досліджень і практичною цінністю дисертаційна робота Ю.В.Гонтар повністю відповідає вимогам ДАК МОН України, що ставляться до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика.

Завідувач молекулярно-цитогенетичної лабораторії

МЦ ТОВ "Ісіда-IVF "

канд. біол. наук.

Л.В.Тавокіна

