

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, доктора медицинских наук  
Черных Вячеслава Борисовича на диссертацию  
Екимова Алексея Николаевича «Возможности преимплантационных генетических  
технологий в детекции хромосомной и генной патологии эмбрионов человека»,  
представленную на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

В последние годы отмечается стремительное развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), медицинской генетики и генетики человека, в смежных областях репродуктивной медицины и биологии. Многочисленные исследования свидетельствуют о высокой частоте (до 50% эмбрионов и более) хромосомных аномалий, анеуплоидий вариаций числа копий, хромосомного мозаицизма на ранних стадиях пренатального развития. В значительной мере это обуславливает ранние репродуктивные потери и значительное количество случаев потерь беременности, относительно невысокую эффективность программ экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В настоящее время для детекции анеуплоидий у эмбрионов человека в основном используют две конкурирующие технологические платформы геномных методов исследования – высокопроизводительное (массовое параллельное) секвенирование (MPS/NGS) и сравнительную геномную гибридизацию на чипах (arrayCGH). Однако сравнительная оценка их эффективности для генетического тестирования на клетках преимплантационных эмбрионов недостаточно определена.

Диссертационная работа Екимова Алексея Николаевича посвящена оценке применимости и эффективности современных геномных технологий для детекции хромосомных аномалий и генных вариантов у эмбрионов человека, разработке и оптимизации методов преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) эмбрионов человека, и повышению их эффективности. Учитывая недостаточную изученность генетических нарушений у эмбриона (анеуплоидий, вариаций числа копий, мозаицизма), биологических факторов, связанных с их частотой и распределением в клетках эмбриона, а также недостаточную сравнительную характеристику методов и технологических платформ для выполнения ПГТ,

относительно низкую эффективность программ ВРТ, тема данного диссертационного исследования, несомненно, имеет высокую актуальность.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций,  
сформулированных в диссертации**

Диссертационное исследование А.Н. Екимова выполнено на репрезентативной выборке (3691 эмбрион, 448 супружеских пар, 454 ооцит-кумулюсных комплекса). Исследование проведено на высоком методологическом уровне с использованием большого числа современных молекулярно-генетических методов, в том числе высокоразрешающих методов исследования ДНК – массового (высокопроизводительного) параллельного секвенирования или секвенирования нового поколения (MPS/NGS), сравнительной геномной гибридизации на чипах (array CGH), ПЦР и ПЦР в реальном времени, полногеномной амплификации (MDA, PicoPLEX), фрагментный анализ ДНК, STR-анализ, SNP-гаплотипирование. Полученные в работе данные проанализированы с помощью адекватных методов статистического исследования.

Все задачи, сформулированные в работе, решены в полном объеме. Положения диссертации логичны, выводы и практические рекомендации обоснованы и непосредственно вытекают из полученных результатов.

Результаты диссертационной работы опубликованы в 35 научных работах, из них 4 публикации в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, 20 статей в рецензируемых научных журналах из списка Scopus и 11 тезисов в сборниках конференций, включенных в РИНЦ.

Предложенные автором рекомендации могут быть внедрены в широкую клиническую практику. Результаты исследования уже внедрены в практическую работу Института репродуктивной генетики и Института репродуктивной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, а также внедрены в практическую деятельность Российско-немецкого центра репродукции и клинической эмбриологии ООО "Поколение НЕКСТ".

Все это позволяет сделать заключение об обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе А.Н. Екимова.

### **Научная новизна и теоретическая значимость работы**

Научная новизна диссертационного исследования А.Н. Екимова обусловлена получением новых сведений о частоте и особенностях хромосомных аномалий, мозаицизма, копийности митохондриальной ДНК на преимплантационных стадиях развития эмбриона человека, связи анеуплоидии у эмбрионов с тератозооспермией и нарушением целостности ДНК в сперматозоидах.

В работе оценена эффективность использования различных технологий (NGS и aCGH) для преимплантационного генетического тестирования (скрининга) на анеуплоидии и детекции хромосомного мозаицизма. Разработана методика фрагментного STR-анализа с использованием полногеномной амплификации для генотипирования эмбрионов. Показана возможность и эффективность одновременно с генотипированием эмбрионов выполнять преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидий (ПГТ-А) и моногенные заболевания (ПГТ-М). Разработан метод гаплотипирования для ПГТ-М, основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с использованием микрочипов высокого разрешения. Установлено, что эффективность SNP-гаплотипирования зависит от качества полногеномной амплификации.

Обнаружено, что частота хромосомных аномалий в эмбрионах человека связана с уровнем митохондриальной ДНК (мтДНК). Выявлена ассоциация повышенной частоты анеуплоидий у эмбрионов при повышенном количестве морфологически аномальных форм сперматозоидов и увеличении уровня фрагментации ДНК сперматозоидов.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Результаты, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации А.Н. Екимова, обладают научной новизной и имеют существенное практическое значение для медицинской генетики и репродуктивной медицины. Данная диссертационная работа послужит научной и методологической основой для дальнейшего изучения различных изменений генома (геномных мутаций,

анеуплоидий, вариаций числа копий, хромосомного мозаицизма, вариаций числа копий и генных вариантов) в эмбрионах человека на этапах преимплантационного развития, повышения эффективности дородовой генетической диагностики, результативности программ ЭКО/ИКСИ и успешности решения проблем репродукции в супружеских парах с нарушением фертильности.

Несомненную практическую значимость имеет определение оптимального биологического материала и сравнение эффективности методов ПГТ с использованием различных технологий и методов, в частности высокопроизводительного секвенирования и сравнительной геномной гибридизации на чипах, необходимость комбинированного преимплантационного исследования на моногенные заболевания с тестированием на анеуплоидии (ПГТ-М + ПГТ-А). Возможность определения и оценки значимости хромосомного мозаицизма и родительского происхождения анеуплоидии имеет существенное значение у супружеских пар с высоким уровнем анеуплоидных эмбрионов в выборе использования донорских гамет в программах ВРТ. Разработан алгоритм преимплантационного генетического тестирования и возможного использования эмбрионов для переноса в зависимости от результатов тестирования, а также практические рекомендации. Выявлены биологические факторы (маркеры), ассоциированные с повышенной частотой анеуплоидии у эмбрионов, такие как повышенное количество сперматозоидов с фрагментацией ДНК и морфологическими аномалиями сперматозоидов (тератозооспермия), содержанием мтДНК в трофэктодерме бластоцист и клетках кумулюса, что следует учитывать при подготовке к ВРТ и необходимости проведения ПГТ-А.

Результаты, полученные в работе, могут быть использованы в практической работе медицинских центров репродукции и отделений ВРТ, их необходимо учитывать при диагностике нарушений фертильности и выборе тактики решения проблем репродукции, для профилактики генетических заболеваний у потомства. Кроме того, сведения, полученные в работе, могут быть использованы в лекционном курсе для студентов медицинских и биологических специальностей, врачей-генетиков, лабораторных генетиков, андрологов, гинекологов и специалистов в области ВРТ/ЭКО.

## **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа изложена на 131 странице печатного текста, построена по традиционному плану, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материал и методы, глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключение и выводы, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка условных сокращений и обозначений, основных терминов и определений, списка литературы и приложения. Текст диссертации иллюстрирован 17 таблицами и 13 рисунками. В ее библиографическом списке 107 литературных источников, из них 17 отечественных и 90 зарубежных.

В разделе «Введение» автором наглядно обоснована актуальность темы и целесообразность настоящего исследования. Цель работы сформулирована ясно и точно, задачи корректны и соответствуют цели исследования.

Глава 1 «Обзор литературы» в достаточной мере отражает современное представление о хромосомных аномалиях (анеуплоидиях, вариациях числа копий, хромосомном мозаицизме) и генетических особенностях (содержание митохондриальной ДНК) у эмбрионов человека, применимости различных цитогенетических и молекулярных методов для их детекции, используемом для этого биологическом материале, а также значимость преимплантационного тестирования для программ ВРТ. В целом материал изложен в логической последовательности, источники научной литературы хорошо подобраны.

В главе 2 приведена характеристика исследованной выборки биологического материала, описаны методы, использованные в работе, методология проведения конкретных исследований, а также методах статистического анализа.

В главе 3 представлено описание результатов, полученных в работе. На основе собственных данных исследования 264 бластомеров 3-го дня развития и 1630 образцов трофэктодермы обосновывается более эффективное использование в качестве материала для проведения преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) биопсийного материала трофэктодермы.

Автором выполнен анализ эффективности применения для полногеномной амплификации различных методик (PicoPLEX и MDA) и эффективности детекции анеуплоидии в эмбрионах с помощью высокопроизводительного секвенирования

(NGS) и методом сравнительной геномной гибридизации на чипах (aCGH). В 94,8% наблюдениях результаты ПГТ-А, полученные разными методами, совпадали, а в 5,2% случаев не совпадали. Показано, что метод MDA характеризуется меньшим соотношением сигнал / шум по сравнению с PicoPLEX (SurePlex).

С целью изучения особенностей хромосомного мозаицизма в различных участках эмбриона выполнено исследование клеток из трофэктодермы и внутренней клеточной массы бластоцист. Показана высокая частота мозаицизма, которая по данным высокопроизводительного секвенирования составила 41% (59% – при использовании aCGH). Установлено, что результаты ПГТ-А с помощью технологии NGS на биопсийном материале трофэктодермы до 6% случаев не совпадают с данными хромосомного матричного анализа клеток внутренней клеточной массы. Кроме того, обнаружено, что в эмбрионах с анеуплоидией в клетках трофэктодермы клетки внутренней клеточной массы также несут несбалансированные аномалии хромосом, в том числе дополнительные.

На основе STR-анализа (16 хромосом, 32 гена) разработан метод определения родительского происхождения генетических нарушений (анеуплоидии и генных вариантов, связанных с моногенными заболеваниями) у эмбриона. Исследованы клетки трофэктодермы от 167 эмбрионов (от 58 супружеских пар), в том числе 93 эмбриона от 23 семей с моногенными заболеваниями. Показана целесообразность проведения преимплантационного генетического тестирования на моногенные заболевания (ПГТ-М) в сочетании с тестированием на анеуплоидии (ПГТ-А), так как существует риск наличия у эмбрионов анеуплоидий.

Кроме того, исследовано влияние копийности мтДНК в трофэктодерме и кумулюсных клетках ооцита на наступление имплантации. Определено пороговое значение количества копий мтДНК (0,04 о.е.) в трофэктодерме, превышение которого позволяет предполагать неудачу имплантации (чувствительность – 76,8%, специфичность – 74,9%), при этом копийность мтДНК в трофэктодерме независимо от наличия или отсутствия анеуплоидии у эмбриона увеличивается с возрастом женщины, а в кумулюсных клетках наоборот – снижается.

Установлена статистически значимая зависимость между количеством (%) морфологически нормальных сперматозоидов и хромосомным набором у

эмбрионов. У мужчин с тератозооспермией (содержание морфологически нормальных сперматозоидов менее 4%) (n=66) частота эуплоидных эмбрионов значимо ниже, а частота трисомии и моносомии по аутосомам, трисомии по половым хромосомам, делеций и дупликаций выше по сравнению с мужчинами (n=81), у которых количество морфологически нормальных сперматозоидов более 4%. Выявлена статистически значимо более низкая частота эуплоидных эмбрионов и более высокая частота делеций и дупликаций при повышенной частоте фрагментации ДНК в сперматозоидах по сравнению с нормальным ( $\leq 15\%$ ) индексом фрагментации ДНК.

По результатам проведенного исследования автором разработан алгоритм преимплантационного генетического тестирования на биопсийном материале клеток трофэктодермы и использования эмбрионов для переноса/утилизации в зависимости от результатов тестирования, наличия эуплоидности, анеуплоидности или хромосомного мозаицизма, необходимости исследования родительского происхождения анеуплоидий.

В главе 4 автор обсуждает результаты, полученные в диссертационной работе, сопоставляя их с данными литературы согласно каждому из шести подразделов главы 3 «Результатов собственного исследования».

В целом, текст диссертации написан хорошим литературным языком, изложение обзора литературы и результатов диссертационного исследования хорошо структурировано и логично. Выводы сформулированы кратко и ясно. Предложены возможные перспективы и направления дальнейших исследований, а также даны практические рекомендации.

Автореферат диссертации в достаточной мере отражает текст диссертации и основные результаты, полученные в работе.

Принципиальных замечаний по работе нет. Из несущественных замечаний можно отметить следующие:

В разделе «Введение» в разделе, посвященном актуальности исследования, не приведены литературные ссылки.

В обзоре литературы нет иллюстративного материала (рисунков или таблиц). Для восприятия было бы весьма полезным наличие таблицы, в которой бы

приведена сравнительная характеристика методов, используемых для преимплантационного генетического тестирования (высокопроизводительно секвенирования, сравнительной геномной гибридизации, количественной флуоресцентной ПЦР и FISH), их преимущества и недостатки.

Раздел 1.2 Главы 1 (Обзор литературы), посвященный хромосомным аномалиям, небольшой и представлен не вместе с разделом 1.6, посвященным хромосомному мозаицизму (он представлен в конце обзора). Логичнее было бы расположить их вместе в начале обзора литературы, вместе с разделом 1.4 – Биоматериал для ПГТ, а потом переходить к описанию различных генетических методов исследования. В Главе 2 (Материалы и методы исследования) в описании биологического материала, использованного для исследования, не приводится описание супружеских пар (возраст пациентов, клинические диагнозы, формы нарушения фертильности, кариотипы, сперматологические диагнозы и др.). Не обосновывается выбор генов и не приведены последовательности праймеров, использованных для STR-анализа и SNP-типирования.

В главе 3 «Результаты собственных исследований» в разделе, посвященному выбору оптимального биологического материала для преимплантационного генетического тестирования не приведены статистические доказательства преимущества использования для исследования клеток трофэктодермы по сравнению с биоптатами бластомеров.

При оценке эффективности ПГТ методом NGS и arrayCGH обнаружено расхождение результатов в 2 случаях, в обоих по данным секвенирования обнаружен нормальный мужской кариотип, а по данным arrayCGH – 47,XXY (что соответствует синдрому Клайнфельтера). Возникает вопрос, как быть в случаях – выявления по данным arrayCGH у эмбрионов кариотипа 47,XXY, особенно, если других эмбрионов, пригодных для переноса нет? Нужно или нет повторное тестирование данных эмбрионов, если да, то каким методом и в каких случаях?

В таблице 15 (Результаты комплексного применения ПГТ-А и ПГТ-М) указано, что по данным ПГТ количество эмбрионов, пригодных для переноса, составило 38 (из них носители генных вариантов - 18). Но суммарно получается не

38, а 23, из них 18 – гетерозиготные носители и 5, не подлежащие переносу из-за наличия двух мутаций (не указано в таблице). Требуется разъяснить.

В разделе, посвященном исследованию связи анеуплоидии с фрагментацией ДНК в сперматозоидах и количеству морфологически аномальных сперматозоидов, не указан средний возраст женщин в сравниваемых группах. Это существенно, поскольку при различии в возрасте, отличия в частоте анеуплоидии могли быть связаны с этим фактором.

В тексте диссертации встречается небольшое количество опечаток и ошибок согласования, некоторая вольность в терминологии и стилистические неудачные выражения, которые иногда изменяют смысл, например: «хромосомный состав», «хромосомные патологии», «патологический кариотип», «на стадии митоза», «анеуплоидий в аутосомах (хромосомах)», «мозаичные клетки», «минимальный риск для развития эмбриона», «трофэктодерма содержит от трех до десяти клеток (в среднем пять клеток)», «... в ходе экспериментально полученных данных...», «мозаицизм методом NGS».

«Пример выдачи заключения на ПГТ» вместо «Пример заключения по ПГТ»

Некоторые формулировки слишком длинные и не всегда вполне отражают смысл, например:

«анализ возможности влияния уровней мтДНК в кумулюсных клетках и трофэктодерме на частоту анеуплоидий эмбрионов» вместо -

«анализ содержания мтДНК в кумулюсных клетках и трофэктодерме и частоты анеуплоидий у эмбрионов».

Некоторые фразы на латинском языке приведены не курсивом, например, «*de novo*», «*in vitro*», «*in situ*».

Следует отметить, что высказанные замечания касаются в основном оформления диссертации и не снижают общей положительной оценки выполненной автором работы.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Екимова Алексея Николаевича на тему: «Возможности преимплантационных генетических технологий в детекции

хромосомной и генной патологии эмбрионов человека», выполненная под руководством доктора медицинских наук Каретниковой Наталии Александровны и представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика, является завершенной научно-квалификационной работой, имеющей существенное научное и практическое значение для медицинской генетики, репродуктивной медицины и смежных с ними медицинских и биологических дисциплин.

Диссертационная работа соответствует критериям, установленным п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2011г., №1168 от 01.10.2018г.), предъявляемых к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.7. Генетика.

28.08.2022г.

Зав. лаборатории генетики нарушений репродукции

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

(ФГБНУ МГНЦ),

доктор медицинских наук

шифр научной специальности: 1.5.7. Генетика

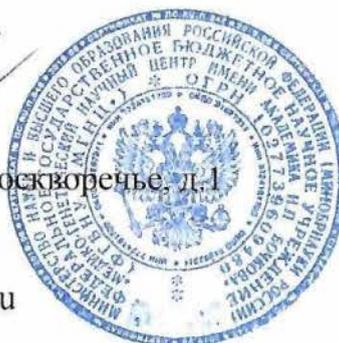
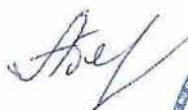


В.Б. Черных

Подпись Черных Вячеслава Борисовича заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», к.м.н.

Воронина Екатерина Сергеевна



Адрес организации: 115522, Москва, ул. Москворечье, д.1

Тел.: +7 (499) 324-86-07; +7 (499) 612-00-37

Адрес электронной почты: mgnc@med-gen.ru