

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора

Фетисовой Ирины Николаевны

на диссертационную работу 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 исследования

Одна из актуальных проблем современной медицины – предупреждение рождения детей с наследственными заболеваниями. В течение последних десятилетий в Российской Федерации широко применяются методы преконцепционной профилактики и пренатальной диагностики. Однако, инвазивные процедуры (биопсия хориона, амниоцентез, плацентоцентез, кордоцентез) предполагают внутриматочное вмешательство на фоне прогрессирующей беременности, и необходимость прерывания беременности в случае диагностики хромосомной или моногенной патологии плода.

Зарождение эмбриона с хромосомным дисбалансом может быть вызвано наличием сбалансированных структурных хромосомных перестроек у родителей, при которых закономерно нарушается ход гаметогенеза, формируются аномальные гаметы, участие которых в процессе оплодотворения и определяет наличие генетической патологии у эмбриона/плода. Однако практика медико-генетического консультирования показывает, что в супружеских парах с нарушенной репродуктивной функцией (НРФ) наличие хромосомных aberrаций у одного из супругов определяется не более, чем в 5-7% семей. В подавляющем большинстве случаев у супругов с нарушенным деторождением при цитогенетическом обследовании диагностируется нормальный кариотип, следовательно,

хромосомный дисбаланс эмбриона связан со случайными геномными или хромосомными мутациями, возникающими в ходе гаметогенеза у родителей хромосомными мутациями, возникающими в ходе гаметогенеза у родителей. Как известно, основным фактором риска возникновения подобных генеративных мутаций является возраст родителей, хотя нельзя исключать негативного влияния на ход гаметогенеза других факторов (наличие воспалительного процесса, использование определенных групп лекарственных препаратов, а также присутствие в генотипах супругов негативных полиморфизмов по ряду групп генов, в частности, фолатного цикла). Серьезной проблемой является предупреждение рождения детей с моногенной патологией в семьях, где супруги являются носителями негативных аллелей.

В настоящее время при использовании программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), одной из актуальных становится проблема диагностики генетической полноценности эмбриона, предшествующей переносу его в полость матки, поскольку этот факт является одним из основополагающих для наступления и течения беременности до завершения ее рождением здорового потомства.

Учитывая вышесказанное, острота проблематики и актуальность темы диссертационной работы Екимова Алексея Николаевича – изучение возможностей преимплантационных генетических технологий в детекции хромосомной и генной патологии эмбрионов человека – очевидна. Диссертационная работа Екимова Алексея Николаевича, направленная на разработку методов преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах ВРТ, является своевременным и актуальным исследованием.

Кроме того, благодаря продуманному алгоритму и примененным методологическим и методическим подходам проведенное диссертантом исследование не только актуально, но и безусловно соответствует современным мировым стандартам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Работа характеризуется комплексным подходом к организации и проведению исследований и имеет высокий уровень методического обеспечения. Все основные положения и выводы, сформулированные в работе, логично обоснованы. Все разделы диссертационной работы взаимосвязаны и выполнены на единой научно-методической основе. Поставленные цель и задачи исследования полностью соответствуют теме диссертации и профилю научной специальности 1.5.7. – Генетика. Использованные методы адекватны поставленным задачам, а объём исследований достаточен для выявления закономерностей. При решении задач, поставленных в диссертации, получены новые научные результаты, полностью обоснованные в ходе глубокого анализа значительного объёма информации. Диссертационная работа имеет хорошую доказательную базу. Выводы логично вытекают из результатов проведенных исследований, хорошо обоснованы и аргументированы, отражают все основные этапы работы и достаточно четко сформулированы.

Достоверность, новизна научных положений, выводов. Рекомендаций

Достоверность и обоснованность выводов диссертации Екимова Алексея Николаевича обеспечивается четкой продуманностью дизайна исследования. Работа отличается тщательностью и корректностью использованной методологии и методик исследования, корректной интерпретацией результатов исследования, проработанностью полученных выводов, полностью отвечающих цели и задачам исследования.

В работе проведено исследование достаточного количества образцов (3691 эмбрион, 448 супружеских пар, 454 ооцит-кумулюсных комплекса) с использованием современных методов исследования и верификации полученных результатов, применены корректные методы статистической обработки.

Научная новизна результатов, полученных в диссертационном исследовании Екимова Алексея Николаевича, определяется следующими положениями.

Проведена оценка возможностей методов сравнительной геномной гибридизация на чипах (aCGH) и высокопроизводительного секвенирования (NGS), применяемых при выполнении преимплантационного генетического скрининга.

Разработана методика проведения фрагментного STR-анализа с использованием различных продуктов полногеномной амплификации для генотипирования эмбрионов. Показана возможность одновременного с генотипированием эмбрионов выполнения преимплантационного генетического тестирования и анеуплоидий, и моногенной патологии без необходимости повторного забора материала для исследования.

Разработан метод гаплотипирования для преимплантационного генетического тестирования на предмет выявления моногенной патологии (ПГТ-М), основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов с использованием микрочипов высокого разрешения Affymetrix CytoScan 750K. Определено, что на результаты SNP-9 гаплотипирования оказывает влияние метод полногеномной амплификации: приоритет MDA по сравнению с WGA-PCR. Показано, что интерпретация результатов SNP-гаплотипирования не требует индивидуальной разработки для каждого случая и является универсальной.

Обнаружено, что анеуплоидии в эмбрионах ассоциированы с повышенным уровнем мтДНК, что может быть обусловлено или клеточным стрессом с потреблением дополнительной энергии, или развитием компенсаторного механизма, вследствие нарушения функционирования митохондрий из-за накопления мутаций в митохондриальном геноме. Показано, что изменение количества мтДНК может влиять на точность сегрегации хромосом.

Выявлено повышение частоты анеуплоидий у эмбрионов при снижении морфологически нормальных форм сперматозоидов, увеличении уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, что свидетельствует о вкладе повреждений структуры ДНК сперматозоидов в генетический материал эмбриона.

Научно-практическая значимость

Результаты диссертационной работы Екимова Алексея Николаевича расширяют, углубляют и систематизируют представления о возможностях преимплантационных генетических технологий в диагностике хромосомной и генной патологии эмбрионов человека. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов формирования генетического дисбаланса у эмбриона, в частности, при изменении количества митохондриальной ДНК и при мужском факторе бесплодия (при снижении морфологически нормальных форм сперматозоидов и увеличении уровня фрагментации ДНК сперматозоидов), показывают возможность определения родительского происхождения анеуплоидии эмбриона, определяют оптимальный подход к тестированию моногенной патологии.

Результаты исследования 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 Российской Федерации, а также внедрены в практическую деятельность Российско-немецкого центра репродукции и клинической эмбриологии ООО "Поколение НЕКСТ".

Структура работы

Диссертационная работа Екимова Алексея Николаевича написана в классическом стиле, хорошим научным и литературным языком. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 17

таблицами и 13 рисунками, содержит 3 приложения. Указатель литературы содержит 107 библиографических источников, в том числе 17 отечественных публикаций.

Обзор литературы логично структурирован. Емко и грамотно даны современные представления о значении преимплантационного генетического тестирования в программах ВРТ, подробно описаны возможности методов преимплантационной диагностики хромосомной и моногенной патологии эмбриона в историческом и сравнительном аспекте с указанием преимуществ и недостатков. Особое внимание уделено вопросу выбора биологического материала, используемого для выполнения ПГТ-А, а также свойствам и уровню мтДНК у эмбриона как возможному маркеру его «качества», то есть способности к имплантации, развитию и в дальнейшем к рождению здорового ребенка. Обзор литературы представлен на 21 странице.

Глава «Материал и методы» включает подробное описание всех методов генетического и математического анализа, использованных в исследовании. Глава представлена на 28 страницах.

Главы, посвященные результатам собственных исследований и их обсуждению, охватывают весь объем выполненной работы. В данных разделах обоснована предпочтительность использования материала биопсии трофэктодермы эмбрионов 5-х суток для проведения ПГТ-А по сравнению с материалом биопсии единичных бластомеров эмбрионов 3-х суток развития; описан первый российский опыт применения преимплантационных генетических технологий с помощью методов aCGH и NGS; подробно проработан и обсужден вопрос мозаицизма эмбрионов; приведены результаты STR-анализа как метода детерминации вклада родителей в генетические аномалии эмбриона, а также результаты SNP-гаплотипирования для преимплантационной диагностики моногенной патологии. Особый научный интерес представляет тот факт, что в рамках настоящей работы было разработано и внедрено в клиническую практику ПГТ-М на основании гаплотипирования ДНК эмбрионов, родителей и больных детей с помощью

SNP. Уникальной особенностью данного подхода явилось одновременное использование MDA для полногеномной амплификации, чипов Affymetrix CytoScan™ 750K и специально разработанного для этой цели программного обеспечения. Приведены и проанализированы результаты молекулярно-генетического исследования выявления дополнительных биомаркеров взаимосвязи с частотой анеуплоидий, особое внимание уделено проблеме мужского фактора в генезе хромосомных аномалий эмбриона.

Глава «Заключение» подытоживает и дает краткую интерпретацию основных результатов диссертационной работы, а также намечает дальнейшие пути продолжения исследований в области преимплантационного генетического тестирования эмбрионов. Выводы, сформулированные в диссертации, в полном объеме раскрывают заявленную в работе цель и позволяют утверждать, что задачи, которые диссертант поставил перед собой, полностью решены.

Апробация работы

Результаты исследования были доложены и обсуждены на 16 всероссийских и международных конференциях.

По материалам научного исследования опубликовано 35 печатных работ, в том числе 4 в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Замечаний и вопросов по диссертационной работе А.Н. Екимова нет.

Заключение

Диссертационная работа А.Н. Екимова «Возможности преимплантационных генетических технологий в детекции хромосомной и генной патологии эмбрионов человека», выполненная под руководством д.б.н. Н.А. Каретниковой, является законченной научно-квалификационной работой, посвященной решению актуальной научно-практической задачи - оптимизации и разработке методов преимплантационного генетического

тестирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий, имеющей важное значение для генетики (1.5.7. Генетика).

Работа выполнена на высоком современном методическом уровне, значима в теоретическом и практическом плане. По объёму, степени достоверности результатов исследования, по новизне полученных данных и применённым методам их обработки и анализа, изложению полученных результатов диссертационная работа А.Н. Екимова полностью соответствует требованиям п. 9 "Положение 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 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., №1168 от 01.10.2018г., №426 от 20.03.2021г.), а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. – генетика.


Официальный оппонент

профессор кафедры акушерства и гинекологии,
медицинской генетики ФГБОУ ВО «Ивановская
государственная медицинская академия»,
доктор медицинских наук, профессор
03.00.15 - Генетика

 И.Н. Фетисова

Подпись И.Н. Фетисовой заверяю
Ученый секретарь ученого совета,
д.м.н., профессор



 Т.Р. Гришина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 153012, г. Иваново, проспект Шереметевский, д.8, 8(493)-230-17-66, ivgma.ru

30.08.2022