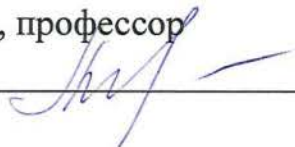


## УТВЕРЖДАЮ

Директор федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Научно-исследовательский институт  
акушерства, гинекологии и  
репродуктологии имени Д.О. Отта»  
член-корреспондент РАН,  
д.м.н., профессор



 И.Ю. Коган

«19» июля 2022 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно - исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта» о научно-практической значимости диссертации Екимова Алексея Николаевича «Возможности преимплантационных генетических технологий в детекции хромосомной и генной патологии эмбрионов человека», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

### Актуальность темы выполненной работы

Исследование возможностей молекулярно-генетических методов преимплантационного генетического тестирования эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий представляет большую ценность для развития научных знаний и методических подходов в области эмбриологии человека, геномной медицины, молекулярной биологии и профилактической медицины.

Известно, что эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) во многом зависит от качества переносимых эмбрионов и их имплантационного потенциала. Современные методы генетической диагностики позволяют составить «генетический паспорт» эмбриона и избежать переноса в полость матки эмбрионов, имеющих генетические нарушения.

На эффективность применения данных подходов влияют многие факторы. Среди них: выбор оптимального биологического материала для тестирования (полярные тельца, бластомеры, образцы трофэктодермы), различные технологические платформы, позволяющие исследование всего хромосомного набора (полнохромосомные методы). В число наиболее популярных методик, используемых в мире, входят сравнительная геномная гибридизация на чипах (aCGH) и высокопроизводительное секвенирование (NGS), однако единого мнения о преимущественном применении этих методов нет.

Серьёзную проблему представляет хромосомный мозаицизм эмбрионов, при котором разные клетки эмбриона могут иметь различный хромосомный состав. Этот феномен играет важнейшее значение не только для понимания процессов развития эмбриона человека, но и для правильной интерпретации получаемых данных, и для адекватного консультирования пациентов по перспективам данного эмбриона в случае его переноса в полость матки.

Отдельный интерес в рамках проведения преимплантационной детекции моногенной патологии представляет совершенствование методов косвенной диагностики, задачами которых являются подтверждение корректности проведённого теста. Перспективно выглядит исследование уровней митохондриальной ДНК в эмбрионах и оценка количества и фрагментации ДНК сперматозоидов с целью прогнозирования репродуктивного потенциала эмбриона.

Таким образом, оптимизация и разработка методов преимплантационного генетического тестирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий является, актуальной целью исследования, а диссертационная работа Екимова А.Н. является востребованной научной работой, представляющей высокую научно-практическую ценность.

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

Представленная работа обладает большой научно-практической новизной. Впервые в России проведен перенос эмбриона в полость матки после преимплантационного генетического тестирования методом аCGH (несмотря на описание данного результата в работе отсутствует ссылка на публикацию или РИД, подтверждающие заявленный приоритет). Впервые в России в качестве преимплантационного генетического скрининга проведена оценка возможностей использования методов NGS и аCGH. Разработан уникальный метод гаплотипирования для ПГТ-М, основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов с использованием микрочипов высокого разрешения Affymetrix CytoScan 750K. Обнаружено, что анеуплоидии в эмбрионах ассоциированы с повышенным уровнем мтДНК. 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 работы**

Полученные результаты работы могут стать основой для разработки целого комплекса профилактических программ и диагностических мер для снижения частоты ранних репродуктивных потерь. В частности, в результате исследования были определены оптимальные материал и методы ПГТ, которые следует применять в программах ВРТ. Установлено, что в схемах подготовки к ВРТ нужно учитывать наличие связи между уровнями мтДНК в трофэктодерме blastocyt и клетках кумулюса и фрагментацией ДНК сперматозоидов с частотой аномальных кариотипов эмбрионов. Возможность обнаружения мозаицизма и происхождения анеуплоидии у эмбриона – от матери или отца, является важными факторами, определяющими тактику в репродуктивных программах - рекомендацию к

подготовке к использованию гамет донора. В рамках настоящей работы разработан оптимальный подход к тестированию моногенной патологии в рамках ПГТ.

### **Обоснованность и достоверность результатов исследования**

Диссертационная работа Екимова А.Н. выполнена на большой репрезентативной выборке - был обследован 3691 эмбрион. Работу отличает четкий, лаконичный и структурированный дизайн исследования, высокий методический уровень выполнения поставленных задач, полученные результаты соответствуют поставленной цели, представленные результаты сравнительного анализа приведены в полном объеме. Применен широкий спектр методов молекулярно-генетического и молекулярно-цитогенетического анализа (секвенирование следующего поколения - NGS, сравнительная геномная гибридизация – aCGH, хромосомный микроматричный анализ, фрагментный анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, SNP -гаплотипирование и др.).

Применены адекватные методы статистического анализа.

Все выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на статистически достоверных результатах. Результаты работы представлены на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в 35-ти научных работах, среди которых 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК, в том числе 20 статей в журналах, индексируемых Scopus и Web of Science.

### **Структура работы**

Диссертационная работа в объеме 131 страницы построена по традиционной схеме и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список условных обозначений и сокращений, список литературы и приложение. Приведено 13 иллюстраций и 17 таблиц, список литературы включает 107 источника, среди них – 17 отечественных и 90 зарубежных, в работе автор

ссылается на более 40 литературных источников, которые были опубликованы в течение последних 5 лет.

Во **«Введении»** автором кратко и емко изложены основные данные, которые обосновывают актуальность проведения диссертационного исследования, позволяющих судить о научном заделе в данном направлении, в соответствии с освещенной проблематикой сформулированы цели и задачи исследования.

**«Обзор литературы»** отражает современное представление о методах преимплантационного генетического тестирования, их особенностях и ограничениях. В частности, приведено обоснование необходимости данного тестирования в программах ВРТ, описание основных хромосомных аномалий и методов их изучений. Подробно описан биоматериал, используемый в данной технологии, показано преимущество использование клеток трофэктодермы. Автор отдельное внимание уделил уровню мтДНК в эмбрионах и его значению в тактике врача-репродуктолога, а также такому сложному явлению, как хромосомный мозаицизм. К замечаниям к данному разделу нужно отнести то, что Автор упустил описание ПГТ моногенных болезней, чему посвящено часть настоящего исследования и не в недостаточной мере сфокусировал свое внимание на описании результатов работ, аналогичных результатам собственных исследований.

**«Материалы и методы»** включают подробное описание задач и соответствующих им материалов и методов исследования (продемонстрировано в табл. 1). Описание методов не перегружено излишне подробной информацией, однако, является вполне достаточным для понимания их сущности с точки зрения обоснованности подбора в соответствии с выполняемыми задачами.

В главе **«Результаты»** представлены результаты сравнительного анализа работы, которые разделены на ряд подглав в соответствии с дизайном исследования, а именно: анализ биологического материала для проведения ПГТ, сравнение преимплантационных генетических технологий с помощью методов аCGH и NGS, изучение особенности мозаицизма эмбрионов, описание STR-анализа как метода детерминации вклада родителей в генетические нарушения эмбриона и как SNP-гаплотипирования для подхода к преимплантационной

диагностики моногенной патологии, описание мтДНК и ее значения в отборе эмбрионов. Среди незначительных замечаний к данной главе следует отнести неудачные формулировки названий самих подглав, которые не отражают сути описанного, являясь скорее выводом изложенного материала. Несмотря на замечание достоверность расчетных данных, подкрепленных иллюстрациями и табличными данными, не вызывает сомнений.

В главе «**Обсуждение результатов исследований**» приведено краткое, но емкое обсуждение данных, опираясь на мировой и отечественный опыт, а также собственные данные.

В «**Заключении**» работы подведены основные итоги исследования.

«**Выводы**» отражают основные результаты диссертационного исследования и полностью соответствуют поставленным задачам.

### **Замечания и вопросы по диссертационной работе**

В целом при анализе работы Екимова А.Н. возникли следующие вопросы:

1. Почему в настоящей работе не использовали метод FISH? В частности, для верификации несовпадающих результатов, полученных методами aCGH и NGS? Для данного метода можно подобрать зонды ко всем хромосомам человека.
2. Графики, представленные на рисунке 4 и 5 (сравнение методики MDA с PicoPLEX), не позволяют оценить эффективность амплификации трофктодермы. Что является параметром, порогом в соотношении сигнал / шум? Сколько экспериментов было проведено для формулирования соответствующего утверждения?
3. Каков был принцип выбора генов-мишеней, ответственных за развитие определенной моногенной патологии при STR анализе?
4. Исходя из вывода №5 была разработана не только методика SNP-гаплотипирования с использованием чипов Cytoscan, амплификации MDA, но и собственное программное обеспечение. Что это было за программное обеспечение и почему его Автор не привел в работе?

Среди замечаний к работе следует отметить следующее:

1. В работе есть определенные опечатки и неточности, в частности, в некоторых местах пропущены ссылки (например, стр. 34, 2 абзац).
2. Описание метода «Определение копийности мтДНК в трофэктодерме» из раздела 3.6 следует перенести в материалы и методы.
3. **В работе в п. 2.3 и п. 2.5 (и в Приложении) отсутствует описание последовательностей праймеров, которые были разработаны и использованы в настоящей работе.**
4. В п. 3.1 не хватает данных (в виде таблицы), статистических расчетов, подтверждающий то, что для проведения ПГТ-А материал биопсии трофэктодермы эмбрионов 5-х суток развития предпочтительнее материала биопсии единичных бластомеров эмбрионов 3-х суток развития.

### Заключение

Диссертация Екимова Алексея Николаевича «Возможности преимплантационных генетических технологий в детекции хромосомной и генной патологии эмбрионов человека», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки), является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, которая содержит решение актуальной задачи – оптимизацию подходов при молекулярно-генетическом и молекулярно-цитогенетическом исследовании эмбриона с целью совершенствования эффективности персонализированного подхода к снижению ранних репродуктивных потерь.

По своей актуальности, научной новизне, практической ценности полученных результатов, методическому уровню и объему проведенных исследований представленная диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-11,13-14 установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями), предъявляемых к кандидатским

диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Отзыв на кандидатскую диссертацию Екимова Алексея Николаевича «Возможности преимплантационных генетических технологий в детекции хромосомной и генной патологии эмбрионов человека» заслушан, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» (протокол № 6 от 19 июля 2022 г.).

Руководитель отдела геномной медицины  
ФГБНУ «НИИ АГиР им Д.О. Отта»  
доктор биологических наук  
(специальность 1.5.7. Генетика)

Глотов Андрей Сергеевич

Подпись д.б.н. Глотова А.С. заверяю:

Ученый секретарь  
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта»  
доктор медицинских наук



Капустин Роман Викторович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»,

199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3,

тел.: +7(812) 679-55-51, факс: +7 (812) 328-23-61,

e-mail: iagmail@ott.ru