

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертаційну роботу **Верлінського Олега Юрійовича**
«РОДИННО-СПЕЦИФІЧНИЙ ДИЗАЙН ПОПЕРЕДЖЕННЯ
МОНОГЕННОЇ ТА ХРОМОСОМНОЇ ПАТОЛОГІЇ ЛЮДИНИ
У ДОІМПЛАНТАЦІЙНИЙ ПЕРІОД»,

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.22 — молекулярна генетика

Актуальність теми дисертаційного дослідження. Актуальність обраної для дисертаційного дослідження теми зумовлюється вкрай неблагополучною демографічною ситуацією в Україні. Свій внесок до цієї статистики вносять безплідні подружні пари, яких в Україні налічується більш, ніж 30%. Сучасним методом лікування таких пацієнтів стали допоміжні репродуктивні технології (ДРТ). Проте актуальним є не тільки забезпечити високу ефективність методів ДРТ, але й гарантувати народження здорової дитини. Дисертаційна робота Верлінського О.Ю. направлена на з'ясування генетичного статусу ембріонів в родинах носіїв моногенних та хромосомних патологій.

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

Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи «Генетичні передумови розвитку та корекції спадкової патології на різних етапах онтогенезу людини та тварин» (№ держреєстрації 0116U005341, 2016–2019 р.р., № держреєстрації 0119U102493, 2019-2022р.р.) ХНУ імені В. Н. Каразіна.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі на підставі проведених досліджень вперше вирішене важливе наукове завдання, яке полягає у визначення генетичних особливостей батьків-носіїв хромосомних і генних мутацій та їхніх ембріонів для оптимізації передімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов (ПГТ-А/СП) та моногенних порушень (ПГТ-М).

Показано, що передімплантаційне генетичне тестування ембріонів доцільно проводити на п'яту добу їх розвитку *in vitro*. При плануванні ПГТ-А/СП доцільно врахувати стать потенційного батька, носія реципрокної транслокації, оскільки в родинях, в яких носієм транслокації був чоловік, здорові діти народжувались в 1,4 рази частіше, ніж в родинях жінок-носіїв транслокацій. Визначено, що аналіз ембріонів методами NGS та FISH для оцінки хромосомного набору дає співставні результати. Встановлена негативна кореляція між віком батьків та кількістю ембріонів з еуплоїдним набором хромосом. Показано, що перенесення ембріонів після HLA-типуювання під час передімплантаційного генетичного тестування генних мутацій та анеуплоїдій дає можливість народження здорового HLA-ідентичного донора для лікування осіб з патологіями, які потребують алогенної трансплантації кісткового мозку. Встановлено, що при ПГТ у родинях з мутаціями *de novo* 86% ембріонів є еуплоїдними.

Практичне значення отриманих результатів дослідження полягає в тому, що автором було розроблено підходи до оптимізації та обґрунтування рекомендацій щодо виконання передімплантаційного генетичного тестування із застосуванням молекулярно-генетичних/цитогенетичних методів аналізу в родинях осіб із реципрокними транслокаціями та моногенною патологією.

Спираючись на дані експериментального дослідження, автором запропоновано підходи до створення алгоритму допомоги родинам з патологіями, які потребують алогенної трансплантації кісткового мозку.

Вагомим є те, що Верлінський О.Ю. має впровадження результатів дисертаційної роботи у практичну діяльність «Медичного центру ПГР», також є перспектива їх впровадження у практику медичних установ, які працюють у галузі ДРТ.

Результати досліджень можуть бути включені до навчальних програм загальних та спеціалізованих курсів у закладах вищої освіти біологічної та медичної галузей.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук робота Верлінського О. Ю. виконана на високому методичному рівні, із застосуванням сучасних молекулярно-генетичних, молекулярно-цитогенетичних, цитогенетичних, морфологічних та культуральних методів дослідження. Достовірність отриманих результатів забезпечило використання різних методів статистичної обробки результатів. Дані, представлені у дисертаційній роботі, є переконливими, а висновки в повній мірі узагальнюють отримані автором результати.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота Верлінського О.Ю. побудована за традиційним зразком. Матеріал викладено на 170 сторінках друкованого тексту, в тому числі 30 сторінок – цитованої літератури. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, розділів результатів власних досліджень і їх обговорення, їх аналізу та узагальнення, висновків, списку цитованої літератури, який складається з 218 джерел. Робота ілюстрована 23 рисунками та 20 таблицями.

У “**Вступі**” автором обґрунтована актуальність роботи, аргументована мета, з якої випливають завдання досліджень, визначена наукова новизна та практична цінність роботи. Важливим є те, що у вступі окремо зазначені етичні аспекти роботи з передімплантаційними ембріонами людини, зроблено посилання на законодавчі акти України та регламентуючі документи ЄС.

В розділі 1 (огляд літератури) розкрито, як змінювалися наукові підходи щодо визначення генетичного статусу ембріонів, наведена інформація про сучасний стан регулювання процедури ПГТ. Описуються основні методичні та методологічні підходи щодо ПГТ-М, ПГТ-СП і ПГТ-А на основі кількісної ПЛР в реальному часі (RT-КПЛР), флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH), повногеномної ампліфікації (WGA), порівняльної

геномної гібридизації (CGH) і мікроматричної порівняльної геномної гібридизації (aCGH) та секвенування наступного покоління (NGS).

В розділі **Матеріали і методи** показано, що дисертантом в більшості самостійно проведено дослідження та проаналізовано дані генетичного аналізу великої кількості біологічних зразків, які були отримані в циклах лікування безпліддя методами ДРТ.

Дослідження проведено методами, які як правило, використовуються при лікуванні пацієнтів ДРТ: генетичні, морфологічні, мікроскопічні, запліднення методом ICSI, біопсія клітин трофектодерми. Ретельно описані генетичні методики, якими опанував здобувач під час виконання дисертаційної роботи: методи молекулярно-генетичного аналізу, методи дослідження каріотипу класичним цитогенетичним методом; FISH-аналіз дослідження анеуплоїдій за визначеними хромосомами та із застосуванням сучасного методу NGS, який дозволяє проаналізувати увесь геном клітин трофектодерми ембріону. Крім того у розділі представлено сучасні підходи при роботі з репродуктивними клітинами та передімплантаційними ембріонами людини: виділення ооцитів, запліднення методом ICSI, культивування ембріонів *in vitro*, хетчинг *Zona pellucida*, біопсія клітин трофектодерми.

Описані методи статистичної обробки результатів, які дозволяють мені, як опоненту робити висновок про достовірність результатів дослідження.

Результати власних досліджень та їх обговорення викладено у трьох розділах з узагальненням та списком опублікованих робіт в кінці кожного розділу.

В розділі 3. Дослідження динаміки розвитку ембріонів з урахуванням морфологічних характеристик зигот автор, аналізуючи розвиток ембріонів із зигот різної категорії якості, робить висновок про важливість цієї оцінки в якості предиктору отримання ембріонів на стадії бластоцисти з високими морфологічними показниками якості.

В розділі **4. Транслокації і преімплантаційне генетичне тестування анеуплоїдій/структурних перебудов** визначено генетичні характеристики носіїв транслокацій, проаналізовані характеристики ембріонів пацієнтів з участю різних хромосом в транслокаціях, визначено вплив статі та віку батьків носіїв транслокацій на характеристики ембріонів. Представлений детальний аналіз результатів досліджень ембріонів з використанням молекулярно-генетичних і молекулярно-цитогенетичних методів аналізу.

Розділ **5** присвячений **моногенним патологіям і ПГТ-М**. Показаннями до ПГТ-М були такі моногенні захворювання: муковісцидоз, гемоглобінопатії, міотонічна дистрофія, синдром ламкої X-хромосоми. Технологічно платформи для досліджень дозволяють проводити тестування всіх матеріалів біопсії, включаючи перше і друге полярні тільця, бластомери і клітини трофктодерми бластоцисти.

У розділі **“Аналіз та узагальнення результатів дослідження”** Верлінський О.Ю. провів узагальнення отриманих результатів власних досліджень та порівняв їх з даними інших дослідників, які представлені у відкритому доступі. Аналіз цього розділу переконав мене про глибокі знання автора у галузі генетичної діагностики передімплантаційних ембріонів людини.

За результатами власних досліджень автором сформульовано 9 висновків, які чіткі, логічні, відображають основні положення дисертації, адекватні сформульованим автором та відповідають меті та завданням дослідження. В роботі також представлено практичні рекомендації щодо впровадження результатів дослідження в практичну діяльність фахівців відповідного профілю. Таким чином, результати проведених досліджень узагальнені, викладені в основних положеннях та висновках дисертаційної роботи, які статистично обґрунтовані, аргументовані та достовірні.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях. Основні положення роботи викладено у 17 наукових працях, з яких 9 статей (4 – опубліковано у наукових фахових виданнях України, 4

включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 1 колективна монографія у співавторстві, та 8 публікацій тез доповідей у матеріалах міжнародних та національних конференцій.

Зауваження, які стосуються оформлення та змісту дисертації та автореферату.

Оформлення дисертації відповідає сучасним вимогам. Принципових зауважень щодо обґрунтування основних положень досліджень, оформлення та змісту дисертаційної роботи немає.

Водночас, слід зауважити, що у дисертаційній роботі зустрічаються русизми, стилістичні помилки, неточні вирази, наприклад: доімплантаційні, преімплантаційні замість передімплантаційні; репродукційні технології – замість репродуктивні технології.

На мою думку порівняння результатів власних досліджень з даними науковців інших лабораторій, які зустрічаються у Розділі 3,4,5 доцільно б було перенести до Розділу 6, у якій саме і має бути представлено обговорення отриманих результатів.

У підписах до рис. 2.2; 2.4; 2.6 та 3.1 зазначено збільшення, проте, вважаю, що краще було б розташувати масштабну лінійку на самій фотографії.

Однак зазначені зауваження суттєво не впливають на загальне позитивне враження від змісту та оформлення дисертації, а зауваження не носять принципового характеру.

В якості дискусії хотілося б обговорити декілька питань:

1. У Розділі 3, аналізуючи морфофункціональні характеристики ембріонів на стадії бластоцисти, Ви робите висновок про доцільність проведення ПГД саме на цій стадії, проте не порівнюєте результати ПГД, отримані при аналізі полярних тіл ооцитів або бластомерів ембріонів на стадії 8-бластомерів. Наскільки такий висновок є коректним?

2. Оскільки життєздатність ембріонів може залежати від порушення експресії генів, розташованих в зонах хромосом, які беруть участь у

транслокації виникає питання чи Вами було відмічено вплив тих чи інших транслокацій на розвиток ембріонів і в яких випадках показник бластуляції може бути чи не бути пре диктором еуплоїдності ембріонів?

3. Загальновідомим є те, що передімплантаційні ембріони людини характеризуються мозаїцизмом. Яку кількість з проаналізованих Вами ембріонів становили мозаїчні форми і чи досліджували Ви частоту їх виникнення у пацієнтів з моногенними хворобами та носіями транслокацій?

Рекомендації щодо використання результатів дослідження в практиці.

Автором вирішена наукова задача – визначено генетичні особливості батьків-носіїв хромосомних і генних мутацій та їхніх ембріонів, що дозволить оптимізувати методи передімплантаційного генетичного тестування анеуплоїдій/структурних перебудов (ПГТ-А/СП) і моногенних порушень (ПГТ-М).

Вважаю, що результати дисертаційної роботи Верлінського О.Ю. які, ґрунтуються на вивченні кореляційних зв'язків між генетичним статусом пацієнтів та їх ембріонів мають бути враховані з рекомендацією проведення каріотипування усіх пацієнтів, яким є необхідним проведення лікування методами ДРТ. При виявленні носіїв хромосомних і генних мутацій – рекомендувати цикл ДРТ з ПГТ-А/СП та ПГТ-М.

Загальний висновок. В цілому кваліфікаційна наукова робота Верлінського О.Ю. є завершеною науковою працею і відповідає паспорту спеціальності 03.00.22 — молекулярна генетика. Зважаючи на актуальність і перспективність тематики дисертаційної роботи, обсяг проведених досліджень, перспективи практичного застосування, наукову новизну отриманих автором результатів, теоретичне і практичне значення, зв'язок із науковими програмами та широке висвітлення результатів у науковій літературі та на міжнародних конференціях та з'їздах вважаю, що дисертаційна робота Верлінського Олега Юрійовича «Родинно-специфічний дизайн попередження моногенної та хромосомної патології людини у

доімплантаційний період» за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика, відповідає вимогам щодо кандидатських дисертацій «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. із змінами, а її автор Верлінський Олег Юрійович заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент

завідувач відділу кріобіології системи репродукції

Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник



М. П. Петрушко

