

В І Д Г У К

офіційного опонента на дисертаційну роботу Будерацької Наталії Олексіївни
**"ПЕРЕДІМПЛАНТАЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ СКРИНІНГ ЕМБРІОНІВ
ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТІВ ЛЮДИНИ ШЛЯХОМ
ВІТРИФІКАЦІЇ"**,

**поданої до спеціалізованої Вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем
кріобіології і кріомедицини НАН України на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія**

Актуальність теми дисертаційного дослідження.

В останні десятиріччя стан репродуктивного здоров'я населення України все більше викликає занепокоєння. Безпліддя (первинне, вторинне), звичне невиношування вагітності, народження в сім'ї дитини з вродженими вадами розвитку – це основні чинники, які знижують рівень здорової репродукції населення. При лікуванні таких захворювань методами допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) важливим є збереження гамет як унікального репродуктивного матеріалу за допомогою використання кріотехнологій.

На сьогодні низькотемпературні банки стають все більш популярними бо вони дають можливість як переносити народження дитини на більш пізній термін за певних важливих обставин, так і лікувати деякі генетичні захворювання (наприклад, мітохондріальні) шляхом використання цитоплазми донорських ооцитів при переносі ядер ооцитів пацієнта. Але безпечне застосування кріотехнологій має цілий ряд проблем. З одного боку його ефективність залежить від морфологічних особливостей клітин –об'єктів кріоконсервування. Показано, наприклад, що обмежувальними факторами для прогнозування виживання після кріоконсервування ооцитів методом вітрифікації є морфологічні характеристики цих клітин, стан цитоплазматичної мембрани, веретена поділу та ін. Проте в науковій літературі відсутня класифікація морфологічних ознак ооцитів, яка б дозволила використовувати їх в якості предикторів кріорезистентності.

З іншого боку порушення зі сторони клітинних органел ооцитів може призвести до порушення імплантації бластоцисти та подальших етапів ембріогенезу. Наслідком цього можуть бути як невдалі спроби ДРТ, так і виникнення хромосомних/геномних мутацій у ембріонів. Без сумніву розвиток сучасної медицини передбачає створення комплексу превентивних, преембріональних заходів профілактики народження генетично хворої дитини як в самостійній вагітності, так при вагітності, отриманої методами ДРТ.

Таким чином, визначення безпечності кріоконсервування ооцитів є необхідним напрямом сучасних досліджень. У зв'язку з цим дисертаційна робота Будерацької Н.О. є актуальною, оскільки вона може мати теоретичне значення в розділі ембріогенезу людини, теоретичну та практичну значимість у розділі кріобіології, практичну – в розділі репродуктивної медицини. Вона націлена на розробку критеріїв оцінки кріорезистентності та еуплоїдності хромосомного набору ооцитів для індивідуалізації та безпечності протоколів кріоконсервування.

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

Дисертаційна робота виконана в рамках відомчих НДР відділу кріобіології систем репродукції ІПКіК НАН України 2.2.6.58 «Вивчення змін репродуктивної функції тварин і людини під впливом кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів» (номер держреєстрації – 0111U001197) та 2.2.6.108 «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (номер держреєстрації – 0116U003498).

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що автором було отримано нові дані щодо морфофункціональних характеристик кріоконсервованих ооцитів людини та запропоновано морфологічну оцінку екстра- та інтрацитоплазматичних структур для прогнозування кріорезистентності ооцитів. Вперше проведено порівняльний аналіз морфологічних та молекулярно-генетичних характеристик ембріонів,

отриманих після запліднення свіжовиділених та вітрифікованих ооцитів людини та доведено відсутність негативного впливу факторів кріоконсервування на хромосомний апарат ембріонів, які розвинулися із вітрифікованих ооцитів. Методом поляризаційної мікроскопії вперше визначено морфологічні характеристики та локалізацію веретена поділу свіжовиділених та кріоконсервованих ооцитів людини. Це дозволило розробити критерії оцінювання кріорезистентності ооцитів. Вперше визначено рівень еуплоїдності ембріонів, отриманих із кріоконсервованих ооцитів. Вперше проведено перенесення першого полярного тіла ооцита реципієнтки до енуклеюваного ооцита донора з метою збереження фертилізаційного потенціалу. При цьому показано, що морфокінетичні параметри розвитку та еуплоїдність ембріонів, утворених після їх запліднення, не відрізняються від відповідних показників для свіжовиділених.

Практичне значення отриманих результатів дослідження полягає в тому, що автором було розроблено класифікацію морфологічних характеристик інтра- та екстрацитоплазматичних структур ооцитів, морфологічних особливостей та локалізації мейотичного веретена для прогнозування ефективності кріоконсервування жіночих гамет. Здобувачем вивчено частоту утворення ембріонів, які розвинулися після запліднення кріоконсервованих ооцитів. Ці результати будуть мати велике теоретичне та практичне значення для фундаментальної кріобіології і для репродуктивної медицини у вирішенні проблеми збереження фертильності пацієнток за допомогою ДРТ.

Розроблений спосіб подвоєння кількості ооцитів пацієнток шляхом перенесення першого полярного тіла ооцита реципієнтки до енуклеюваного кріоконсервованого донорського ооциту, який дозволить зберегти ядерний генотип ооциту пацієнтки та підвищити частоту настання вагітності у пацієнток із дизморфізмом ооцитів.

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

Представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук робота Будерацької Н.О. виконана на високому методичному рівні, із застосуванням сучасних молекулярно-цитогенетичних, молекулярно-генетичних, кріобіологічних, морфологічних та культуральних методів дослідження. Достовірність отриманих результатів забезпечило використання адекватних методів статистичної обробки результатів. Тому дані, які представлені у дисертації цілком переконливі, а висновки в повній мірі узагальнюють отримані результати.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота Будерацької Н.О. побудована за традиційним зразком. Матеріали викладені на 150 сторінках друкованого тексту, в тому числі 23 сторінки – цитованої літератури. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів, результатів власних досліджень, їх узагальнення та обговорення, висновків, списку цитованої літератури, який складається з 191 джерела, з них 33 вітчизняних, 158 зарубіжних. Робота ілюстрована 38 рисунками та 9 таблицями.

У “**Вступі**” автором обґрунтована актуальність роботи, аргументована мета, з якої випливають завдання досліджень, визначена наукова новизна та практична цінність роботи.

В розділі 1 (огляд літератури) здобувачем охарактеризовані морфологічні характеристик ооцитів, які залежать як від внутрішнього стану клітини (роботи геному), так і від зовнішніх факторів (протоколи стимуляції, умови культивування, фактори кріоконсервування та ін.). Не дивлячись на появу сучасного методу кріоконсервування методом вітрифікації, система оцінки морфологічних характеристик ооцитів при прогнозуванні ефективності та безпечності їх кріоконсервування не розроблена. Проте в науковій літературі достатньо інформації стосовно кріорезистентності органел ооцитів. Крім цього, під дією факторів кріоконсервування можливі пошкодження хромосом, ДНК, зміна рівню мРНК, функції білків, профілю експресії генів ооцита, які можуть не виявлятися одразу після розморожування. Ці потенційно

побічні ефекти не обов'язково призводять до загибелі кріоконсервованих клітин, але можуть впливати на подальші характеристики ембріонів. Такі дослідження опосередковано можна проводити на отриманих ембріонах. Проте результати досліджень, наприклад, тільки хромосомного статусу ембріонів, отриманих з кріоконсервованих ооцитів поки що суперечливі. Вкрай важливо зосередити увагу на морфофункціональних характеристиках мейотичного веретена ооцитів перед та після кріоконсервування, оскільки загальновідомо, що порушення саме цієї структури ооциту може спричинити хромосомні аномалії майбутнього ембріону. Наразі класифікація стану мейотичного веретена не розроблена, невідомо, які саме зміни локалізації та структури веретена поділу відбуваються після впливу факторів кріоконсервування.

Незважаючи на те, що кріоконсервування є успішним підходом для довгострокового зберігання клітин, з'являється все більше доказів його потенційно руйнівних ефектів. Тому існує необхідність в дослідженнях змін, які кріоконсервування може завдати як гаметам, так і ембріонам людини.

В розділі 2 (Матеріали та методи дослідження) показано, що дисертантом в більшості самостійно проведено дослідження та проаналізовано дані 1750 донорських яйцеклітин, які були отримані в циклах лікування безпліддя методами ДРТ, із залученням різноманітних методів. Дослідження проведено методами, які як правило, використовуються при лікування пацієнтів ДРТ: морфологічні, мікроскопічні, запліднення методом ICSI, кріоконсервування методом вітрифікації, біопсія клітин трофктодерми. Крім цього, при дослідженні клітин трофктодерми було застосовано молекулярно-цитогенетичний метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) та молекулярно-генетичний — секвенування нового покоління (NGS). Обробка даних здійснювалась статистичними методами. Матеріалу достатньо за об'ємом. В даному розділі представлена детальна його характеристика та описані методи. Методи сучасні, адекватні поставленим завданням, отримані результати не викликають сумнівів.

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

В розділі 3. “Морфофункціональні та молекулярно-генетичні характеристики ембріонів, отриманих із кріоконсервованих ооцитів людини” дисертантом було проаналізовано морфологічні характеристики ембріонів, отриманих з 771 донорських яйцеклітин. Дослідження проводилось в двох групах – ембріони отримані при заплідненні свіжовиділених та кріоконсервованих ооцитів. Було показано, що морфофункціональні характеристики ембріонів, які розвинулися *in vitro* з кріоконсервованих ооцитів, не відрізняються від таких у групі свіжовиділених. Встановлено відсутність негативного впливу кріоконсервування методом вітрифікації на еуплоїдність хромосомного набору ембріонів, отриманих із кріоконсервованих ооцитів. Але, можливо, існує кріоселекція ооцитів із анеуплоїдіями за певними хромосомами. Дисертант відмічає, що кількість ембріонів, які розвивалися до стадії бластоцисти з кріоконсервованих ооцитів порівняно з свіжовиділеними була нижчою, проте кількість клітин з якісними ознаками була значущо вищою.

В розділі 4. “Передімплантаційний генетичний аналіз ембріонів, отриманих із свіжовиділених та кріоконсервованих ооцитів із дизморфізмом екстра- та інтрацитоплазматичних структур” представлено дані щодо частоти виживання, здатності до запліднення та подальшого розвитку *in vitro* свіжовиділених та кріоконсервованих ооцитів із урахуванням вихідних морфологічних особливостей: нормальні морфологічні характеристики, аномалії будови першого полярного тіла (фрагментація, дегенерація, збільшення/зменшення розміру), ооцити з особливостями будови *ZP* (потовщення/потоншення, викривлення), особливостями цитоплазми (вакуолізація, грануляція, наявність ліпофусцинових тілець, агрегація ендоплазматичного ретикулуму) або з множинними морфологічними аномаліями. Автором було встановлено, що встановлено, що частота

виживання кріоконсервованих ооцитів залежить від їх вихідного морфофункціонального стану: наявність вакуолізації цитоплазми та множинні морфологічні аномалії призводять до зниження частоти їх виживання тоді, як кріоконсервування ооцитів із поліморфізмом першого полярного тіла не впливає на частоту виживання яйцеклітин, їх здатності до запліднення та подальший розвиток ембріонів *in vitro*, хоча й збільшує кількість анеуплоїдій у 1,4 рази.

В розділі 5 “Передімплантаційний генетичний аналіз ембріонів, отриманих із свіжовиділених та кріоконсервованих ооцитів із різними вихідними морфологічними характеристиками мейотичного веретена” для відповіді на питання, чи можуть морфофункціональні характеристики мейотичного веретена бути предиктором еуплоїдності ембріонів, дисертантом було проведене молекулярно-цитогенетичне дослідження рівня анеуплоїдії хромосомного апарату ембріонів, отриманих із свіжовиділених і кріоконсервованих ооцитів із різними морфологічними характеристиками мейотичного веретена. Найбільша кількість ембріонів з еуплоїдним набором хромосом було діагностовано у випадку запліднення ооцитів, веретено яких було віднесено до категорії А ($78,9 \pm 8,1$). Крім цього, із збільшенням кута між мейотичним веретеном та першим полярним тілом кількість анеуплоїдних ембріонів зростала ($r=1$, $p<0,005$). Автором розроблено критерії оцінки морфологічних характеристик ооцитів та веретена поділу, які можуть бути використані в якості предикторів кріорезистентності яйцеклітин та еуплоїдності отриманих з них ембріонів

В розділі 6 “Передімплантаційний генетичний аналіз ембріонів, отриманих із кріоконсервованих ооцитів після енуклеації та перенесення в ооплазму першого полярного тіла” представлені дослідження по реконструкції кріоконсервованих ооцитів. Здобувач наголошує, що перенесення першого полярного тіла в цитоплазму кріоконсервованої донорської яйцеклітини дає можливість зберегти ядерний генотип пацієнтки та може бути використаний для реконструкції ооцитів у випадку низького

оваріального резерву, мітохондріальних хвороб або малої кількості ооцитів із нормальними морфологічними характеристиками. Після внесення першого полярного тіла ооцита реципієнтки до енуклеюваного кріоконсервованого ооцита донора клітини зберігали свій фертилізаційний потенціал та морфокінетичні параметри розвитку на рівні свіжовиділених. Встановлено, що кріоконсервування не впливає на здатність реконструйованих ооцитів до запліднення, подальшого розвитку ембріонів *in vitro* та частоту виникнення анеуплоїдій.

У розділі “**Аналіз та узагальнення результатів дослідження**” Наталія Олексіївна провела узагальнення експериментальних результатів у порівнянні 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 5 висновків, які чіткі, логічні, відображають основні положення дисертації, адекватні сформульованим автором меті та завданням дослідження. Дисертантом захищено три Патенти України на корисну модель, які впливають із результатів досліджень та можуть бути використані в репродуктивній медицині з метою підвищення ефективності методів ДРТ 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.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях та автореферату. Автореферат написаний у відповідності до змісту дисертаційної роботи і повністю віддзеркалює її суть. Основні положення роботи якої викладено у 31 науковій праці, з яких 10 статей (7 – опубліковано у наукових фахових виданнях України (з них 3 включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 2 – до закордонного наукового періодичного видання), 1 – до збірника наукових праць, 3 патенти України на корисну

модель та 18 публікацій тез доповідей у матеріалах міжнародних та національних конгресів та конференцій.

Зауваження, які стосуються оформлення та змісту дисертації та автореферату.

Оформлення дисертації та автореферату відповідає сучасним вимогам. 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 суттєво на загальне позитивне враження від змісту та оформлення дисертації.

Дискусійні питання.

1 Проведений аналіз частоти виживання кріоконсервованих методом вітрифікації ооцитів людини дозволив встановити, що $(71,7 \pm 8,1)\%$ ооцитів зберігали свою морфологічну цілісність після відігріву та $(84,0 \pm 8,2)\%$ зберегли свою основну функцію – здатність до запліднення. Скажіть, будь-ласка, чи зустрічались Вам в літературі дані стосовно віддалених наслідки кріоконсервування, що могли б вплинути на якість життя нащадків, особливо в епоху безмежних можливостей генетичного тестування методами нового покоління секвенування?

2. Для проведення передімплантаційного генетичного скринінгу анеуплоїдій Ви проводили біопсію клітин трофектодерми ембріонів на п'яту або шосту добу культивування за умов, що клітини трофектодерми, які вийшли з *ZP* становили не менше 30% по відношенню до всього обсягу бластоцисти, щоб уникнути пошкодження ембріона. Чи завжди ембріолог впевнений, що він відсікає саме таку кількість клітин трофектодерми та чи становить *ZP* саме такий відсоток? Іншими словами, чи може він від – диференціювати фактори негативного впливу на ембріон (кріоконсервування, біопсія чи щось інше)?

3. Відомо, що хромосома 15 належить до групи хромосом, які містять імпринтингові гени. В літературі є відомості про генетичні хвороби імпринтингу, які знайдені і в групі дітей, народжених з використанням ДРТ.

Багаточисельні дослідження матеріалу завмерлих вагітностей першого триместру також показали, що серед знайдених анеуплоїдій ця хромосома посідає не останнє місце. Чи не вважаєте Ви за необхідне в разі проведення молекулярно-цитогенетичного дослідження на ембріонах з кріоконсервованих ооцитів рекомендувати використовувати більш широкий спектр ДНК проб, у тому числі і хромосому 15? Чи, можливо, ефективніше використовувати NGS на 24 хромосоми?

4. Існує думка, що під час кріоконсервування ооцити проходять певний відбір, де гамети з кількісними хромосомними порушеннями початково є менш життєздатними. У мене теж складається таке враження після рецензії Вашої дисертації. Але з іншого боку недавно з'явилися роботи альтернативного плану: природній цикл ЕКЗ, одна яйцеклітина, запліднення, генетичне дослідження на 24 хромосоми в 4 раунди методом FISH клітин трофктодерми на 5-6 добу, імплантація без будь-якого кріоконсервування, вагітність одним плодом. Як Ви ставитесь до цього як фахівець (переваги, ризику)?

5. В Таблиці 3.5 «Результати передімплантаційно-генетичного тестування анеуплоїдій у ембріонів, отриманих *in vitro* із свіжовиділених та кріоконсервованих ооцитів» Ви переконливо показали, що не було виявлено значущої різниці між групами за такими типами хромосомних порушень, як кількість ембріонів з регулярними анеуплоїдіями та порушенням плоідності ($p > 0,05$). Проте кількість мозаїчних ембріонів в групі із кріоконсервованих ооцитів була значущо вищою у порівнянні з контролем (ніж $p < 0,005$). Роботи останніх років завдяки чутливим методам секвенування геному закріпили думку про існування тканинного мозаїцизму за певними хромосомами, який, вірогідно, бере початок ще на ранніх стадіях ембріогенезу. На Вашу думку, чи не може провокуватись такий мозаїцизм використанням кріоконсервованих клітин? Вірогідно, що незначні його рівні, можуть не зменшувати резерв життєздатності ембріонів, які отримані із вітрифікованих ооцитів.

6. Ви стверджуєте, що перше полярне тіло, яке утворюється в процесі мейотичного поділу яйцеклітини, вироджується протягом декількох годин після запліднення, тоді як друге полярне тіло залишається інтактним і зберігається протягом ранній стадії бластоцисти. Скажіть, будь-ласка, чи відомі наразі механізми утворення полярних тілець? Вони є селективно випадковими чи генетично детермінованими? Та чи не буде це мати якісь віддалені наслідки для нащадків, які отримані із реконструйованих ооцитів?

Рекомендації щодо використання результатів дослідження в практиці.

Автором вирішена наукова задача – розроблено класифікацію морфологічних характеристик інтра- та екстрацитоплазматичних структур ооцитів, морфологічних особливостей та локалізації мейотичного веретена для прогнозування ефективності кріоконсервування жіночих гамет. Вивчено частоту еуплоїдій/анеуплоїдій хромосомного набору ембріонів, які розвинулися після запліднення кріоконсервованих ооцитів, що є актуальним, як для фундаментальної кріобіології, так і для репродуктивної медицини у вирішенні проблеми збереження фертильності пацієнток за допомогою ДРТ.

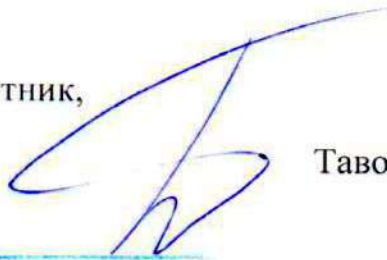
Розроблено спосіб подвоєння кількості ооцитів пацієнток шляхом перенесення першого полярного тіла з ооцита реципієнтки до енуклеюваного кріоконсервованого донорського ооциту, який дозволяє зберегти ядерний генотип ооциту пацієнтки та підвищити частоту настання вагітності у пацієнток із дизморфізмом власних ооцитів.

Висновок про відповідність. В цілому кваліфікаційна наукова робота Будерацької Н.О. є завершеною науковою працею і відповідає паспорту спеціальності 03.00.19 – кріобіологія. 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 вітчизняній та зарубіжній літературі, їх обговорення на міжнародних конференціях та з'їздах вважаю, що дисертаційна робота Будацької Наталії Олексіївни "Передімплантаційно- генетичний скринінг ембріонів після кріоконсервування ооцитів людини шляхом вітрифікації" відповідає вимогам МОН України щодо кандидатських дисертацій, а її автор Будацька Н.О. заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19- кріобіологія.

Старший науковий співробітник,

Кандидат біологічних наук



Тавокіна Любов Василівна

