

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора Федоти Олени Михайлівни на дисертаційну роботу Гапон Ганни Олександрівни «СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПООДИНОКИХ СПЕРМІЇВ ЛЮДИНИ ПІСЛЯ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ», поданої на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – «Біологія», за спеціальністю 091 – «Біологія»

Науковий керівник – Петрушко Марина Павлівна, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу кріобіології системи репродукції ІПКіК НАН України

Актуальність теми дисертаційного дослідження. Протягом останнього десятиріччя в Україні спостерігається зниження демографічних показників на тлі зростання частоти безплідних шлюбів, більше половини з яких пов'язане з впливом чоловічого фактора. Методом лікування важких станів порушення сперматогенезу є допоміжні репродукційні технології, важливою складовою яких є етап кріоконсервування. На сьогодні відсутні ефективні способи кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів у чоловіків з олігоастенотератозооспермією. Розробка методів низькотемпературного консервування дозволила б безпечно зберігати статеві клітини з подальшим їхнім використанням при лікуванні безпліддя методами допоміжних репродукційних технологій. Таким чином, тема дослідження, обрана автором дисертаційної роботи, є своєчасною та актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи відділу кріобіології систем репродукції Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України № 2.2.6.58 «Вивчення змін репродуктивної функції тварин і людини під впливом кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів» (номер державної реєстрації 0111U001197), № 2.2.6.108

«Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (номер державної реєстрації – 0116U003498) та № 2.2.6.128 «Обґрунтування диференційованого підходу до кріоконсервування репродуктивних клітин з урахуванням їх вихідного стану та видоспецифічності» (номер державної реєстрації – 0120U100546).

Наукова новизна одержаних результатів. Автором представлено підходи до кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу. Показано, що показники рухливості та життєздатності сперматозоїдів, кріоконсервованих з високомолекулярним ПВП (м. м. 360000), значуще не відрізняються від таких для нативних клітин. Уперше проаналізовано морфологічні та ультраструктурні характеристики сперматозоїдів після кріоконсервування з ПВП. Визначено частоту фрагментації ДНК, кількість клітин з високим мітохондріальним потенціалом у сперматозоїдах, кріоконсервованих з ПВП. Вивчено показники запліднення ооцитів сперматозоїдами, кріоконсервованими з ПВП та здійснено морфокінетичний аналіз розвитку ембріонів *in vitro*. Таким чином, дисертантом уперше доведено ефективність використання високомолекулярного ПВП для кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів.

Практичне значення отриманих результатів. Автором запропоновано спосіб кріоконсервування сперматозоїдів чоловіків з вадами сперматогенезу з 10% ПВП в якості кріопротектору. Представлений метод дозволяє використовувати сперматозоїди для запліднення ооцитів без видалення кріопротектору. Оцінка шийного відділу сперматозоїдів при світловій мікроскопії дає можливість відбирати для запліднення сперматозоїди з високим мітохондріальним потенціалом, що підвищує частоту запліднення ооцитів та морфокінетичні характеристики ембріонів *in vitro*. Спираючись на дані експериментального дослідження, автором запропоновано використання способу кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів у клінічній практиці.

Ступінь обґрунтованості достовірності наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. У дисертаційній роботі Г.О.Гапон представлено обґрунтування наукових положень на підставі результатів кріобіологічних, морфологічних, генетичних та культуральних методів досліджень. Представлена робота має послідовний дизайн дослідження. Для реалізації мети дисертантом вирішувалися чітко сформульовані завдання, яким відповідають отримані результати, підсумовані у висновках. Дисертантом детально опрацьована література з теми дослідження, підібрано та використано сучасні методи для проведення різних видів аналізу, зібрано великий об'єм первинного матеріалу, проаналізовано отримані результати та представлено дані про впровадження їх у практичну діяльність.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 141 сторінці тексту, матеріали дисертації ілюстровано 6 таблицями та 26 рисунками. Список використаних джерел налічує 223 найменувань, з них 85 - кирилицею, 138 - латиницею. Виклад матеріалу логічно пов'язаний з поставленою метою та завданнями, висновки, в цілому, відповідають поставленим завданням. У дисертації представлені усі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати власних досліджень, узагальнення, висновки.

Повнота огляду та аналізу літератури у напрямі дослідження. В огляді літератури автор всебічно та критично аналізує сучасну літературу, присвячену питанням сучасного стану проблеми кріоконсервування сперматозоїдів людини, у тому числі за наявності вад сперматогенезу, ролі морфофункціональних та ультраструктурних характеристик чоловічих гамет у їх кріорезистентності, ролі батьківського геному у ранньому ембріогенезі. Після кожного розділу аналізу літературних джерел є підсумовуючий висновок, який підводить до розуміння необхідності проведення представленого дослідження.

Якість використаних методів досліджень, отриманих результатів, їх аналізу та обговорення. Дисертантом представлено відомості про об'єкт та

методи дослідження, про використаний великий об'єм первинної інформації, медичної документації, зразків біологічного матеріалу. Методи аналізу - кріобіологічні, морфологічні, мікроскопічні, адекватно підібрані. Автором використано традиційний спектр методів для дослідження у межах обраної тематики. Слід відзначити, що при дослідженні рівня фрагментації ДНК та для визначення кількості клітин з високим рівнем мітохондріального потенціалу автором застосовано метод флуоресцентної мікроскопії з використанням конфокального лазерного скануючого мікроскопа. Статистичний аналіз проведено за допомогою загальноприйнятих методів. Результати дослідження представлено у наочній формі, у вигляді таблиць, рисунків, їх проаналізовано та співставлено с даними світової літератури. В розділі «Вплив різних способів кріоконсервування на життєздатність та рухливість сперматозоїдів при олігоастенотератозооспермії» автором надано результати пошуку способу кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів чоловіків з олігоастенотератозооспермією, обгрунтовано різні підходи із застосуванням як проникних, так і непроникних кріопротекторів. Результатом цього розділу роботи є розробка ефективного методу кріоконсервування, який не вимагає видалення кріопротектору, тому для запліднення сперматозоїди можуть бути використані одразу після відтавання.

В розділі «Морфологічні та ультраструктурні характеристики сперматозоїдів людини, кріоконсервованих методом двоетапного охолодження з ПВП» дисертант представляє результати дослідження з вивчення морфологічного стану сперматозоїдів після кріоконсервування двома різними методами - це двоетапне охолодження з ПВП, як ефективний метод за результатами першого розділу роботи, та загальноживаний – двоетапний метод з гліцирином та свіжовиділені чоловічі статеві клітини, в якості контролю. В цьому розділі автором представлено не тільки морфологічні характеристики, які є добре видимими при світловій мікроскопії, але й аналіз даних разом з результатами електронної мікроскопії, при застосуванні якої патологія виявляється ефективніше.

В розділі «Рівень фрагментації ДНК та функціональної активності мітохондрій сперматозоїдів людини перед та після кріоконсервування», дисертант наводить дані щодо визначення рівня фрагментації ДНК у сперматозоїдах перед та після кріоконсервування різними методами. Відомо, що показники рухливості та морфологічні характеристики сперматозоїдів не можуть в повній мірі відобразити стан їхнього генетичного апарату. Тому автор доводить безпечність застосування непроникних кріопротекторів, на відміну від проникних, за допомогою вказаного методу дослідження.

В розділі «Клінічні та ембріологічні параметри циклів лікування безпліддя методом ICSI з використанням кріоконсервованих сперматозоїдів» дисертантом продемонстровано, що кріоконсервування двоетапним охолодженням з ПВП дозволяє зберегти високий фертилізаційний потенціал сперматозоїдів. Крім того, ембріони, отримані після запліднення такими ооцитами, проходять етап 8-клітинної стадії розвитку, то ж такі ембріони досягають стадії бластоцисти та розвиваються краще, ніж при заплідненні ооцитів сперматозоїдами, які були кріоконсервовані з гліцерином.

Висновки, представлені у дисертації, логічно витікають із проведених досліджень, зроблені автором відповідно до сучасних уявлень, цілком відображають основний зміст роботи і привертають увагу до основних моментів проведеного дослідження.

Отримані дисертантом дані є базою для подальшої роботи з досліджень підвищення ефективності методології роботи зі статевими клітинами від осіб зі порушенням фертильності.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Результати та висновки дисертації можна рекомендувати до широкого впровадження в практику ДРТ, оскільки сперматозоїди після кріоконсервування представленим методом можуть бути використані в програмах ДРТ без додаткової обробки. Відтаяні сперматозоїди можуть бути додані безпосередньо в середовище запліднення або одразу бути відібраними для запліднення. Запропонований автором метод має переваги для

практичного застосування, оскільки навіть при низькій кількості сперматозоїдів у зразку можна успішно виконувати запліднення методом ICSI.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях.

Основні положення роботи представлено у 30 наукових працях. З 11 статей дві опубліковано у закордонних виданнях, які включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, 4 – у наукових фахових виданнях України, з них дві включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, три – у збірнику наукових праць; Результати дисертації було обговорено на міжнародних та національних конгресах та конференціях, що відображено у 18 публікаціях тез доповідей. Автором отримано патент України на корисну модель.

При рецензуванні дисертаційної роботи виникли деякі побажання, запитання та зауваження:

1. До таблиці 6.2. не вказано статистики, чи було проведено аналіз представлених результатів?

2. Чому, на Ваш погляд, після кріоконсервування сперматозоїдів з ПВП зменшується кількість клітин з патологією голівки порівняно із результатами, отриманими після застосування стандартного підходу?

3. Зважаючи на те, що після кріоконсервування сперматозоїдів ПВП не видаляють із суспензії клітин, наскільки безпечно подальше їх застосування для запліднення ооцитів?

4. Які ще методи генетичного аналізу доцільно чи можливо було б застосувати для оцінки ефективності запропонованих Вами підходів?

5. Що наразі відомо відносно генетичних основ щодо життєздатності сперматозоїдів за умов змін середовища їхнього зберігання?

6. Слід зауважити, що у дисертаційній роботі зустрічаються стилістичні помилки, неточні вирази, опечатки.

Але усі зазначені недоліки та питання, які виникли в процесі рецензування, не принципові, не впливають на позитивне враження від роботи та не зменшують її теоретичного та практичного значення.

Висновок. Дисертаційна робота Гапон Ганни Олександрівни «Структурно-функціональний стан поодиноких сперміїв людини після кріоконсервування» є завершеною науково-дослідною роботою, в якій представлено рішення важливої наукової проблеми – ефективного кріоконсервування поодиноких сперматозоїдів людини при олігоастенотератозооспермії. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, новизною, теоретичним значенням та практичною цінністю, глибиною та обсягом проведених досліджень цілком відповідає встановленим вимогам «Про проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 06.03.2019 року №167 та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України від 12.01.2017 року №40, які пред'являються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії, а її автор, Г. О. Гапон, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент

професор кафедри акушерства та гінекології

Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна,

доктор біологічних наук, професор

О. М. Федота

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
Начальник відділу
кадрів

