

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Веропотвеляна Миколи Петровича «Дослідження ролі генетичних чинників в етіології та патогенезі репродуктивних розладів на різних етапах внутрішньоутробного розвитку», представлену на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.15 — генетика

**Актуальність вибраної теми.** Зниження народжуваності населення у більшості країн світу, зокрема в Україні, нині стало актуальною проблемою. У багатьох випадках це пов'язано з порушенням репродуктивної функції у чоловіків і жінок. Мутагенне забруднення довкілля, стресові ситуації зумовлюють генетичні, метаболічні і гормональні розлади, призводять до збільшення репродуктивних втрат. Тому зусилля науковців світу спрямовані на розвиток принципів превентивної (попереджувальної) медицини, спрямованої на урахування генетичних особливостей пацієнта. Особлива увага зосереджена при цьому на впровадженні принципів предиктивної і персоналізованої медицини у репродуктології. Результати досліджень патогенезу порушень репродукції часто суперечливі, що не дозволяє виявити їхні причини і, відповідно, розробити ефективні способи подолання проблем. Окрім того, отримані дані щодо ролі генетичних чинників у невиношуванні вагітності (НВ) часто гетерогенні та неоднозначні. Останнє можна пояснити генетичною варіабельністю популяцій, заснованою на відмінностях поліморфних варіантів генів, однонуклеотидних поліморфізмів (SNP). Тому вивчення особливостей генетичного складу різних популяцій вкрай важливо для розуміння внеску спадкового компонента у формування репродуктивних втрат.

Незважаючи на численні роботи, що досліджують генетичну складову порушення репродукції, багато з них випускають з виду класичні методи медико-генетичного консультування, що призводить до недооцінки внеску спадкових чинників. Останнє можна вважати пріоритетним завданням медицини, оскільки дасть змогу суттєво підвищити ефективність медико-генетичної допомоги при невиношуванні вагітності.

З урахуванням вищесказаного, пріоритетність дисертації Веропотвеляна Миколи Петровича, яка спрямована на вдосконалення прогнозування, ранньої діагностики репродуктивних розладів і порушень ембріогенезу з можливістю їх корегування на основі комплексного дослідження цито- і молекулярно-генетичних чинників у поєднанні з популяційно-епідеміологічними, клінічними, імунологічними та морфологічними показниками, не викликає сумніву.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій.** Наукові положення, висновки і рекомендації логічно випливають із фактичного матеріалу і носять об'єктивний характер, оскільки добре обґрунтовані результатами досліджень. Реалізація поставленої мети вирішена завданнями, які повністю відображають хід і методологію роботи. Висновки ґрунтуються на значній кількості комплексних обстежень, проведених дисертантом (1781 подружніх пар з невиношуванням вагітності; ультразвукового дослідження 180584 вагітних жінок у I та II триместрах вагітності). **Дисертант особисто** виконував ультразвукові, інвазивні дослідження та проводив забір матеріалу для пренатальних цитогенетичних та молекулярно-генетичних досліджень (8968 зразків біоптатів ворсин хоріону/плаценти, амніотичної рідини). Здійснено каріотипування 3380 зразків продуктів концепції завмерлих вагітностей та медичних індукованих абортів I триместру вагітності. За період 2009-2016 рр. було сформовано та використано банк ДНК близько трьох тисяч жителів з шести областей Центрального та Південно-Східного регіону України. Статистична обробка даних проведена на сучасному рівні та адекватна до поставлених задач. Важливим є те, що дослідження проводились відповідно до завдань Державної програми «Репродуктивне здоров'я нації» на період до 2015 року. Дисертаційна робота є фрагментом НДР «Молекулярно-генетичні фактори тромбоутворення у хворих на Rh-негативні мієлопроліферативні неоплазії, які постраждали внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС» (термін виконання 2014-2016 рр.).

**Достовірність і новизна отриманих результатів.** Уперше в науковій роботі Веропотвеляна М. П. поєднано два напрямки: 1) фундаментальний —

популяційно-генетичне дослідження цитогенетичних особливостей, генетичного поліморфізму генів ферментів фолатного циклу, мутантних варіантів генів системи гемостазу, окремих алелів *HLA II* класу населення 6 областей Центрального і Південно-Східного регіону України; 2) прогностичний — на основі широкомасштабних цитогенетичних, молекулярно-генетичних, клініко-інструментальних досліджень доведено співвідносний внесок цих чинників в етіологію завмерлих вагітностей на різних термінах.

Вперше описано особливості частоти і спектру хромосомних аномалій на преємбріональному та ембріональному етапах розвитку серед завмерлих вагітностей, індукованих абортів I триместру та пренатально діагностованих плодів з анеуплоїдіями. Доповнено відомості щодо інформативності та частоти зустрічальності ультразвукових ознак (аномалій розвитку та ехо-маркерів), які виявляються при різних типах хромосомних аномалій плоду, та оцінено їх діагностичну значущість для пренатальної діагностики вроджених вад розвитку хромосомної етіології. Встановлено сезонні коливання анеуплоїдних та еуплоїдних запліднень. Вперше показано асоціацію поліморфного алелю 677T гену *MTHFR* зі значним підвищенням ризику анембріонії при еуплоїдній вагітності. Показано, що мутація G455A *FGB* суттєво підвищує ризик відшарування плаценти в II, III триместрах, антенатальної загибелі плода та мертвонародження. Дисертант проаналізував особливості гомології алелей комплексу гістосумісності у подружніх пар зі звичним невиношуванням залежно від каріотипу попередніх завмерлих вагітностей. Доповнено вчення про співвідносну роль цито- і молекулярно-генетичних, окремих імунологічних чинників в етіопатогенезі репродуктивних втрат.

На підставі узагальнення отриманих результатів запропоновано шляхи підвищення ефективності генетичної діагностики при розладах репродуктивної функції, прогнозування рекурентного ризику повторних репродуктивних втрат, що має практичне значення для удосконалення їх преконцепційної профілактики та корекції певних патологічних станів.

Визначена в роботі поширеність та спектр всіх видів хромосомної патології (ХП) на різних етапах внутрішньоутробного розвитку дозволяє оцінювати ефективність та доцільність використання новітніх селективних методів дослідження каріотипу на різних термінах вагітності. Використання запропонованих автором критеріїв прогнозування ускладнень виношування вагітності, а також формування вродженої та хромосомної патології покращує результати медико-генетичного консультування подружніх пар з НВ.

**Якість використаних для дослідження методів, репрезентативність отриманих результатів.** Дисертантом використані сучасні і адекватні методи дослідження: клініко-генетичні, цитогенетичні, молекулярно-генетичні, ультразвукові та ендоскопічні дослідження, інструментальна ревізія порожнини матки, інвазивні методи пренатальних досліджень (амніоцентез, плацентоцентез, біопсія ворсин хоріону), патологоанатомічні та інші. Позитивно оцінюю внесок дисертанта у покращення генетичних методик, зокрема модифікований ним метод каріотипування плоду при спонтанних абортах та мертвонародженні.

Достовірність отриманих результатів підтверджено використанням відповідного статистичного аналізу. Методологічно правильно застосовано використання критерію  $\chi^2$  для перевірки однорідності досліджуваних груп. В цілому представлена дисертація є результатом багаторічної праці, виконаної самостійно Веропотвеляном М. П.

**Рекомендації з подальшого використання результатів праці та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень.** Науково-теоретичне обґрунтування цитогенетичних та молекулярно-генетичних чинників в асоціації з порушеннями репродуктивної функції може бути основою для створення клінічного протоколу, що суттєво підвищить ефективність медичної допомоги родинам з невиношуванням вагітності. Результати дослідження можуть бути впроваджені також в навчальний процес при вивченні медичної генетики, акушерства та гінекології.

**Повнота використання в роботі нової наукової літератури в даній галузі.** Список використаних літературних джерел (447 посилань, з них 47 кирилицею і 198 латиною) переважно включає видання останніх років за кордоном і дозволяє об'єктивно охарактеризувати стан розробки проблеми у світі. Водночас зустрічаються окремі видання 70-90-х років.

**Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації та автореферату.** Дисертація Веропотвеляна Миколи Петровича оформлена відповідно до вимог ДАК України. Робота викладена на 340 сторінках комп'ютерного друку, складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», чотирьох розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів дослідження, 9 висновків, практичних рекомендацій, п'яти додатків, переліку 447 використаних джерел літератури. Текст дисертації ілюстрований 55 таблицями та 138 рисунками. Необхідно зазначити логічну послідовність викладу матеріалу, вміння дисертанта пояснити необхідність проведених досліджень.

**У вступі** дисертант обґрунтовує актуальність теми дисертації, її зв'язок з науковими програмами, мету і задачі дослідження, наукову новизну і практичну значущість роботи, перераховує наукові форуми, на яких були представлені матеріали дисертації, вказує кількість власних публікацій.

**Розділ I «Огляд літератури»** викладений на 41 сторінці, де автор робить глибокий аналіз літературних джерел, що засвідчує його обізнаність із сучасними науковими публікаціями за темою дисертації. У п'яти підрозділах детально описано частоту та спектр хромосомних аномалій у структурі невиношування вагітності, сучасний стан пренатальної діагностики хромосомної патології. Варто зазначити, що дисертант детально описує значення обміну фолатів при різних захворюваннях, що можна було б подати коротше, натомість більше зосередитися на опису впливу змін фолатного циклу на порушення запліднення та виношування вагітності. Проаналізовано роль поліморфізму генів системи гемостазу в невиношуванні вагітності. Серед імуногенетичних причин раннього переривання вагітності розглянуто систему

генів та антигенів *HLA* — комплексу. Можливо, не варто було описувати загальну характеристику всіх антигенів *HLA*, оскільки вивчалися окремі з них.

**У розділі II** «Матеріали і методи дослідження», який складається з двох підрозділів, містить 4 рисунки і 17 таблиць, дуже детально описані матеріали дослідження і використані методи. Можливо, слід було б розділити підрозділ 2 на 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4 і 2.2.5 залежно від використаних методів. На мою думку, не варто детально описувати послідовність статистичної обробки отриманих даних (стор. 80-94).

**Розділ III** «Аналіз поширеності і спектру хромосомних аномалій, виявлених на різних етапах внутрішньоутробного розвитку» — найбільший, викладений на 91 сторінці, містить 13 таблиць і 36 рисунків. Написаний розділ ґрунтовно, містить 7 підрозділів, кожний з яких закінчується коротким обговоренням. Перед описом поширеності і спектру хромосомних аномалій в групі завмерлих вагітностей автор вдало підтверджує достовірність отриманих даних якісними мікрофотографіями гістологічних препаратів абортивного матеріалу. Навіть застосування класичного методу забарвлення гематоксиліном-еозином дозволяє підтвердити наявність вагітності, що не розвивається. Щодо підписів до рисунків 3.1 — 3.10 є побажання дотримуватися рекомендацій морфологів і називати зображення мікрофотографіями.

Встановлено загальну популяційну частоту хромосомної патології на різних етапах внутрішньоутробного розвитку (з урахуванням завмерлих вагітностей, самовільних викиднів та пренатально діагностованих випадків), яка склала 1/441. Дані про найбільш поширені хромосомні синдроми (у порядку зменшення частоти — трисомії 21, 18, 13 хромосом) узгоджуються з показниками в інших популяціях. Зустрічальність хромосомної патології залежала від гестаційного терміну і була максимальною у першому триместрі — 1/9, у тому числі — половина з них у ранніх репродуктивних втратах. Дуже детально описано різні варіанти хромосомних аномалій. Ймовірно, підрозділи 3.4 і 3.5, які викладені відповідно на 4 і 5 сторінках, можна було об'єднати.

**Розділ IV** «Аналіз інформативності та частоти зустрічальності вроджених вад розвитку та ультразвукових маркерів, що асоціюють з поширеною хромосомною патологією» викладений на 94 сторінках, містить 1 таблицю, (розділену на 1a і 1б) та 70 рисунків. Необхідно відзначити якісні ілюстрації, які вдало підібрані дисертантом для підтвердження необхідності допологових ультразвукових обстежень та інвазивних досліджень для пренатальної діагностики хромосомної патології, ґрунтовно оцінено їх інформативність.

**Розділ V** «Аналіз факторів, що викликають еуплоїдні та анеуплоїдні репродуктивні втрати» ілюстрований 16 рисунками і 4 таблицями, включає 3 підрозділи, які розкривають питання статевого співвідношення у плодів при ранніх репродуктивних втратах, прогнозування хромосомної патології у потомства залежно від віку матері і кількості попередніх втрат вагітності та впливу сезонності на ранні репродуктивні втрати, частоту хромосомної патології. Доведено, що ризик мати завмерлу вагітність з анеуплоїдією підвищений у 5,6 рази для жінок після 40 років порівняно з жінками віком до 40 років, хоча ця тенденція не відрізняється від загальної вікової залежності ХП. Той факт, що частота хромосомної патології у ембріонів зменшується при збільшенні числа самовільних абортів незалежно від віку матері, дисертант пояснює тим, що підвищення частоти ХП з віком матері не є основним етіологічним чинником репродуктивних розладів у жінок зі звичним (НВ). Можливо, таке явище пояснюється елімінацією яйцеклітин з ХП або молекулярними змінами ДНК чи епігеномними чинниками.

З цих позицій логічним продовженням роботи є **розділ VI** «Вивчення ролі молекулярно-генетичних факторів у генезі репродуктивних втрат», який включає 3 підрозділи. Важливим є те, що дисертант проводить окремо аналіз алельного поліморфізму генів MTHFR C677T та MTR A2756G у жінок із ранніми еуплоїдними та анеуплоїдними репродуктивними втратами.

Вважаю, що доведений дисертантом факт найбільшої частоти генотипу 677TT у жінок з анембріоніями за нормального каріотипу, на противагу до такого у жінок при анембріонії з ХП є тим чинником, що зумовлює

репродуктивні розлади. Таке ж пояснення можливе щодо формування дефектів нервової трубки у плода за відсутності ХП.

Закономірними були отримані дані про роль мутацій генів системи гемостазу при порушеннях репродуктивної функції: через ризик відшарування плаценти в кінці II та III триместрів за наявності у жінки генотипу 455AA гену *FGB*; генотипів 20210GA *FII* та 1691GA *FV* в етіології репродуктивних втрат на всіх етапах вагітності.

Перспективним продовженням роботи може бути дослідження параметрів системи HLA II класу (DQA1 0201, DQB1 0201, DQA1 0201/ DQB1 0201) у подружніх пар зі звичним НВ. Потребує подальшого уточнення результат про підвищений рівень ХП у плода серед пар із низьким рівнем гомологічності окремих алелів.

**Відповідність автореферату змісту дисертації та повнота опублікування результатів досліджень по темі.** Детальне вивчення змісту автореферату та дисертації показало їх ідентичність, хоча є поодинокі розбіжності в послідовності викладу матеріалу. В цілому автореферат повністю відповідає тексту дисертації. Основні положення роботи М. П. Веропотвеляна повністю викладені у 83 наукових працях, серед яких 30 статей у вітчизняних періодичних виданнях; 13 – у міжнародних виданнях; 1 патент на корисну модель. Результати досліджень достатньо часто апробувався на вітчизняних та міжнародних наукових форумах, що засвідчують тези 40 доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

**Зауваження та побажання до дисертації щодо її змісту і оформлення.** Оцінюючи в цілому дисертаційну роботу позитивно, слід відмітити окремі зауваження і побажання.

У тексті дисертації та автореферату мають місце декілька помилок, що допущені при друкуванні («міліон», «біла пляма» в репродуктології); окремі невдалі вислови: «Нами проведено...», «Нами встановлено...», «Отримані нами дані...», «В наших дослідженнях...» Оскільки дисертаційна робота є особистою працею здобувача, їх слід уникати.



Деякі літературні джерела застарілі, в окремих місцях огляду літератури наводиться інформація, що в подальшому не розглядається у розділах власних досліджень. Зокрема, описується (роль мелатоніну, опис всіх класів HLA).

Оскільки в огляді літератури вказуєте на можливу участь мелатоніну у формуванні репродуктивних втрат, що переконливо доведено іншими авторами (Chung P. et al., 2005), бажано в обговоренні до розділу, окрім значення зниження гормонального рівня у жінок, недостатньої кількості вітамінів і підвищення частоти вірусних захворювань у зимовий період, звернути на даний факт увагу.

У морфології прийнято у підпису до рисунка подавати методику забарвлення (рис. 3.18, 3.23, 3.30-3.34).

Щодо оформлення деяких таблиць є побажання дотримуватися однакового розміру шрифту, вказівки на достовірність результатів, уникати скорочень. Дискусійним залишається питання необхідності наведення таблиці 5.7 при обговоренні власних даних у підрозділі 5.2.

Вказані зауваження не носять принципового характеру і не зменшують наукової цінності дисертації. Веропотвелян М. П. продемонстрував глибоку обізнаність у проблемі, високу кваліфікацію науковця та лікаря-генетика. Робота сприятиме розвитку якісно нового рівня надання медичної допомоги.

При знайомстві з дисертацією виникли окремі **запитання**, які необхідні для узгодження певних методичних моментів:

1. Оскільки зустрічальність хромосомної патології залежала від гестаційного терміну і була максимальною у першому триместрі, чи пов'язане таке явище з проявом природного добору у пренатальному періоді онтогенезу?

2. З якою метою у другому розділі детально описуєте послідовність статистичної обробки отриманих даних, якщо це можна подати в додатках?

3. Чи можна пов'язати збільшення хромосомних патологій і формування репродуктивних втрат через зниження продукції мелатоніну, оскільки останній через окиснювальний стрес веде до пошкодження і вкорочення теломерів,

зумовлює мутації в генах циркадного ритму Clock/Clock (основних чинників передчасних порушень репродуктивної функції)?

4. Якщо наявність у жінки генотипу 677TT є чинником високого ризику анембріонії, дефектів нервової трубки у плода, чи варто таким пацієнткам проводити ЕКЗ?

**Загальна оцінка роботи і висновок.** Дисертаційна робота Веропотвеляна Миколи Петровича «Дослідження ролі генетичних чинників в етіології та патогенезі репродуктивних розладів на різних етапах внутрішньоутробного розвитку» є завершеною науковою працею, яка вирішує науково-практичні проблемні питання щодо удосконалення медико-генетичної допомоги родинам із невиношуванням вагітності. Встановлені генетичні особливості подружніх пар та жінок з обтяженим репродуктивним анамнезом дозволить знизити частоту втрат вагітності, а також вродженої та хромосомної патології. З урахуванням актуальності та обсягу проведених досліджень, наукової новизни отриманих результатів, обґрунтованості висновків, перспектив наукового та практичного застосування, вважаю, що дисертаційна робота Веропотвеляна М. П. відповідає вимогам постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567 «Порядок присудження наукових ступенів», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 03.00.15 — генетика.

**Офіційний опонент,**

доктор медичних наук, професор,  
завідувачка кафедри медичної біології і  
медичної генетики ДВНЗ «Івано-Франківський  
національний медичний університет»

*Л. С. Ковальчук* Л. С. Ковальчук

09.06.2017

