

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации А. В. Тихонова «Хромосомная, клеточная и тканевая специфичность гидроксиметилирования ДНК в проэмбриональный и эмбриональный периоды развития человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация посвящена анализу молекулярных механизмов эпигенетической регуляции в проэмбриональном и эмбриональном периодах онтогенеза человека, теме актуальной и недостаточно разработанной как в мире так и в России. Развитие человека и других представителей многоклеточных организмов контролируется как генетической программой, записанной на ДНК в виде генетического кода, так и эпигенетической программой, включающей в себя модификацию общей активности генома. Особенно значимой является эпигенетическая регуляция онтогенеза. В онтогенезе человека и млекопитающих дважды, в гаметогенезе и в раннем эмбриогенезе, происходит т. н. эпигенетическое перепрограммирование генома, в результате которого изменяется паттерн экспрессии генов. Основной эпигенетической модификацией генома является метилирование ДНК, в результате которого метильная группа присоединяется к цитозину, образуя метилцитозин (5mC). Деметилирование ДНК осуществляется при помощи окисления 5mC и образования 5-гидроксиметилцитозина (5hmC), 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозил. Как метилирование так и деметилирование ДНК несут сигнальные функции, регулируя генетическую активность и контролируя, тем самым, биологические процессы. 5hmC является как маркером деметилирования так и стабильной модификацией цитозина с собственными функциями. Новизна работы заключается в единовременном, системном анализе участия эпигеномных изменений структуры ДНК хромосом в регуляции главных событий онтогенеза таких как гаметогенез, оплодотворение, образование бластоцисты и постимплантационное развитие.

Объекты, цели и задачи исследования автор четко сформулировал. Согласно автору «целью работы стало изучение поэтапного изменения характера гидроксиметилирования ДНК в гаметогенезе, доимплантационного и постимплантационного периодов эмбриогенеза человека». Поскольку успех выявления факта деметилирования ДНК зависит от обязательного предшествующего метилирования (образования 5mC), регистрация образования 5hmC на хромосомах выполнялась автором параллельно с регистрацией 5mC как показателя метилирования хромосомной ДНК. Такая схема работы позволило автору сделать надежные и четкие выводы об особенностях динамики метилирования и деметилирования отцовских и материнских хромосом в зиготе, об изменениях долей ассиметричных хромосом при дроблении и в постимплантационном периоде онтогенеза. Необходимо отметить высокий методический уровень на всех этапах исследования. Приоритетные результаты были получены при сочетанном использовании

современных методических подходах, некоторые из которых были модернизированы. Обращает на себя внимание большое количество наблюдений в каждом из экспериментов, позволяющие применять для оценки достоверности современные статистические методы. Автором были получены приоритетные результаты для эмбриогенеза человека. В зиготе отцовские хромосомы характеризовались более интенсивной люминисценцией при окраске на 5hmC чем при окраске на 5mC, тогда как материнские хромосомы интенсивнее окрашивались при окраске на 5mC. При этом отцовские и материнские хромосомы имеют собственный характер распределения 5mC и 5hmC по длине хромосом. После оплодотворения в ряду доимплантационных стадий развития максимальные доли хромосом с асимметричным сигналом на 5mC и 5hmC приходилась на стадии 3-5 клеток и колебались в пределах от 33.4% до 76.4%, что свидетельствует о выраженном метилировании генома в этот период. В бластоцисте их доли уменьшались до 6.5-6.6%, что свидетельствует о значительном деметилировании хромосом на этой стадии развития. В мейотических хромосомах яйцеклеток сигналы 5mC и 5hmC были обнаружены на всех плечах проанализированных хромосом. Они не были выявлены в центромерных и околоцентромерных участках хромосом. Во всех сперматозоидах человека были выявлены сигналы 5mC, частота сигналов 5hmC была незначительной. У бесплодных пар доля 5hmC положительных сперматозоидов варьировала от 0.12% до 21.24%. При использовании метода TUNEL авторы подтвердили предположение, что высокая доля 5hmC (+) ядер клеток указывает на повреждение ДНК сперматозоидов. В диплоидных сперматогониях Ad доля 5hmC (+) ядер составила $40.8 \pm 5.9\%$, в ядрах сперматид – $1.18 \pm 0.51\%$. В метафазных хромосомах постимплантационного периода развития сигнал 5mC локализуется в R-сегментах и гетерохроматиновых блоках хромосом 1, 9, 16 и Y. Распределение сигналов 5hmC характеризуется межхромосомной, межклеточной и межтканевой вариабильностью.

Можно согласиться с автором, что в работе описаны глобальные изменения эпигенома человека, имеющие место при эмбриогенезе. Автор также представил данные, которые можно использовать для внедрения в практическую медицину. Работа является законченным исследованием и отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением № 842 Правительства РФ от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 года №с335, № 748 от 02.08.2016 г.) предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Тихонов А.В., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности : 03.02.07 –генетика.

Рецензент: Доктор биологических наук, (специальность: клеточная биология, 03.03.04) профессор, ведущий научный сотрудник Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки Института цитологии РАН

адрес: Тихорецкой ул., 4, Санкт-Петербург, 191064

тел: +7 921-643-64-58

e-mail: v.mikhailov@incras.ru



Михайлов В.М.

Михайлов
Вячеслав Михайлович

руки

19.06.2018
Генеральней