

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА НА  
ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ ТИХОНОВА А.В.**

**«ХРОМОСОМНАЯ, КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ  
ГИДРОКСИМЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В ПРОЭМБРИОНАЛЬНЫЙ И  
ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ ПЕРИОДЫ РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА»,**

**представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 03.02.07 – генетика**

Диссертационное исследование А.В. Тихонова посвящено цитогенетическому анализу метилирования и деметилирования ДНК в процессах гаметогенеза и эмбриогенеза человека. Актуальность работы не подлежит сомнению, так как процессы метилирования/деметилирования ДНК представляют собой один из ключевых эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов. Очевидно, что в ходе формирования высокоспециализированных половых клеток, в процессах образования тотипотентной зиготы и ее дробления, а также на более поздних стадиях эмбриогенеза, характеризующихся начальными этапами дифференцировки клеток эмбриона, эпигенетические механизмы регуляции генной активности играют особую роль, во многом определяя успешность процесса репродукции в целом. Именно в гаметогенезе и раннем эмбриогенезе происходит репрограммирование эпигенома, поэтому детальный анализ паттерна метилирования и гидроксиметилирования ДНК в эти периоды позволит существенно расширить наши представления о базовых механизмах реализации программы индивидуального развития. Следует также подчеркнуть, что в центре внимания исследования А.В. Тихонова находится 5-гидроксиметилцитозин, который, как было показано относительно недавно, является не только маркером процесса активного деметилирования, но и стабильной модификацией цитозина, имеющей собственные эпигенетические функции.

В ходе выполнения диссертационного исследования А.В. Тихоновым получен значительный объем новых данных, большая часть которых имеет не только теоретическую, но и высокую практическую значимость. Впервые описан характер гидроксиметилирования ДНК в половых клетках на разных стадиях сперматогенеза, в ооцитах, в пронуклеусах зиготы, в ядрах бластомеров дробящихся эмбрионах, а также в ядрах клеток некоторых тканей постимплантационных эмбрионов человека. Автором впервые показано отсутствие преимущества паттерна гидроксиметилирования

ооцитов и сперматозоидов и женского и мужского пронуклеусов зиготы, то есть формирование паттерна гидроксиметилирования пронуклеусов *de novo*. Впервые продемонстрирован сегментоспецифичный характер распределения 5-гидроксиметилцитозина в метафазных хромосомах зигот человека. Впервые проведен сравнительный анализ гидроксиметилирования ДНК в тканях постимплантационного эмбриона и внезародышевых тканях. Особо хочется подчеркнуть, приоритетные данные о корреляции между ключевыми параметрами спермограммы и характером гидроксиметилирования сперматозоидов в эякуляте, что может послужить базой для разработки в дальнейшем новых критериев для оценки фертильности.

Диссертационная работа А.В. Тихонова имеет стандартную структуру и представлена на 129 страницах машинописного текста, содержит 25 рисунков и 4 таблицы, одна из которых вынесена в приложение. Список литературы включает 291 источник, из них 273 – на английском языке. Относительно структуры работы возникает небольшой технический вопрос: насколько было необходимо выносить таблицу (занимающую всего 1 страницу и имеющую порядковый номер «4») в приложение?

В разделе «Введение» (6 с.) автор убедительно обосновывает актуальность и новизну своего исследования, характеризует его теоретическую и практическую значимость, формулирует цели и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. Кроме того «Введение» содержит краткую характеристику методологии и методов исследования, а также информацию об апробации результатов и публикациях по теме работы. В целом, «Введение» полностью выполняет все традиционные функции этого раздела, каких-либо существенных вопросов или замечаний после его прочтения не возникает. Единственно, что обращает внимание, это несоответствие числа статей по теме диссертации (с. 14). В подразделе «Степень достоверности и апробация результатов» автор пишет о том, что результаты опубликованы в виде 8 научных статей, а несколько ниже, в подразделе «Публикации», говорится о 7 статьях. Кроме того, не очень уместной кажется фраза: «Для интерпретации результатов привлечено достаточное количество данных литературы. Сформулированные в работе выводы логично вытекают из анализа и обобщения результатов исследования и поэтому не вызывают возражений» (с. 14). Как можно заключить после прочтения работы, все это полностью соответствует истине, но, по-видимому, сам автор все же не должен давать оценку своей собственной работе.

Глава «Обзор литературы» (35 с.) состоит из 10 параграфов и по своему содержанию может быть разделена на две части. В первой части (§§ 1.1.—

1.6) рассматриваются основные аспекты процессов метилирования ДНК, во второй части (§§ 1.7—1.10) автор кратко характеризует процессы сперматогенеза, оогенеза, доимплантационного развития эмбрионов человека, а также развитие хориона и органов дыхательной системы в постимплантационном эмбриогенезе человека.

Особенно хочется отметить высокий уровень первой части обзора литературы (§§ 1.1.—1.5), в которой рассматриваются механизмы метилирования и деметилирования ДНК, в том числе роль белков группы ТЕТ. Можно заключить, что автор свободно ориентируется в литературе, посвященной данным вопросам, благодаря чему может излагать весьма сложные вопросы доступно и интересно.

Каких-либо замечаний к этой части обзора литературы не возникает, и хотелось бы только задать только один небольшой уточняющий вопрос. На с. 19 автор описывает белки ТЕТ1, ТЕТ2 и ТЕТ3, которые участвуют в превращении 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин. Здесь же он отмечает, что в структуре белков семейства ТЕТ в том числе присутствует консервативный домен СХХС, обладающий сильным сродством к кластерам неметилированных CpG-динуклеотидов. Возникает вопрос: какие функции могут выполнять ТЕТ белки благодаря возможным связям с неметилированными динуклеотидами?

В § 1.6. автор рассматривает влияние внешних факторов на изменения характера метилирования и гидроксиметилирования ДНК. Очень позитивное впечатление производит последняя часть параграфа о влиянии внешних факторов на содержание в геноме млекопитающих 5-гидроксиметилцитозина. К сожалению, остальной материал параграфа имеет менее цельный характер, автор рассматривает эффекты, вызываемые теми или иными факторами, то на генно-молекулярном уровне, то на организменном уровне. Кроме того, в тексте в том числе приводится информация о влиянии негативных факторов на содержание тех или иных посттрансляционных модификаций гистонов (с. 28, 29). В связи с этим хотелось бы уточнить, что автор понимает под процессом метилирования ДНК — только присоединение метильного остатка к цитозину или также метилирование гистонов?

Вторая часть обзора литературы (§§ 1.7—1.10) по стилю написания несколько отличается от первой части. Это вызвано объективными предпосылками, так как автор стремился в весьма сжатом объеме дать общее представление о таких сложных процессах как гаметогенез и эмбриогенез. Возможно, автору следовало выбрать для рассмотрения только отдельные аспекты этих процессов, наиболее тесно связанные с целью

диссертационного исследования, однако это исключительно субъективное мнение оппонента, не влияющее на общую высокую оценку обзора литературы.

В главе «Материал и методы» (11 с.) автор дает очень подробную характеристику использованного материала и детально описывает применявшиеся им методики. После прочтения данной главы не возникает никаких сомнений в объеме проведенной автором работы. Несомненным плюсом является применение различных иммунофлуоресцентных окрашиваний на одних и тех же препаратах (как последовательно, так и одновременно), что позволило автору получить целостную характеристику паттернов метилирования/гидроксиметилирования. Также с методической точки зрения очень удачным является сравнение биоптатов семенников у пациентов с обструктивной и необструктивной азооспермией, что позволяет изящно решить проблему получения образцов для анализа нормального сперматогенеза.

В главе «Результаты» (31 с.) детально и последовательно описаны полученные автором данные. Сильной стороной этой части работы является характер изложения материала, в полной мере отражающий логику проведенного исследования и связь между отдельными частями работы. Результаты хорошо иллюстрированы, их достоверность не вызывает никаких сомнений. Особо хочется отметить высокое качество представленных в работе изображений. После прочтения этой части работы возникают только небольшие уточняющие вопросы и замечания редакторского характера.

Не совсем понятно, что имеет в виду автор, когда пишет о «комплементарности» локализации 5mC и 5hmC в наборах отцовских и материнских хромосом на стадии зиготы (с. 60).

На с. 67 автор пишет о наружном и внутреннем слое бластоцисты. Имеется в виду трофэктодерма и внутренняя клеточная масса или что-то иное?

На с. 86 на основе сравнения образцов хориона и эмбрионального легкого автор делает заключение о том, что характер распределения 5hmC является уникальным для конкретного типа ткани. Можно ли делать такое заключение на основе сравнения легкого и хориона, то есть ткани эмбриона и внезародышевой оболочки?

При анализе некоторых количественных показателей, характеризующихся значительным диапазоном значений (например, число гидроксиметилированных хромосом на метафазную пластинку, с. 82), возможно, для более наглядного представления результатов лучше было бы использовать не среднее значение, а моду.

Возможно, в подписях к рисункам лучше указывать не длину волны флуорохрома (например, Alexa 488), а цвет флуоресцентного сигнала на фотографии, тем более что он может быть изменен искусственно. На некоторых изображениях было бы целесообразно использовать стрелки или какие-либо иные указатели (например, рис. 15, рис. 18).

В главе «Обсуждение» (13 с.) автор подробно анализирует полученные им данные. Материал в этой главе делится на параграфы, соответствующие основным этапам исследования, что существенно облегчает восприятие материала и подчеркивает целостный характер проведенного исследования.

Работа завершается заключением (2 с.) и выводами (6 выводов). Выводы сформулированы корректно и соответствуют поставленным задачам.

Работа написана грамотным литературным языком, выдержана в научном стиле. В тексте встречаются только единичные опечатки и стилистически неудачные выражения, например, «коэффициент корреляции Спирмена был недостоверен» (с. 72), «разжижение хроматина» (с. 78).

В плане дискуссии хотелось бы задать автору два вопроса.

1. В работе автор справедливо отмечает, что многие ключевые процессы развития характеризуются выраженной видовой специфичностью. Можно ли кратко сформулировать основные принципы этой специфичности для процессов метилирования/деметиления в эмбриогенезе разных млекопитающих, например, мыши и человека?

2. Автор не обнаружил гидроксиметилирования хромосом сперматозоидов даже в случае нарушенного сперматогенеза и высказывает предположение, что появление сперматозоидов, содержащих 5-гидроксиметилцитозин, в эякуляте может происходить спонтанно под влиянием негативных внешних факторов. Какие факторы в первую очередь подразумевает автор? Имеются ли в литературе какие-либо экспериментальные или клинические данные по данному вопросу?

Необходимо подчеркнуть, что все высказанные в отзыве вопросы и комментарии ни в коей мере не влияют на общую высокую оценку диссертационной работы Андрея Владимировича Тихонова. Научные положения диссертационной работы А.В. Тихонова в полной мере обоснованы. Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертации сформулированы на основе полученных данных и соответствуют поставленным задачам. Автореферат полностью соответствует тексту диссертации. Основные результаты диссертации представлены в 18 печатных работах, включая 7 статей в авторитетных отечественных и международных

высокорейтинговых журналах, результаты исследования представлялись автором на конференциях разного уровня.

### Заключение

Диссертационная работа А.В. Тихонова «Хромосомная, клеточная и тканевая специфичность гидроксиметилирования ДНК в проэмбриональный и эмбриональный периоды развития человека» является законченным в рамках поставленных задач научно-квалификационным исследованием, выполненным на современном методическом уровне и базирующимся на обширном экспериментальном материале. Диссертация содержит новые обоснованные положения, касающиеся особенностей гидроксиметилирования хромосом на разных стадиях гаметогенеза и эмбриогенеза человека. По актуальности темы исследования, степени обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверности, новизне, научно-теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа А.В. Тихонова полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 28.08.2017), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент  
старший научный сотрудник  
Лаборатории морфологии клетки  
Института цитологии РАН  
Кандидат биологических наук  
По специальности 03.03.01 – физиология  
Боголюбова Ирина Олеговна  
29.05.2018




Адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии Российской академии наук  
Телефон: +7(911)2116331  
e-mail: ibogol@mail.ru