

ОТЗЫВ

официального оппонента на работу 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 по специальности 03.02.07 – генетика.

Актуальность диссертационной работы А.В. Тихонова «Хромосомная, клеточная и тканевая специфичность гидроксиметилирования ДНК в проэмбриональный и эмбриональный периоды развития человека» не вызывает сомнений. Одной из центральных проблем биологии развития является необходимость понять, почему, начиная с процессов оплодотворения, на протяжении всего эмбриогенеза и дальнейшего постнатального развития вплоть до смерти определенные клетки включают и выключают специфические гены. Как формируется многоклеточный организм с огромным количеством разнодифференцированных тканей и органов из одной оплодотворенной яйцеклетки? На многие вопросы пока нет конкретных ответов, но представленная диссертация А.В. Тихонова позволяет понять ряд важнейших эпигенетических процессов, происходящих в течение оогенеза, сперматогенеза, после оплодотворения и в раннем эмбриональном развитии человека. Понятно, что дифференциальная экспрессия генов – это генетическая основа развития живых организмов, которая необходима для достижения и поддержания взрослых стадий. А процессы дифференцировки и межклеточных взаимодействий регулируют эмбриональную программу генной экспрессии. Важную роль при этом играют эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, к которым относятся гетерохроматизация, преобразование гистонового кода, метилирование и деметилирование ДНК, интерференция РНК. Как показали последние исследования, старение и многие заболевания также тесно связаны с наследуемыми в клеточных поколениях изменениями экспрессии генов. Процессы метилирования и деметилирования имеют волнообразный характер на протяжении всего онтогенеза, что хорошо показано в представленной диссертации. Важно отметить, что особенности метилирования часто наследуются в следующих поколениях.

Достоверность научных результатов подтверждается большим объемом экспериментальных данных, документированных

микрофотографиями, использованием многочисленных методических приемов с учетом правильной организации экспериментов, и применением современных методических подходов, таких как иммунофлуоресцентная детекция 5hmC (гидроксиметилирования ДНК) и 5mC (метилирование цитозина), флуоресцентная гибридизация in situ (FISH). Экспериментальные данные обработаны методами биологической статистики с использованием различных современных программных обеспечений и достоверны.

Диссертация оформлена в соответствии с требованиями, предъявляемыми к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и включает в себя следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение, выводы, список литературы. Работа изложена на 129 страницах, содержит 4 таблицы, 25 рисунков.

Во введении автор аргументировано представляет современные представления об эпигеноме как пластичной и динамичной системе, способной к запрограммированным и спонтанным изменениям. Хотя автор довольно категорично утверждает, что генетическая информация одинакова во всех клетках организма на протяжении всего онтогенеза, в отличие от эпигенетической модификации генома, что с моей точки зрения не совсем так. Репрограммирование эпигенома происходит в гаметогенезе и раннем эмбриогенезе волнообразно, что является одним из важных механизмов удаления предсуществующие эпигенетические паттерны для установления новых. Важную роль в эпигенетических преобразованиях играют 5-метилцитозин и продукт его окисления гидросиметилцитозин, исполняющего роль деметилирования ДНК, необходимого для эпигенетического репрограммирования генома гамет и эмбрионов.

Автор поставил основную **цель исследования** – изучить последовательные изменения особенностей гидроксиметилирования ДНК в период оогенеза, сперматогенеза, до - и постимплантационного эмбриогенеза человека.

В главе «**ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР**» Андре Владимирович в соответствии с названием диссертации дает подробную характеристику процессов метилирования и деметилирования как в процессе гаметогенеза, так и раннего эмбриогенеза. Интересен факт, что межаллельные различия в импринтированных генах вызваны метилированием ДНК, и возникают они в гаметогенезе (Паткин, 2008). Важно отметить, что процесс метилирования пассивно или активно обратим и часто реализуется после репликации ДНК.

Несмотря на то, что биологическая роль гидроксиметилирования еще недостаточно изучена, уже по данным литературы понятно, что в основе этого феномена лежит процесс деметилирования ДНК. Достаточно информативен раздел о влиянии внешних факторов на гаметогенез и эмбриогенез, при котором может возникнуть aberrантное метилирование, приводящее к нарушениям первичной дифференцировки клеток и другим постнатальным патологиям (Yauketal., 2008). Достаточно подробно освещены процессы сперматогенеза и оогенеза, доимплантационное и постимплантационное развитие зародыша человека. Литературный обзор написан хорошим языком и полностью отражает изучаемую проблему.

В Главе 2 «**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**» очень подробно на 11 страницах представлены методы приготовления препаратов хромосом и интерфазных ядер из неоплодотворенных яйцеклеток, зигот и бластомеров доимплантационных зародышей человека, из фрагментов тестикулярной ткани, ворсин хориона и фрагментов эмбриональных органов, гистологических препаратов из биоптата тканей семенника, из образцов эякулята. Было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание цитогенетических и гистологических препаратов с помощью антител к 5hmC и 5mC с целью определения ploидности интерфазных ядер на препаратах проводили флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Анализ препаратов и получение фотоизображений проводили с использованием флуоресцентных микроскопов. Детально было исследовано измерение интенсивности флуоресцентного сигнала после иммунофлуоресцентной детекции 5hmC и 5mC на метафазных хромосомах зигот на цифровых фотоизображениях с помощью программы Image J 1.49u. Убедительно была проведена статистическая обработка данных с помощью программ Statistica 8.0 и GraphPadPrism 6.01. Единственное замечание, что при культивировании яйцеклеток и доимплантационных зародышей не указано название питательной среды.

Глава 3 «**РЕЗУЛЬТАТЫ**» содержит 3 основных подраздела, характеризующих распределение 5hmC и 5mC в геноме предимплантационных зародышей человека, в половых клетках и у эмбрионов 5-12 недель развития. Такая последовательность изучения процессов метилирования и деметилирования, как оказалось, имеет свою логику.

Распределение 5hmC и 5mC в геноме зародышей человека на доимплантационных стадиях развития. Исследования были проведены на зиготах, бластомерах, трёхклеточных, 5-, 8-клеточных зародышей и на бластоцистах. Самая интересная стадия – зигота, поэтому остановлюсь на ней подробнее. Через 2-3 часа после оплодотворения в зиготе начинаются сложнейшие преобразования как в мужском, так и в женском пронуклеусах.

На метафазных хромосомах зигот диссертант исследовал распределение иммунофлуоресцентной детекции с помощью специфичных антител к гидроксиметилированному и метилированному цитозину. Были получены интересные результаты по особенностям гипергидроксиметилирования и гипометилирования хромосом материнского и отцовского происхождения. Я когда-то занималась изучением синтеза ДНК в зиготах кролика. Мы показали, что ДНК-репликативные процессы функционально связаны морфологическими изменениями в пронуклеусх кролика. В начале S-фазы мужской пронуклеус обладает более сильно выраженной репликативной активностью, а во второй половине S-периода мужской пронуклеус становится больше женского, но интенсивность синтеза ДНК затухает. Мы выявили два типа хроматина, отличающиеся по времени репликации ДНК. В этой связи было бы интересно посмотреть процессы репрограммирования генома не только в хромосомах, но и в пронуклеусах на разных временных этапах. Автор получил интересные данные о сегментоспецифичном распределении 5hmC в хромосомах, а главное – хромосомы отцовского происхождения гипергидроксиметилированы и гипометилированы по сравнению с хромосомами материнского происхождения. В процессе дробления, уже со стадии трех бластомеров начинается ассиметричное постепенно затухающее распределение 5hmC, что отчасти, по мнению диссертанта, связано с сестринскими хроматидными обменами и репликационными процессами. Первая дифференцировка клеток проходит в бластоцисте и диссертант показал, что высокое содержание 5hmC локализовано в ядрах клеток внутренней клеточной массы, дающей начало развитию эмбриона, что косвенно может указывать о связи процессов метилирования и гидроксиметилирования с первичной дифференцировкой клеток в эмбриогенезе.

Гидроксиметилирование и метилирование ДНК половых клеток человека.

Полученные результаты в этом разделе позволяет несколько по-новому увидеть роль процессов метилирования и гидроксиметилирования в гаметогенезе человека. Удивительно, что распределение антител к 5hmC и 5mC в яйцеклетке разительно отличается от таковых в зиготе и не только в зиготе, но и при дальнейшем развитии. Следует иметь в виду, что хромосомы в метафазе II и в зиготе совершенно отличаются как по структуре, так и по функции. Но самые интересные данные получены при анализе содержания 5hmC и 5mC в сперматозоидах, выделенных из эякулята человека. Впервые диссертант получил данные о связи процесса гидроксиметилирования ДНК с нарушением репродуктивной функции, что имеет важное теоретическое и практическое значение. Эти результаты были дополнительно подтверждены данными спермограммы и анализом фрагментированной ДНК. Дополнительный анализ иммуногистохимической детекции 5-метилцитозина и 5-гидроксиметицитозина в тестикулярной ткани убедительно

продемонстрировал наличие 5mC во всех тестикулярных клетках, тогда как 5hmC отсутствует в делящихся митозом сперматогониях, делящихся мейозом сперматоцитах, а также в сперматозоидах.

Анализ гидроксиметилирования и метилирования ДНК метафазных хромосом у эмбрионов человека 5-12 недель развития. На стадии развития эмбриона до 12 недель можно четко различить две разнодифференцированные ткани: эмбриональная ткань - цитотрофобласт хориона и дифференцированная – клетки легкого. Есть ли взаимосвязь процессов метилирования и деметилирования со степенью дифференцированности клетки? Как показали результаты, полученные диссертантом однозначного ответа нет, но в процессе развития эмбрионов идет ассиметричное наследование гидроксиметилирования у дочерних клеток, что характеризует уникальный характер деметилирования.

Выводы полностью отражают полученные результаты. Автореферат адекватно отражает содержание работы.

Замечания и пожелания. На микрофотографиях не указано увеличение. Было бы желательно изучать иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к 5hmC и 5mC на хромосомах не триплоидных зигот а на диплоидных, а также провести подобный анализ в мужском и женском пронуклеусах в динамике их преобразований. Учитывая тот факт, что к эпигенетическим изменениям относятся не только модификации цитозина, было бы целесообразно в дальнейшем дополнить полученные данные и на молекулярном уровне проследить процессы метилирования и деметилирования у ряда ключевых генов в процессе эмбриогенеза.

Заключение. Полученные автором научные данные вносят вклад в понимание сложнейших процессов репрограммирования генома, выявление эпигенетических маркеров как в половых клетках, так на разных этапах эмбриогенеза человека. Достоинством диссертации является изучение процессов метилирования и деметилирования ДНК на разных уровнях организации половых и эмбриональных клеток: на хромосомном, клеточном, тканевом и отчасти организменном. Для полной картины недостает изучения подобных процессов на молекулярном уровне. Получены уникальные данные о негативном влиянии на фертильность использования высокой доли сперматозоидов в эякуляте, содержащих 5-гидроксиметилцитозин, что в практическом аспекте в дальнейшем позволяет применять в центрах пренатальной диагностики. Полученные новые результаты рекомендуются использовать при чтении курсов лекций по генетике и молекулярной цитогенетике человека, во всех университетах и медицинских научных учреждениях России. Результаты исследований полностью отражены в 7 научных работах, две из которых в Web of Science. А.В. Тихонов является

