

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ

«Институт экспериментальной медицины»

доктор биологических наук, профессор РАН

А.В. Дмитриев

«25»

2018 г.



ОТЗЫВ

ведущего учреждения

на диссертацию Тихонова Андрея Владимировича "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.

Актуальность темы

Работа Тихонова Андрея Владимировича посвящена крайне актуальной теме, а именно изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов в проэмбриональном и эмбриональном периоде развития человека. Особое внимание уделено наименее изученному вопросу относительно гидроксиметилирования ДНК в сравнении с метилированием ДНК на хромосомном, клеточном и тканевом уровнях.

Кроме того, к настоящему времени все более общепринятым становится взгляд, согласно которому отклонения от нормы в эпигенетическом и эпигеномном маркировании, в первую очередь, метилировании ДНК, в ходе самого раннего развития связаны с появлением

"взрослых" заболеваний. Недавно появились данные, что указанные процессы дифференцировки связаны с динамическими изменениями не только метилирования, но и гидроксиметилирования ДНК. Образование гидроксиметилцитозина, как установлено, связано с процессом активного деметилирования ДНК. В этой связи крайне актуальным является вопрос о том, каким образом в структуре хромосом и модификациях хроматина отражается дифференциальная активность генов и целых их кластеров, чему в значительной степени и посвящена работа А.В.Тихонова. Остается неясным, каким образом на уровне метафазных хромосом осуществляется эпигенетический "bookmarking" транскрипционно активных районов хромосом, как он меняется в ходе первичной дифференцировки в доимплантационном развитии, имеются ли какие-либо специфичные хромосомные участки, различающиеся по уровню метилирования в ходе дифференцировки, или, картина распределения метилцитозина и гидроксиметилцитозина вдоль хромосом не меняется. Основные сведения по этой проблематике получены на модельных организмах, а для человека таких данных крайне мало. Данные о динамике активного деметилирования в раннем эмбриогенезе человека на сегодняшний день отсутствуют. Информация об этом процессе имеет как фундаментальную, так и практическую ценность, в связи с тем, что нарушения процессов эпигенетической реорганизации генома половых клеток и доимплантационных зародышей могут препятствовать нормальному эмбриогенезу и приводить к остановке развития. Поэтому представляется логичной и актуальной основной целью автора «изучение специфичности распределения 5mC и 5hmC в ДНК в проэмбриональном и доимплантационном периодах развития человека», и соответствующие задачи по локализации участков метил- и гидроксиметилцитозина в хромосомах.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов

Впервые проведён анализ гидроксиметилирования ДНК метафазных хромосом половых клеток, зигот, бластомеров дробящихся зародышей и клеток эмбриональных и экстраэмбриональных тканей постимплантационных зародышей человека. Установлено, что на стадии зиготы имеет место асимметричность активного деметилирования отцовского и материнского геномов, то есть, метафазные хромосомы отцовского происхождения подвергаются активному деметилированию с образованием 5hmC сильнее, чем метафазные хромосомы материнского происхождения. Гидроксиметилированная ДНК неравномерно распределена в метафазных хромосомах зигот. При делениях дробления вплоть до стадии бластоцисты происходит пассивная потеря 5hmC с образованием гемигидроксиметилированных хромосом и сохранением сегментоспецифичного распределения 5hmC в гидроксиметилированных хроматидах. Получены уникальные данные о межхромосомных, межклеточных и межтканевых различиях гидроксиметилирования ДНК метафазных хромосом эмбрионов человека 5-12 недель развития, обусловленные случайным сочетанием гидроксиметилированных, гемигидроксиметилированных и негидроксиметилированных сестринских хроматид и гомологичных хромосом. Впервые установлена связь между параметрами спермограммы и характером гидроксиметилирования сперматозоидов в эякуляте: увеличение доли гидроксиметилированных сперматозоидов ассоциировано со снижением качества эякулята и нарушениями фертильности.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Значительный объём подтверждает достоверность полученных результатов. В данной диссертационной работе осуществлен подробный статистический анализ данных, что определяет высокую степень достоверности полученных результатов. Для интерпретации результатов привлечено большое количество данных литературы. Сформулированные в

работе выводы являются итогом анализа и обобщения результатов исследования. Полученные в ходе работы результаты опубликованы в виде 7 научных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах и 11 тезисных сообщений. Материалы работы были представлены на трёх международных и одной российской конференциях. Выводы, сформулированные в диссертации, основаны на достаточном объёме наблюдений и аргументировано доказываются соответствующими исследованиями. Практические рекомендации обоснованы фактическим материалом, их достоверность не вызывает сомнений и отражает суть проведённого научного исследования и полученных достижений.

Тема представленной диссертационной работы Тихонова Андрея Владимировича полностью отвечает требованиям по специальности 03.02.07 – генетика.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация изложена на 129 страницах и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа иллюстрирована 25 рисунками и 4 таблицами. Список литературы содержит 291 источник.

В соответствии с темой диссертации построен литературный обзор, в котором автор анализирует современное состояние исследований в области метилирования ДНК, 5-гидроксиметилирования, возникающего в ходе активного деметилирования. Проанализированы основные молекулярные механизмы как метилирования, так и деметилирования в ходе гаметогенеза и эмбриогенеза. Описана роль гидроксиметилцитозина в регуляции активности генов. Очень ценным является, что автор уделяет внимание роли внешних факторов (токсикантов) в репрограммировании генома на основе эпигенетических механизмов. В соответствии с темой работы в обзоре рассматриваются основные механизмы сперматогенеза, оогенеза, до- и постимплантационного развития человека. Таким образом, обзор литературы

приводит автора к обоснованному заключению о недостаточности данных об эпигенетических особенностях генома гамет и эмбриона человека и необходимости дальнейших исследований механизмов репрограммирования генома человека в гаметогенезе и эмбриогенезе как для понимания фундаментальных проблем биологии развития, так и для решения актуальных задач медицинской генетики, в том числе и с широким использованием современных вспомогательных репродуктивных технологий.

В целом обзор прекрасно написан и, конечно, может быть использован при преподавании соответствующих курсов. Единственное замечание относится к рисунку 1, в котором непонятно, какая из DNMT имеется в виду.

В главе "Материал и методы" автор подробно описывает как материал исследования, так и использованные методы. Описаны методы приготовления препаратов метафазных хромосом и интерфазных ядер из неоплодотворившихся яйцеклеток, зигот и бластомеров доимплантационных зародышей человека, Приготовления цитогенетических препаратов из фрагментов тестикулярной ткани, ворсин хориона и фрагментов эмбриональных органов, приготовления гистологических препаратов из биоптата тканей семенника, приготовления препаратов из образцов эякулята. Все эти методы описаны подробно, что дает возможность оценки в дальнейшем адекватности использованных методов окрашивания. Использовано "классическое" QFH-окрашивание цитогенетических препаратов яйцеклеток, зигот, бластомеров доимплантационных зародышей и сперматогенных клеток человека, иммунофлуоресцентное окрашивание цитогенетических и гистологических препаратов с помощью антител к 5hmC и 5mC, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Автор также использовал измерение интенсивности флуоресцентного сигнала после иммунофлуоресцентной детекции 5hmC и 5mC на препаратах. То есть, как методы приготовления препаратов, так и визуализации сигналов являются современными и адекватными поставленным задачам.

Основные полученные результаты представлены в виде 15 микрофотографий и ряда графиков, показывающих результаты количественных исследований. К сожалению, в силу практической недоступности половых клеток, зигот и доимплантационных зародышей человека, работа была в основном проведена на аномальном материале, что, видимо, и обусловило недостаточно высокое качество ряда микрофотографий. Возможно, что недостаточное качество хромосом связано с тем, что автор не использовал при приготовлении хромосомных препаратов цитостатики, как, например, колцемид. Понятно, что при наблюдении в микроскоп, картина является более четкой. Кроме того, видимо, имело смысл сделать микрофотографии как общих планов метафазных пластинок, так и представить отдельные фрагменты с большим увеличением, чтобы более доказательно утверждать ряд заключений автора. Тем более, что в ряде случаев это было сделано. Тем не менее, обнаруженные автором основные закономерности репрограммирования с участием 5mC и 5hmC у человека сходны с таковыми у грызунов, что также указывает на достоверность полученных результатов, как и проведенная статистическая обработка. Ряд особенно интересных результатов был отмечен выше. Очень хорошо написана глава «Обсуждение». Диссертационная работа написана литературным языком, достаточно легко читается. Представленный материал в таблицах и рисунках удобен для восприятия и анализа. Выводы логично вытекают из содержания диссертации, обоснованы и полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования. Практические рекомендации сформулированы чётко и понятно, что позволяет использовать их в практической работе. Основные положения диссертации отражены в автореферате.

Представленная диссертационная работа, в целом, заслуживает высокой положительной оценки, выполнена на современном уровне и имеет большое научное и практическое значение.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Результаты настоящей работы вносят существенный вклад в понимание механизмов эпигенетической регуляции и организации работы генома в онтогенезе человека. Установленные изменения гидроксиметилирования ДНК в половых клетках, в доимплантационных и постимплантационных эмбрионах позволяют приблизиться к пониманию биологической роли 5hmC в процессах репрограммирования генома человека в онтогенезе. Полученные результаты могут служить основой при разработке и совершенствовании методов оценки функционального состояния генома. Оценка характера гидроксиметилирования мужских гамет может стать новым информативным критерием качества эякулята, что будет иметь существенное значение для повышения эффективности вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Личный вклад автора

Автором лично определены цель и задачи исследования, проанализирована отечественная и зарубежная литература по изучаемой проблеме, разработаны методические подходы к проведению исследования. Автор непосредственно производила сбор данных, обработку и обобщение полученных материалов, подготовку основных публикаций по выполненной работе, написание и оформление рукописи.

Характеристика публикаций по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 7 статей в научных журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ, глава в монографии. Содержание автореферата и печатных работ соответствует материалам диссертации.

Оформление диссертации и автореферата соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным исследованиям (ГОСТ Р 7.0.11-2011). Автореферат оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ и отражает основные результаты, полученные в диссертации.

Замечания по работе

При общей положительной оценке данной работы необходимо отметить, что имеются отдельные опечатки, которые не снижают ценности проделанной работы. Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет, но в качестве дискуссии хотелось бы задать следующий вопрос:

Каким образом и насколько скоро может быть использован подход, описанный в работе, в практике ЭКО?

Заключение

Диссертационная работа Тихонова Андрея Владимировича "Хромосомная, клеточная и тканевая специфичность гидроксиметилирования ДНК в проэмбриональный и эмбриональный периоды развития человека", представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, результаты которой имеют существенное значение для современной генетики.

В исследовании Тихонова Андрея Владимировича решена важная современная научная задача по изменению гидроксиметилирования ДНК в проэмбриональный и эмбриональный периоды, свидетельствующие об эпигенетическом репрограммировании генома, важном для корректной реализации генетической информации в программе индивидуального развития человека.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Тихонова Андрея Владимировича соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор – Тихонов Андрей

Владимирович – заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв на диссертацию обсуждён на заседании Отдела молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (протокол № 11 от 13 апреля 2018 года).

Ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярной цитогенетики развития млекопитающих Отдела молекулярной генетики Федерального государственного Бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»,
доктор медицинских наук (03.03.04),

Дыбан Павел Андреевич

Контактная информация о ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
Телефон: (812) 234-6868, факс: (812) 234-9489, E-mail: iem@iemrams.ru

