ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертационную работу Деменевой Виктории Вадимовны
на тему «Роль аберрантного метилирования ретротранспозона LINE-1
в этиологии эмбриональной гибели», представленную к защите на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук
по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки)

Актуальность темы исследования

Невынашивание беременности является одной из наиболее актуальных современных медицинских проблем. Самопроизвольным прерыванием заканчивается до 15% всех клинически зарегистрированных беременностей, а ранние репродуктивные потери достигают 60% от всех случаев зачатия. Повторные случаи потери самопроизвольной потери беременности, привычное невынашивание, наиболее часто происходящее в первом триместре, оказывают негативное воздействие на здоровье женщины и психоэмоциональное состояние в семье. Этиология невынашивания многообразна и включает различные причины и патогенные факторы, влияющие как со стороны самого эмбриона/плода, так и с материнской стороны. Большинство самопроизвольных потерь беременности происходит в первом триместре и вызвано нарушением развития эмбриона или его гибелью (ранние репродуктивные потери, замершая беременность, анэмбриония). В 50-60% случаев потери беременности вызваны хромосомными аномалиями (анеуплоидией и несбалансированными структурными аномалиями хромосом, патогенными вариациями числа копий (CNV), приводящими к нарушению развития эмбриона/плода, эмбриолетальными мутациями). Среди других патогенных факторов отмечают включают острые инфекционные заболевания, аномалии формирования пола и пороки развития матки, значительные по силе физические воздействия и токсические поражения, эндокринные и иммунологические нарушения, тромбофилии, тяжелые хронические состояния у матери. В большинстве остальных случаев причина невынашивания беременности остается неустановленной.

Значимость нарушений эпигенома в развитии ряда наследственных заболеваний и в генезе репродуктивных потерь была показана ранее. Изменение метилирования, эпигенетическое репрограммирование, происходящее в клетках эмбриона на ранних стадиях его развития в значительной мере связаны с состоянием гаметогенеза, возрастом и различными изменениями в геноме герминативных клеток, которые оказывают существенное влияние на возникновение мейотических и митотических ошибок, ведущих к анеуплоидии, структурным хромосомным аномалиям, генным мутациям, эпигенетическим нарушениям, генетической

нестабильности и мозаицизму. Однако вклад различных эпигенетических факторов в этиологию и патогенез аномалий развития эмбриона, репродуктивных потерь, бесплодия и невынашивания беременности, а также связь генетических и эпигенетических изменений в нарушении эмбрионального развития человека недостаточно изучены. Одним из частых эпигенетических факторов, влияющих на развитие и сохранение беременности, является изменение метилирования различных регионов генома в клетках эмбриона/плода или его оболочек. Значительную часть в геноме человека составляют высокопийные элементы, в частности ретротранспозон LINE-1 (17% от всего генома), уровень метилирования которого влияет на транскрипционную активность большого количества генов у эмбрионов ранних стадий развития и в эмбриональных стволовых клетках. Это подразумевает, что изменения метилирования LINE-1 в герминативных клетках может негативно влиять на развитие эмбриона и вынашивание беременности.

Диссертационное исследование В.В. Деменевой посвящено изучению метилирования ретротранспозона LINE-1 и его различных семейств, роли их аномального метилирования в этиологии эмбриональной гибели и потери беременности, их связи с анеуплоидией у эмбриона, влияния метилирования на экспрессию генов, в связи с этим научная новизна и актуальность работы не вызывает сомнения.

Научная новизна

В работе получены новые данные об аберрантном метилировании ретротранспозона LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности с нормальным мужским и женским кариотипом, так и абортусов с анеуплоидией (с трисомией 16 и моносомией X). Показана широкая вариабельность (от 19% до 57%) индекса метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторе LINE-1, при сохранении формы профиля метилирования вдоль анализируемого региона у спонтанных и медицинских абортусов. Впервые оценено изменение уровня метилирования различных подсемейств ретротранспозона LINE-1 у медицинских и спонтанных абортусов с нормальным и аномальным кариотипом, а также проведен сравнительный анализ метилирования при спорадических спонтанных абортах и привычном невынашивании. Впервые показано влияние возраста родителей на выраженность метилирования LINE -1 в первом триместре беременности при нормально протекающей беременности и в случае внутриутробной гибели эмбриона, увеличение индекса метилирования у абортусов с возрастом родителей, отсутствие значимого более высокого уровня метилирования при привычном невынашивании по сравнению со спорадическими случаями спонтанных абортов в первом триместре беременности. Впервые охарактеризована экспрессия генов (на примере генов *NUP153* и *YWHAB*) с альтернативных

промоторов LINE-1 в трофобласте хориона при нормальном развитии и аномалии экспрессии гена при спонтанной внутриутробной гибели эмбриона в первом триместре беременности.

Ценность для науки и практики результатов работы

Подтверждена гипотеза о том, что гипо- и гиперметилирование ретротранспозона LINE-1 может быть связано с нарушением эмбрионального развития человека, наличием анеуплоидии и невынашиванием беременности. Впервые установлено, что уровень метилирования LINE-1 в ворсинах хориона при анеуплоидии, в частности при трисомии 16 (немозаичной и мозаичной) и моносомии X повышен по сравнению с медицинскими абортусами, и у абортусов с моносомией по X-хромосоме коррелирует с возрастом отца. Индекс метилирования LINE-1 увеличивается с возрастом родителей у эмбрионов нормально протекающих беременностей, но схож у спонтанных абортусов от разных беременностей у одних и тех же супругов.

В результате работы разработан и успешно использован метод анализа метилирования ДНК промотора ретротранспозона LINE-1 в геноме человека, основанный на таргетном бисульфитном массовом параллельном секвенировании. Данный метод позволяет определить метилирование каждого CpG-сайта в промоторной области LINE-1 и среднее значение их метилирования ДНК различных его семейств для оценки эпигенетических аномалий в разных тканях и опухолях, эпигенетических эффектов мутагенов и мониторинговых исследований.

Полученные в работе данные послужат основой для дальнейших исследований в области генетики, эпигенетики и транскриптомики эмбрионального развития, его нарушений и невынашивания беременности. Разработки и совершенствованию подходов и методов медико-генетического обследования и консультирования пар с нарушением репродукции.

Достоверность результатов диссертации

Высокая степень достоверности данных, полученных в ходе выполнения диссертационной работы В.В. Деменевой, обеспечивается применением большого комплекса современных молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и других методов исследования, биоинформатического анализа, а также репрезентативным размером исследованной выборки – образцы ворсин хориона 352 абортусов (286 спонтанных абортусов I триместра и 46 медицинских абортусов). Полученные данные были проанализированы с помощью адекватных статистических методов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование В.В. Деменевой основывается на адекватном методологическом подходе к планированию и проведению

исследования. В своей работе автор поставил четкую конкретную цель и сформулировал соответствующие ей задачи. Теоретические и методические аспекты исследования основаны на глубоком анализе научных работ в области генетических и эпигенетических факторов эмбрионального развития и его нарушений как причин невынашивания беременности. Полученные автором результаты свидетельствуют о выполнении всех поставленных задач, умозаключения в полной мере подкреплены убедительными экспериментальными данными. Положения и выводы, изложенные в диссертации, представляют собой научно обоснованные и аргументированные утверждения, которые базируются на оригинальных результатах и подтверждаются данными статистического анализа. Результаты исследования иллюстрированы большим количеством рисунков и таблиц.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

Материалы диссертации представлены в 12 печатных работах соискателя, в том числе 4 статьях в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук перечня ВАК РФ (из них 2 за первым авторством), 8 публикаций – статьи в сборниках и тезисы конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждение, выводы, список сокращений, список литературы, список иллюстративного материала. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами. Библиография включает 278 литературных источника, из них 9 источников отечественной литературы и 269 источника зарубежной литературы.

Обзор литературы изложен на 28 страницах и отражает современные научные знания о нарушении эмбрионального развития, причинах репродуктивных потерь в первом триместре беременности с фокусом на анеуплоидию у эмбриона как основную причину аномалий развития эмбриона и невынашивание беременности. В обзоре также освещены данные о эпигенетических изменениях, происходящих в гаметогенезе и эмбриогенезе, мобильных генетических элементах в геноме человека, их роли в онтогенезе человека, структуре и организации ретротранспозона LINE-1, его значении в активации генома эмбриона и развитии плаценты.

В главе 2 (раздел Материалы и методы), изложенном на 23 страницах, описан дизайн исследования, использованные в работе методы, протоколы постановки экспериментов, реактивы и оборудование.

Глава 3 - «Результаты и обсуждение» представляет собой основную часть диссертационной работы, ее подразделы соответствуют поставленным

задачам: разработке метода таргетного бисульфитного массового параллельного секвенирования промотора LINE-1, оценке метилирования LINE-1 и его различных подсемейств у спонтанных абортусов, анализу метилирования LINE-1 в эмбрионах в зависимости от возраста родителей в семьях с спорадическим и привычным невынашиванием беременности, у абортусов из одних и тех же семей, а также анализу экспрессии генов *NUP153* и *YWHAB* с канонических и альтернативных промоторов LINE-1.

Текст автореферата достаточно полно отражает основные положения диссертационной работы, соответствует ее содержанию, раскрывает научную новизну работы, основные полученные результаты.

Замечания по работе

По диссертационной работе принципиальных замечаний нет.

В тексте диссертации встречаются некорректные термины и выражения («структурные аномалии матки», «зародышевый геном», «…трисомия по хромосомам 2, 13, 15, 16, 18, 21 и 22 является наиболее частой…»), повторы слов, опечатки.

При ознакомлении с текстом диссертации возникли следующие вопросы:

1. На основании чего были отобраны 19 исследованных CpG локусов для оценки метилирования промоторной области ретротранспозона LINE-1, насколько они репрезентативны для оценки различных его копий и семейств?

2. Чем можно объяснить более высокий уровень метилирования LINE-1 у абортусов более ранних самопроизвольно прервавшихся беременностей по сравнению с последующими потерями беременности, в тех семьях с привычным невынашиванием, в которых исследован абортивный материал от разных спонтанных выкидышей? Это идет вразрез наличию положительной корреляции с возрастом родителей, свидетельствующих о нарастании метилирования LINE-1 с возрастом родителей?

3. Чем можно объяснить различия в уровне метилирования у абортусов с моносомией X, имеющих X-хромосому материнского или отцовского происхождения, а также рост индекса метилирования LINE-1 у спонтанных абортусов с моносомией по X-хромосоме с увеличением возрастом отца?

Однако следует подчеркнуть, что указанные недочеты не являются принципиальными, касаются оформления работы и не снижают общей высокой ценности диссертационного исследования, а вопросы носят дискуссионный характер и подчеркивают интерес к ней.

Заключение

Диссертационное исследование Деменевой Виктории Вадимовны на тему «Роль аберрантного метилирования ретротранспозона LINE-1 в этиологии эмбриональной гибели» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, касающейся изучения эпигенетических факторов в нарушении развития

эмбриона и невынашивании беременности, что имеет существенное значение для развития генетики и медицинской науки в целом.

Диссертационная работа Деменевой Виктории Вадимовны по своей по своей актуальности, научной новизне, практической значимости, полноте изложения и достоверности полученных результатов, степени обоснованности сформулированных в диссертации научных положений и выводов, соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. от 16.10.2024 г.)), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Деменева Виктория Вадимовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7. Генетика (медицинские науки).

Официальный оппонент
Заведующий лабораторией
генетики нарушений репродукции
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова»,
доктор медицинских наук
по специальности
1.5.7 – Генетика (медицинские науки) Черных Вячеслав Борисович

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Медико-генетический научный центр
имени академика Н.П. Бочкова» (ФГБНУ «МГНЦ»)
115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1
8-499-324-13-20 (раб.)
chernykh@med-gen.ru
https://med-gen.ru/

Подлинность подписи В.Б. Черных заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ»,
к.м.н. Воронина Екатерина Сергеевна

02.06.2025 г.