

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Деменевой Виктории Вадимовны на тему: «Роль аберрантного метилирования ретротранспозона LINE-1 в этиологии эмбриональной гибели», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7 – Генетика (медицинские науки)

Актуальность темы исследования

Известно, что частота самопроизвольных абортов достигает 15% среди клинически подтвержденных беременностей в сроке от 4 недель беременности. Из них 5% женщин, вынашивающих ребенка, во всем мире страдают от потери беременности на ранних сроках (до 12 недель), и у большинства из них наблюдается рецидив. По некоторым оценкам частота самопроизвольного прерывания беременности еще выше и может достигать 40-60% всех беременностей. При этом значительное число эмбрионов прекращает развитие вскоре после имплантации, что может быть диагностировано только косвенными методами (например, по задержке менструации). Причинами ранних потерь беременности могут являться как негенетические, так и генетические факторы. Среди негенетических факторов хорошо изучены нарушение эндокринной и иммунной регуляции, протромботические состояния. Основной вклад в этиологию ранней эмбриональной гибели по генетическим причинам приходится на хромосомные аномалии. По разным оценкам, от 50 до 60% спонтанных абортусов имеют аномальный кариотип. Среди других генетических причин невынашивания беременности потенциальную роль могут играть моногенные болезни и нарушение эпигенетической программы формирования организма. Среди эпигенетических факторов, влияющих на взаимодействие плода и матери, изучение метилирования ДНК представляется одним из наиболее актуальных.

Было показано изменение метилирования ДНК в ворсинах хориона при потере беременности. Метилирование ДНК у млекопитающих можно обнаружить в области перичентромерных, гетерохроматиновых районов хромосом, а также в повторяющихся генетических элементах, например, в транспозонах. Для оценки общего уровня метилирования ДНК в данной работе использовалось семейство ретротранспозонов LINE-1. Примечательно, что активация этих мобильных элементов необходима для развития эмбриона до стадии имплантации. Также установлено, что промоторные регионы ретротранспозона частично деметилированы на стадии бластоцисты и во внезародышевых тканях. Все эти факты делают диссертационную работу Деменевой Виктории Вадимовны крайне актуальной для дальнейшего изучения причин невынашивания беременности.

Целью исследования являлось охарактеризовать aberrантное метилирование ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов в первом триместре беременности.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Работа выполнена на обширном клиническом материале - 416 образцах хориона спонтанных абортусов I триместра беременности на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов исследования (высокопроизводительное секвенирование, FISH-анализ).

Результаты диссертационной работы в полной мере иллюстрированы достаточным количеством информативных рисунков и таблиц, что облегчает восприятие материала. Выводы и практические рекомендации четко аргументированы, закономерно вытекают из представленного материала, отражают содержание диссертации и полностью соответствуют поставленным задачам.

Основные результаты исследования представлены на 1 российской и 5 международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 12 работ,

в том числе 4 статьи в журналах перечня ВАК РФ (из них 2 за первым авторством), 8 публикаций – статьи в сборниках и тезисы конференций, в которых достаточно полно отражены результаты диссертационной работы.

Аннотация диссертации оформлена в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает полное представление об основных положениях диссертации.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

В исследовании было выполнено метилирование ДНК промотора ретротранспозона LINE-1 методом массового параллельного секвенирования. Разработаны подходы к анализу влияния нарушений метилирования ретротранспозона LINE-1 у спонтанных абортусов с различным кариотипом. Определены факторы, влияющие на связь между уровнем метилирования LINE-1 в хорионе и невынашиванием беременности. Также необходимо отметить, что впервые проведено сравнение нарушения уровня метилирования различных подсемейств LINE-1 у медицинских и спонтанных абортусов с различным кариотипом. В работе доказана различная экспрессия генов с альтернативных промоторов LINE-1 в трофобласте в норме и в случае гибели эмбриона.

Высокая степень достоверности данных, полученных в настоящей работе, обеспечивается применением в ходе исследования современных высокоточных молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических и биоинформатических методов исследования с верификацией полученных данных, а также статистической обработкой полученных результатов.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Практическая значимость заключается в том, что выполненная работа дает возможность расширить представление об эпигенетических механизмах, лежащих в основе нормального развития зародыша человека на ранних

стадиях эмбриогенеза и позволяет оценить связь между уровнем метилирования LINE-1 в плаценте и невынашиванием беременности. Эти данные в дальнейшем могут использоваться для разработки методов оценки качества эмбрионов во вспомогательных репродуктивных технологиях.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

Полученные результаты диссертационного исследования позволяют определить направление дальнейшего изучения эпигенетических механизмов, которые могут приводить к нарушениям программы индивидуального развития эмбриона.

Общая характеристика работы

Диссертация Деменевой Виктории Вадимовны изложена на 145 страницах машинописного текста и построена по традиционному плану, состоит из следующих разделов: введения, главы обзор литературы, главы материалы и методы исследования, главы с изложением результатов собственных исследований и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Текст диссертации иллюстрирован 12 таблицами и 29 рисунками. Цитированная литература современна и включает 278 библиографических источника, в том числе 9 отечественных и 269 зарубежных. Диссертация написана хорошим литературным языком, легко читается. Опечатки и ошибки согласования единичные.

Во Введении обоснована актуальность темы научного исследования, отражена степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи, отражена научная новизна и практическая значимость, положения, выносимые на защиту, сведения об апробации результатов исследования, публикациях по теме исследования, личном вкладе автора, объеме и структуре диссертационной работы.

В Обзоре литературы проведен анализ научной литературы по теме исследования, современные знания о генетических причинах ранних репродуктивных потерь, причинах происхождения анеуплоидий у эмбрионов, особенностях метилирования в гаметогенезе, изменении профиля метилирования генома на преимплантационной стадии развития, особенностях метилирования внезародышевых тканей на ранних сроках беременности. Приводится информация о мобильных элементах генома, их классификации и роли в онтогенезе, структуре и организации ретротранспозона LINE-1. Обзор выполнен на высоком профессиональном уровне, что свидетельствует о компетентности соискателя.

В разделе **Материалы и методы исследования** приведена характеристика сформированной выборки из 416 образцов хориона спонтанных абортусов первого триместра беременности. После проверки кариотипа для дальнейшего анализа было оставлено 332 образца (с нормальным кариотипом ($n = 178$), трисомией 16 ($n = 62$) и моносомией X ($n = 46$)), а также медицинские абортусы в качестве группы сравнения ($n = 46$). Приводится характеристика групп абортусов, которым проводился анализ экспрессии генов, описание процедур взятия материала для исследования, выделения ДНК и РНК, бисульфитной модификации ДНК, протокола проведения ПЦР, проведения высокопроизводительного секвенирования, порядка подсчета индекса метилирования, проведения STR- и FISH-анализа, проведения биоинформатического и статистического анализа полученных данных.

Глава 3 посвящена собственным **Результатам и обсуждению**.

В разделе 3.1. описана разработка метода таргетного бисульфитного секвенирования в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1. Указывается, что данный метод потенциально может иметь широкий спектр применений: от оценки эпигенетических аномалий в различных тканях и опухолях до анализа эпигенетических эффектов мутагенов и мониторинговых исследований.

В разделе 3.2. приведена оценка индекса метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности.

В разделе 3.3 дана оценка уровня метилирования различных подсемейств LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в первом триместре беременности

В разделе 3.4 оценивается индекс метилирования LINE-1 в трофобласте хориона спонтанных абортусов в зависимости от возраста родителей.

В разделе 3.5 дан сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 в трофобласте хориона в эмбрионах в семьях с привычным невынашиванием беременности.

В разделе 3.6 описан анализ связи уровня метилирования LINE-1 в ворсинах хориона спонтанных абортусов из одних и тех же семей.

В разделе 3.7 дается анализ экспрессии генов NUP153 и YWHAB с канонических и альтернативных промоторов LINE-1.

В целом, диссертационная работа производит положительное впечатление, она написана хорошим литературным языком и аккуратно оформлена. Встречающиеся в тексте опечатки единичны. Принципиальных замечаний по содержанию работы, выводов и положений нет, однако следует отметить некоторые недочеты:

- подробное описание метода таргетного бисульфитного секвенирования в 19 CpG-сайтах промотора LINE-1 целесообразнее было поместить в разделе “Материалы и методы исследования”, а не в разделе “Результаты и обсуждение”;

- “Изменение уровня метилирования ДНК является одним из параметров эпигенетической регуляции экспрессии генов в различных типах клеток и на разных этапах онтогенеза является” - (стр. 6);

- “Ошибки в метилировании, возникающие в результате перепрограммирования генома эмбриона, могут потенциально могут привести к возникновению анеуплоидии” - (стр. 7);

“Рисунок 2” - (стр. 51);

“по 16 хромосоме был *определен определить* момент” (стр. 77) ;

“*изменение* индекса метилирования LINE-1” (стр. 91);

“*функционарование* митохондрий” (стр. 92);

“соответствует *каждому* восьмому” (стр. 112);

“В настоящей работе нами был разработан новый подход для анализа метилирования ДНК в промоторе ретротранспозона LINE-1, который был основан на технологии *NGS*” (стр. 112).

Термин *NGS* отсутствует в списке сокращений и упоминается в работе без расшифровки и только в разделе Заключение. При этом на стр. 14 применяется также не корректный перевод этого термина “высокопроизводительное массовое параллельное секвенирование” (стр. 14). Представляется корректным придерживаться либо термина “массовое параллельное секвенирование”, либо термина “высокопроизводительное секвенирование”, который считаем наиболее правильным.

В разделе “Материалы и методы исследования” указано, что образцы хранились в жидком азоте (стр. 48), при этом на следующей странице указывается, что образцы тканей хранились при температуре -80°C. (стр. 49).

Следует отметить, что высказанные замечания не снижают высокой оценки представленного диссертационного исследования и касаются оформления текста диссертации.

Заключение

Диссертация В.В. Деменевой «Роль аберрантного метилирования ретротранспозона LINE-1 в этиологии эмбриональной гибели», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7 Генетика, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной задачи по исследованию роли аберрантного метилирования ретротранспозона LINE-1 в этиологии эмбриональной гибели, что имеет существенное значение для

расширения представления об эпигенетических механизмах, лежащих в основе невынашивания беременности.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Деменевой Виктории Вадимовны соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (в ред. от 16.10.2024 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор диссертации Деменева Виктория Вадимовна заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Официальный оппонент,
кандидат медицинских наук,
заведующий лабораторией
пренатального ДНК-скрининга
ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»
Минздрава России



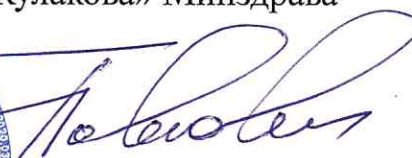
Барков Илья Юрьевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации» (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России) 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4 8(495) 531-44-44, официальный сайт <https://www.ncagp.ru>; телефон и E-Mail оппонента 8 (495) 792-90-95, i_barkov@oparina4.ru, i@barkov.ru

Подпись кандидата медицинских наук Баркова Ильи Юрьевича заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, кандидат медицинских наук, доцент

«05» июня 2025 г.



Павлович С.В.