

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Лисачева Артема Павловича
«Сравнительный анализ структуры, синапсиса и рекомбинации половых хромосом разного эволюционного возраста у позвоночных», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы. Определяется важной ролью синапсиса и рекомбинации хромосом при прохождении мейоза, а также явно недостаточной изученностью цитогенетических механизмов, определяющих особенности спаривания и рекомбинации половых хромосом у представителей разных классов Позвоночных.

Новизна исследования и полученных результатов. Автор обнаружил видоспецифичные особенности строения и поведения половых хромосом у двух видов гуппи, каролинского и белогубого анолисов, речной и черной крачек. Сконструированы рекомбинационные карты аутосом двух видов анолисов, двух видов крачек. На основе впервые описанного кариотипа черной крачки, выявлены перестройки, отличающие его от кариотипа речной крачки. Показано, что увеличение степени дивергенции между гетероморфными половыми хромосомами приводит к усилению отличий параметров синапсиса половых хромосом и аутосом того же вида. Впервые продемонстрировано, что в половых бивалентах распределение событий кроссинговера в псевдоаутосомном районе становится более равномерным при уменьшении его длины, устанавливается четкая граница с нерекombинирующим районом.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертант использует традиционные научные методы обоснования полученных результатов и выводов. Им изучены и проанализированы опубликованные результаты и теоретические положения других авторов по теме исследования.

Для подтверждения теоретических положений автором использованы адекватные хорошо разработанные методы научных исследований.

Обоснованность результатов, выдвинутых диссертантом, основывается на согласованности поставленной цели работы, определяемых ею задач, выносимых на защиту научных положений, полученных материалов и сделанных научных выводов.

Личный вклад автора несомненен. Он самостоятельно осуществил лабораторные исследования, включая приготовление препаратов

синаптонемных комплексов исследуемых видов рыб и рептилий, иммуноокрашивание, приготовление зондов для FISH, оформил и проанализировал полученные результаты и написал диссертацию.

Достоверность научных положений, выводов, рекомендаций. Высокая степень достоверности результатов исследования определяется достаточным объемом материала, применением адекватных методов, апробированных мировым цитогенетическим сообществом.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты раскрывают характер мейотического поведения и строения пары половых хромосом разной степени дивергенции в кариотипах представителей рыб, рептилий и птиц, вносят существенный вклад в понимание путей эволюции половых хромосом и детерминации пола. Разработанная автором методика С-подобного окрашивания хромосом с использованием красителя ДАПИ может быть использована цитогенетиками-практиками. Результаты могут и должны быть использованы в преподавании вузовских цитологических и цитогенетических дисциплин.

Структура и объем работы. Диссертация А.П. Лисачева изложена на 113 стр. текста и представляет собой рукопись, построенную и оформленную по общепринятой схеме. Она включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы». Главы диссертационной работы логично построены, отличаются последовательностью и лаконичностью изложения. Иллюстративный материал представлен 25 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 207 источников.

Оценка содержания диссертационной работы. Название диссертации отражает ее содержание. Автореферат соответствует диссертации.

Во «Введении» излагаются общие вопросы: актуальность исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, научно-практическая ценность, выносимые на защиту положения, публикации, апробация работы, структура и объем диссертации.

Глава «Обзор литературы» включает обширный и всесторонний анализ компилятивной информации по изучаемой проблеме. Кроме общих представлений о мейозе, подробно описано поведение половых хромосом в мейозе, их преобразование в эволюции, понятно и логично сделан обзор разнообразных механизмов детерминации пола и организации половых хромосом у разных классов позвоночных. В этом же разделе автор обосновывает выбор видов и методов исследования синапсиса и рекомбинации половых хромосом.

Глава «Материал и методы» представляет методику проведения исследования, включает описание источников животного материала. Она позволяет оценить личный вклад автора в решение проблемы. Дано описание методик приготовления препаратов синаптонемных комплексов рыб, рептилий и птиц, получения препаратов метафазных хромосом гуппи, иммунофлуоресцентного выявления белков мейотических хромосом, флуоресцентной гибридизации *in situ*, анализа хромосомных препаратов с использованием флуоресцентной микроскопии. Также приведена методика окрашивания препаратов синаптонемных комплексов азотнокислым серебром с последующим анализом с помощью электронного микроскопа. Отдельного упоминания заслуживает методика С-подобного окрашивания хромосом с помощью ДАПИ, разработанная автором самостоятельно.

В главе «Результаты» описаны кариотипы у выбранных объектов: обыкновенной гуппи и гуппи Эндлера, каролинского и белогубого анолисов, речной и черной крачек. Половые хромосомы идентифицированы на основании их специфической морфологии (крачки), с помощью С-подобного окрашивания (гуппи, анолисы), после гибридизации с полногеномным (гуппи) или хромосом-специфичными (анюлисы) зондами. Для половых хромосом разной степени дифференциации описаны последовательные этапы синапсиса. Распределение сигналов MLN1 проанализировано отдельно для аутосом и половых хромосом у исследуемых видов, что позволило оценить уровень рекомбинации в разных хромосомах и хромосомных районах.

В главе «Обсуждение» рассматриваются особенности синапсиса и рекомбинации гоносом у животных с «примитивными», эволюционно молодыми (10-15 млн. лет) половыми хромосомами, половыми хромосомами среднего возраста (70-80 млн. лет) и сильно дивергировавшими, эволюционно старыми (более 100 млн. лет). Обсуждаются данные по числу и расположению точек кроссинговера на аутосомах исследованных видов. Предлагаются возможные биологические объяснения малой интенсивности рекомбинации у гуппи и высокой рекомбинационной активности у птиц, сильной дистализации обменов на хромосомах анолисов. В заключении автор подытоживает сказанное об отличиях поведения половых хромосом и аутосом в мейозе разных групп позвоночных.

Выводы, предложенные автором, согласуются с поставленными задачами и логично вытекают из полученных данных.

В качестве замечаний отмечу следующее:

1. *Замечания по содержанию.* Рецензент категорически не согласен с употреблением термина «кроссовер» для обозначения событий кроссинговера. В русском языке устоялось употребление слова «кроссовер»

для обозначения «организмов, возникших в результате кроссинговера» либо «гаметы, включающей хромосомы, прошедшие этап кроссинговера» (Акифьев В.А., Лисовенко Л.А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов // Изд-во ВНИРО, Москва, 1995). Некорректное употребление может быть обнаружено в словосочетаниях и фразах: «...полное спаривание всех бивалентов и наличие в каждом из них хотя бы одного кроссовера» (с. 4), «пики частоты кроссоверов» (с. 11), «подавление возникновения нового кроссовера» (с. 11), «один кроссовер на хромосому» (с. 11), «терминальный кроссовер» (с. 63), «дистализация кроссоверов» (с. 65), «кроссовер может оказаться в середине плеча» (с. 65).

Серьезная смысловая опечатка присутствует на с. 11 «В первом мейотическом делении разрываются связи *между хроматидами*, и гомологи расходятся к дочерним клеткам». В первом делении мейоза связи между сестринскими хроматидами должны сохраняться.

В главе «Материал и методы» не приведено название антител к белкам центромеры человека (с. 46), а также осталось неясным, кто принимал участие в приготовлении препаратов синаптонемных комплексов птиц, если автор их не изготавливал самостоятельно. Хотя методика серебрения синаптонемных комплексов полностью соответствует таковой для выявления ядрышек, не стоило называть подраздел как «Окрашивание серебром (Ag-NOR)» (с. 48).

Вопрос к рисунку 15 (с. 61): как указано в подписи, для выявления полового бивалента был использован зонд «L», содержащий материал хромосомы X и хромосомы 14 каролинского анолиса. Если выявление хромосомы X с помощью этого зонда не оставляет сомнений, то почему этот же зонд не дает сигнала на 14 хромосоме?

2. *Замечания по оформлению.* По мнению рецензента, рисунок 5 и таблица 2 слишком «отстают» от ссылки на них в тексте (ссылка на рис. 5 – на с. 50, а сам рис. 5 – на с. 52, ссылка на табл. 2 – на с. 66, сама табл. 2 – на с. 72).

В подписи к рис. 13 и рис. 14 указано, что центромера показана синим цветом, однако при печати центромеры оказались не выделены синим.

В подписи к рис. 16 указано, что на фотографиях приведены синаптонемные комплексы половых бивалентов двух видов анолисов, однако на рисунке нет специальных указаний, где какой вид.

В таблице 1 приведены данные только по синаптонемным комплексам макрохромосом анолисов, а в тексте обсуждаются и значения для средних и малых хромосом со ссылкой на таблицу 1 (с. 63, первый абзац).

Биномиальные видовые названия и названия рода не всегда выделены курсивом (с. 2 строка 33; с. 3 строка 4, строка 10; с. 50 строка 3; с. 66 строка 2; с. 74 строка 3).

На взгляд рецензента, список сокращений был бы не лишним, хотя по ходу изложения все аббревиатуры расшифрованы. Небрежностей орфографии, пунктуации рецензент не выявил. Обнаружена смысловая опечатка на с. 47, последняя строчка, где вместо слова «дегидратирование» присутствует «дегидрирование».

3. *Нарушения правил цитирования.* Есть неточности в порядке цитирования литературных источников (необходимо в хронологической, затем в алфавитной последовательности): с. 16 строка 10; с. 20 строка 2; с. 26 строка 2; с. 39 строка 9; с. 43 строка 5-6; с. 82 строка 18; с. 85 строка 20.

Отсутствует ссылка в тексте на с. 20 на исследования Н. Перрина.

Список литературы составлен аккуратно, однако есть неточности в порядке расположения источников в списке литературы: работы Campos-Ramos et al., 2002 и Campos-Ramos et al., 2001 (с. 98), Kawagoshi et al., 2014 Kawagoshi et al., 2012 (с. 102) следует поменять местами.

4. *Стилевые погрешности.* Неудачное предложение: «Иммунофлуоресцентный анализ синаптонемных комплексов является многообещающим методом анализа половых хромосом» (с. 5). Думаю, что он уже оправдал ожидания и за годы его использования опубликовано достаточное количество работ, чтобы признать этот метод адекватным.

Употребление термина «гетероморфизм» во множественном числе (с. 5, с. 22, с. 42), а также изобретение слова «пседогенизированный» от существительного «псевдоген» (с. 36) не кажется правильным.

С. 9 строка 2 – правильное название конференции, в которой участвовал диссертант, «22d International Colloquium on Animal Cytogenetics and Genomics» вместо приведенного «22d International Colloquium of Animal Cytogenetics and Gene Mapping».

Интересно построенная фраза «Когда Z-хромосома стала половой, она начала проводить в телах самцов в полтора раза больше времени, чем в телах самок» (с. 36) заставляет глубоко задуматься об эволюционном значении половых хромосом.

Заключение

В целом, отмеченные недочеты не снижают высокую значимость диссертационной работы для науки и практики.

Диссертационная работа Лисачева Артема Павловича представляет собой законченное исследование, основанное на привлечении достаточного фактического материала, собранного с высокой долей личного участия.

Считаю, что диссертационная работа полностью отвечает требованиям, установленным п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Лисачев Артем Павлович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент:

Научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кандидат биологических наук (03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология)
Тел. +7(812)3636105
e-mail: svetlana.galkina@spbu.ru

Светлана Анатольевна Галкина

05.06.2017

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д.7-9.
Тел: +7 (812) 328-20-00, эл.почта: spbu@spbu.ru, сайт: spbu.ru

Горюхиной Р.В.
урастовой

ЗАМЕСТИТЕЛЬ
УПРАВЛЕНИЯ
КАДРОВ
ГУОРП
ОС СУВОРОВА

05.06.2017