

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про дисертаційну роботу Півень Оксани Олександрівни
за темою «**Порушення експресії генів адгеринового комплексу у міокарді
як молекулярний механізм розвитку деяких патологій серця**»
на здобуття ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність теми дисертації.

За даними всесвітньої організації здоров'я найбільш поширеною групою захворювань, що призводить до госпіталізації та передчасної загибелі людей, серед неінфекційних хвороб є захворювання серцево-судинної системи. Зважаючи на важкі соціальні наслідки дослідження молекулярних механізмів розвитку захворювань серця, що є основним для розробки нових підходів до терапії, є надзвичайно важливим. Переважна більшість виявлених мутацій, що спричиняють розвиток різних патологій серцево-судинної системи локалізована у генах, що кодують білки міжклітинної адгезії: десмоколіни, десмоглеїни, плакоглобін та інше. Більшість робіт постулювала, що порушення саме міжклітинної адгезії внаслідок експресії мутантних форм білків, є основною причиною розвитку хвороб серця.

Автором було проведено дослідження впливу мутації генів (*Cdh1*, *Cttna1* та *Cttnb1*), що кодують білки міжклітинної адгезії (N-кадерин, α -катенін та β -катенін відповідно) із іншим концептуальним підходом, а саме із впливом їх нокауту на сигнально-регуляторні каскади в серці, а також розглянуто вплив делеції цих генів на кардіогенез, що робить дану дисертаційну роботу й актуальною, також із точки зору фундаментальної науки.

Загальна характеристика роботи. Дисертація побудована за традиційною схемою та складається із наступних розділів: вступу, огляду

літератури, матеріалів і методів дослідження, 3-х розділів результатів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел, який налічує 262 посилання (3 кирилицею і 296 латиною), додатків А, Б, В, Г та Д. Роботу ілюстровано 78 рисунками, 7 таблицями.

Представлений у Розділі 1 «Огляд літератури» літературний огляд демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора. Дисертантом розглянуто організацію основних комплексів міжклітинної адгезії в міокарді, причому будова адгеринових контактів була досліджена значно детальніше, оскільки продукти генів, нокаут яких досліджувався, є основними білками саме цього типу міжклітинних контактів. Детально охарактеризована участь білків кадгерин-катенінового комплексу в сигнальних каскадах клітини. Загалом, розділ характеризується повнотою викладення і фаховим аналізом існуючих на сьогодні уявлень про механізми міжклітинних контактів і сигналіngu в міокарді, що дозволило сформуувати комплексний погляд на можливі етіологічні фактори розвитку патології серцево-судинної системи і сформуувати найбільш актуальні завдання для їх вивчення. Варто зазначити, що більшість робіт, використаних автором для літературного огляду, були опубліковані протягом останніх п'яти років.

У Розділі 2 «Матеріали і методи» дисертант наводить вичерпний опис усіх методів, застосованих при проведенні дослідження. Для проведення дослідження автором використано широкий спектр класичних та сучасних методів: фізіологічні, гістологічні, молекулярно-біологічні та молекулярно-генетичні, цитологічні. Для обробки результатів експериментальних досліджень використано відповідні методи математичної статистики. Вибір застосованих автором методів дослідження є повністю обґрунтованим і дозволяє з високою довірою сприймати отримані результати і їх аналіз.

У Розділі 3 «Кадгерин-катеніновий комплекс у кардіогенезі та неонатальному серці» автор характеризує вплив нокаута генів *Cdh2*, *Cttna1* та

Ctnnb1 на процеси кардіогенезу на різних етапах ембріонального та постнатального розвитку.

Дисертантом вперше описано летальність кардіоспецифічного нокаута гена *Cdh2*, на ранніх етапах ембріогенезу (E 10.5), що спричинялось суттєвими вадами ембріону (порушення адгезії між кардіоміоцитами). Також встановила, що кардіоспецифічна делеція гена *Ctnnb1* спричиняє загибель гомозиготних мутантів на пізніх етапах ембріонального розвитку. Також встановила компенсаторне зростання експресії гена *Jup* (гомолог *Ctnnb1*), та зростання рівня його взаємодії із промоторами генів-мішеней β -катеніну. Що є свідченням участі плакоглобіну (продукт гена *Jup*) у канонічному Wnt-сигнальному шляху. Дисертантка також встановила, що й ген *Cttna1* залучений до регуляції дозрівання кардіоміоцитів та регуляції HIPPO-сигнального шляху у новонароджених кардіоміоцитах.

Таким чином, автор беззаперечно довела участь білків адгеринових контактів у кардіогенезі та термінальній диференціації неонатальних кардіоміоцитів внаслідок їхнього залучення до функціонування сигнальних каскадів.

У Розділі 4 «Дослідження ролі канонічного Wnt сигнального каскаду в розвитку та ремоделюванні міокарду» дисертантка дослідила дискусійне питання про значення Wnt/ β -катенінового сигнального каскаду для функціонування дорослого серця. Для цього було проведено систематичний огляд літератури та здійснений мета-аналіз із використанням статистичних методів, в ході якого виявлено, що активація β -катенінового сигналіну позитивно корелює із зростання маркерів гіпертрофії (SERCA, актин DIF, Axin-2, с-Мус, CD1, BNP, ANP) та призводить до розвитку гіпертрофії серця.

Для дослідження механізмів залучення β -катеніну до процесів розвитку гіпертрофічного ремоделювання серця дисертант використала мишей із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*. Нею встановлено, що у таких мишей відбувається зменшення розмірів серця, але зростає експресія фетальних генів.

При цьому знижується активність канонічного Wnt-сигналіngu, але активується Akt-сигналінг.

Також дисертантом проведено дослідження значення β -катеніну у розвитку патологічної та фізіологічної гіпертрофії серця. І нею вперше встановлено, що гіпертрофічні стимули та фізичне навантаження на ранніх етапах своєї дії активують Wnt-сигнальний каскад, а гетерозиготна делеція β -катеніну пригнічує розвиток фізіологічної гіпертрофії та супроводжується активацією Akt- та Erk1/2-сигналінгів.

У Розділі 5 «Вивчення функції α -Е-катеніну в розвитку та функціонуванні міокарду за умови нокауту гена *Cttnn1*» автор встановила, що α -Е-катенін критично необхідний для функціонування серця, оскільки як гетеро-, так і гомозиготна делеція призводить до передчасної загибелі мишей від серцевої недостатності.

Не менш цікавим є встановлення того, що α -Е-катенін в серці інгібує активність канонічного Wnt-сигнального шляху, оскільки у серцях мутантних тварин виявили значне зростання активної форми β -катеніну та активацію експресії генів-мішеней β -катеніну. Також дисертанткою встановлено інгібуючий вплив α -Е-катеніну і на HIPPO-сигнальний каскад.

Дисертантка описала й зміни в активності інших сигнальних каскадів в серці (PI3K, MAPK, PKA-сигнальні шляхи), що також розширює знання про участь α -Е-катеніну в цих каскадах. Також описано перепрограмування метаболізму серця при делеції α -Е-катеніну, а саме інгібування β -окислення жирних кислот та акумуляція нейтральних ліпідів в серці.

У Розділі 6 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» отримані автором експериментальні дані ретельно і фахово проаналізовані в контексті результатів, опублікованих іншими дослідниками. На підставі цього аналізу автором було запропоновано нову концепцію участі білків міжклітинної адгезії в кардіогенезі та постанатальному функціонуванні серці. Відповідно до цієї концепції, продукти генів *Cttnn1* та *Cttnb1* – α -Е-катенін та β -катенін

відповідно – залучаються до кардіогенезу не лише внаслідок забезпечення фізичної взаємодії між кардіоміоцитами, а виконують роль сигнальних молекул, оскільки нокаут цих двох генів супроводжується не лише змінами в активності численних сигнальних шляхів в кардіоміоцитах, а супроводжується порушеннями таких важливих процесів, як проліферація кардіоміоцитів та їх бінуклеація. Крім того, концепція описує можливий механізм залучення β -катеніну до розвитку фізіологічної гіпертрофії, а також пропонує новий механізм розвитку серцевої недостатності внаслідок делеції/мутації α -E-катеніну.

Висновки, зроблені здобувачем на підставі проведеного аналізу і узагальнення отриманих експериментальних даних, повністю відповідають поставленим завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках науково-дослідних проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, отриманих на конкурсних засадах: «Умовне видалення N-кадерину як модель для досліджень серцевої аритмії» (грант CRDF № UK-B2-2577-KV-04); «Розробка фундаментальних основ клітинної терапії патологій серця» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (номер державної реєстрації 7/2015, 2010-2014) та «Дослідження регуляторної функції β - та α -катеніну у вікових та патологічних перебудовах/реконструкціях дорослого міокарду для потреб персоналізованої медицини та розробки сучасних методів профілактики, діагностики захворювань та лікування хвороб серця людини» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (номер державної реєстрації 40/2015, 2015-2019), проектів у рамках угоди про наукове співробітництво між Національною академією наук України та Польською академією наук на 2015 – 2017 рр: «Значення β -катенінового сигналінгу у

метаболізмі серця та патологічній гіпертрофії лівого шлуночка» на 2018 – 2020 рр: «Сигнальна функція β -катеніну та α -Е-катеніну в регуляції метаболізму серця та патогенезі гіпертрофії лівого шлуночка», а також у рамках короткострокових стажувань в Інституті молекулярної та клітинної біології (Варшава, Польща) та Інституті дослідження легень і серця асоціації Макса Планка (Бад-Наухейм, Німеччина) за програмою EMBO Post-Doctoral Short –Term Fellowships (ASTF 518-2015 та ASTF 223.00-2011).

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертантом здійснено дослідження функції продуктів генів адгеринового комплексу під новим концептуальним поглядом, а саме в ракурсі їх участі у регуляції сигнально-регуляторних каскадів клітини. Вперше встановлено, що кардіоспецифічна делеція генів *Cdh*, та *Ctnnb1* призводить до ембріональної летальності, а делеція гена *Cttna1* – до розвитку серцевої недостатності та загибелі із віком.

Вперше встановлено, що нокаут гена *Cdh2* спричиняє порушення процесів кардіогенезу та загибелі ембріонів на ранніх етапах розвитку. Також встановлено, що гомозиготна делеція гена *Ctnnb1* призводить до летальності ембріонів на пізніх етапах кардіогенезу, тоді як гетерозиготна не має летального фенотипу, але пригнічує постнатальний ріст серця та пригнічує розвиток фізіологічної гіпертрофії, що супроводжується змінами в численних сигнальних каскадах кардіоміоцитів. Також встановлено, що патологічні (ангіотензин II) та фізичні (тренування) стимули призводять до активації канонічного Wnt-сигнального каскаду на ранніх етапах своєї дії. Вперше показано здатність плакоглобіну взаємодіяти із промоторами генів-мішеней β -катеніну (*Axin2*), і що ця взаємодія зростає при делеції β -катеніну, що свідчить про його сигнальну функцію.

Вперше показано, що α -Е-катенін інгібує сигнальну активність канонічного Wnt-сигнального шляху, а його нокаут спричиняє розвиток летальної кардіоміопатії та серцевої недостатності, що супроводжується перепрограмуванням метаболізму кардіоміоцитів.

Теоретичне значення одержаних результатів. Отримані дисертантом результати стали підґрунтям нового концептуального погляду на білки із подвійною функцією у міжклітинній адгезії та участі в сигнально-регуляторних каскадах клітини.

Дисертант розв'язала протиріччя, що існують у сучасній літературі стосовно участі β -катеніну у розвитку гіпертрофії серця, а саме встановила, що активація канонічного Wnt-сигнального шляху відбувається на ранніх етапах гіпертрофічного ремоделювання.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані свідчать про важливі функції генів адгеринового комплексу у кардіогенезі та функціонуванні серця. Дисертаційне дослідження містить ряд експериментальних даних, що можуть бути корисними і клініцистам для розуміння молекулярних механізмів розвитку та функціонування серця. Пояснюється зв'язок між певними генами (*Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1*) та порушеннями розвитку серця у ссавців на прикладі модельних тварин. Загалом отримані дані є досить актуальними і можуть бути використані при виявленні та інтерпретації впливу мутацій у структурі генів *Cttnb1* та *Cttna1* у пацієнтів із спадковою та набутою серцевою патологією.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації. Для вирішення поставлених завдань автор використовує оптимальний та достатній набір методів (молекулярно-біологічні, молекулярно-генетичні, гістологічні, фізіологічні та цитологічні). В залежності від даних, отриманих у експерименті, автор використовує релевантні статистичні методи для їхнього аналізу, що не залишає сумнів у їхній достовірності. Усі висновки обґрунтовані та зроблені виключно на отриманих експериментальних даних.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 25 статей у фахових виданнях та 15 тез доповідей.

Автореферат адекватно і повною мірою передає зміст дисертаційної роботи.

Загалом, дисертаційна робота Півень О.О. імпонує опоненту, але текст дисертації містить деякі технічні помилки, досить часто зустрічається сленг та прямий переклад термінів з англійської мови. Однак, технічні помилки та невдалі вирази не зменшують наукової цінності та актуальності роботи Півень О.О.

Для уточнення деяких положень, висунутих автором, хотілось би знати думку автора щодо наступного:

1. Чи не можуть бути зміни в активності РКА, МАРК, Акт-сигнальних каскадів у серцях мишей із гетерозиготною делецією α -Е-катеніну не специфічною відповіддю на порушення міжклітинної адгезії.
2. Чи доцільно говорити про проліферацію кардіоміоцитів при використанні лише МТТ-тесту. Можливо більш коректно буде використовувати поняття “виживаність”.
3. Чи достатньо експерименту із ко-імунопреципітацією для того щоб стверджувати про сигнальну роль плакоглобіну.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Півень Оксани Олександрівни за темою «Порушення експресії генів адгеринового комплексу у міокарді як молекулярний механізм розвитку деяких патологій серця» є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів дисертація повністю відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567, які пред'являються до докторських дисертацій, а автор заслуговує на присудження наукового

ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 - молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
Головний науковий співробітник
відділу генетичної діагностики
ДУ «Інститут генетичної та регенеративної
медицини НАМН України»,
доктор біологічних наук

Н.В.Ольхович

Підпис д.б.н. О.В.Ольхович



[Handwritten signature]

ДУ «ІГР НАМН»
ЧЕННИЙ СЕКРЕТАР

13.09 2019

[Handwritten signature]