

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **БАЛАЦЬКОГО Володимира Вікторовича** “Роль α -Е-катеніну у постнатальному розвитку серця”, подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю **03.00.22 – молекулярна генетика**

Актуальність теми. Поширеність серцево-судинних захворювань (ССЗ) та спричинена ними інвалідизація і летальність мають вагоме соціально-економічне значення. Дослідження участі окремих генів у розвитку та функціонуванні міокарда, ревізія функцій уже відомих генів та встановлення генів, мутації яких можуть спричинити розвиток ССЗ – один з важливих напрямків сучасної біології. Дисертаційна робота Балацького В.В. присвячена вивченню генів, що приймають участь у підтримці міжклітинної адгезії в міокарді та залучені до функціонування сигнальних каскадів, які є регуляторами як кардіогенезу, постнатального розвитку серця, так і розвитку патології міокарду. Зважаючи на те, що порушення активності цих генів може спричинити і порушення функції серця та бути причиною розвитку патології міокарду, а вплив на ці порушення може мати потенціальне терапевтичне значення, тему дисертаційної роботи варто вважати дуже актуальною як з наукової, так і з практичної зору.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Роботу виконано в рамках науково-дослідних проектів відділу генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, отриманих на конкурсних засадах трьох цільових комплексних міждисциплінарних програм наукових досліджень НАН України, а також двох проектів в рамках угоди про наукове співробітництво між національною академією наук України та Польською академією наук.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація побудована за загальноприйнятою схемою, складається зі вступу та 4 розділів (огляд літератури, матеріали та методи, результати досліджень, узагальнення та аналіз результатів), висновків та списку літератури, який налічує 175 посилань. Робота викладена на 149 сторінках машинописного тексту (з них 103 сторінок складає основна частина роботи) і містить 3 таблиці, 32 рисунки та 3 додатки.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Основні положення і висновки дисертаційної роботи повністю викладено в опублікованих працях здобувача, що налічують 11 наукових праць, з них 6 статей у фахових журналах та 5 тез доповідей. Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

Представлений у Розділі 1 літературний огляд демонструє належний рівень теоретичної підготовки автора. У роботі використано широкий набір сучасних методів клітинної і молекулярної біології і генетики, описаних у Розділі 2: : молекулярно-генетичні (виділення ДНК та РНК, ПЛР, ЗТ-ПЛР в реальному часі), молекулярно-біологічні (Вестерн-блот), гістологічні (гематоксилін-еозинове забарвлення, забарвлення акридиновим оранжевим, забарвлення пікрофуксином за ван Гізеном та забарвлення жиривим червоним О), методи клітинної біології (виділення первинних неонатальних кардіоміоцитів, МТТ-тест), фізіологічні методи (аналіз гемодинамічних показників міокарду) методи математичної статистики (тест Д'Агостіно-Пірсона, одно факторний дисперсійний аналіз із *post hoc* тестом Тукея та Холма-Сідака, тест Краскела-Уолліса із *post hoc* тестом Дана, лог-ранговий тест, метод Калан-Мейер).

Робота Балацького В.В. мала на меті дослідити сигнальну функцію α -Е-катеніну у дорослому міокарді за умови кардіоспецифічної гетерозиготної та гомозиготної делеції його гена. Отримані в ході роботи результати викладені у Розділі 3.

У результаті проведених досліджень автором було показано, що класичний компонент міжклітинної адгезії міокарду, α -Е-катенін, має комплексну функцію і залучений у контролювання активності кількох сигнальних каскадів. Ембріональна делеція цього гену у кардіоміоцитах спричиняє низку патологічних змін у дорослому міокарді.

Так, вперше було показано, що кардіоспецифічна делеція α -Е-катеніну призводить до розвитку серцевої недостатності та передчасної летальності дорослих тварин. Детальний гістопатологічний аналіз виявив суттєві порушення морфології міокарду у дорослих мишей з гетеро- та гомозиготною делецією α -Е-катеніну. А саме, спостерігалась низка ознак, що є типовими для дилатаційної кардіоміопатії та

серцевої недостатності: гіпереозинофільні та хвилясті кардіоміоцити, кардіоміоцити із вакуолізованими ядрами, значний замісний фіброз, що свідчить про загибель кардіоміоцитів; також спостерігалась інфільтрація лімфоцитами тканини міокарда, що свідчить про розвиток запальних процесів. Ці результати були також підтверджені даними кардіогемодинамічного дослідження функції серця у мишей з повною та частковою втратою гену α -E-катеніну. Автором було зроблено висновок, що саме серцева недостатність і є причиною зниження тривалості життя та передчасної летальності дослідних мишей.

Функція α -E-катеніну у міокарді вивчалась і іншими авторами, які не спостерігали прогресії описаної ними патології до серцевої недостатності та летальності мишей з втратою гену α -E-катеніну. Проте, відмінність їх результатів від роботи здобувача пояснюється, перш за все, ефективністю застосованої Cre-системи для нокауту гену α -E-катенін, яка не забезпечувала повної блокади експресії білка α -E-катеніну у серцях тварин. Тоді як Cre рекомбіназа під контролем промотора α MHC-Cre, яку використовував Балацький В.В. у своїй роботі, забезпечує повну рекомбінацію і делецію фланкованого loxP сайтами фрагменту гену. Тож варто зазначити, що ця робота є першою, де вплив повної делеції α -E-катеніну на функціонування дорослого серця детально вивчався. Крім того, у попередніх роботах розглядали α -E-катенін виключно як компонент міжклітинної адгезії і не фокусували свою увагу на його можливій сигнальній функції, а також не характеризували отриманий кардіальний фенотип на молекулярно-біологічному та біохімічному рівнях. Таким чином, отримані автором дані про те, що і часткова, і повна делеція α -E-катеніну у ембріональному серці спричиняє підвищення сигнальної активності канонічного WNT-сигнального шляху та Yap (основного медіатора Hippo-сигналінгу) у неонатальних та дорослих кардіоміоцитах є першими і мають важливе наукове значення.

Важливим доповненням авторських досліджень було виявлення активації експресії генів-мішеней у неонатальних кардіоміоцитах (*Ctgf*, *Tnfrsf1b*) та серцях дорослих мишей (*Aurka*, *Ctgf*, *Il1rl1* та *Tnfrsf1b*), що свідчить про активацію транскрипційної активності Yap у мишей із гетеро- і гомозиготною делецією α -E-катеніну. Аналіз експресії генів мішеней канонічного WNT-сигналінгу (*c-Myc* та *c-*

Fos) також вказував на активацію Wnt/ β -катенінового сигнального шляху у дорослому серці з гетеро- та гомозиготною делецією α -E-катеніну. Вочевидь, підвищення сигнальної активності двох принципових регуляторів проліферації та гіпертрофії, β -катеніну та *Yap* і є першопричиною розвитку описаного автором фенотипу, погіршення функції міокарду, серцевої недостатності та летальності мутантних тварин.

Окремої похвали заслуговує те, що автор не обмежився констатацією отриманих фактів, а проаналізував і синтезував цю інформацію, результатом чого стала представлена гіпотетична схема сигнальної функції α -E-катеніну в серці, яка враховує як вже відомі, так і отримані автором в своєму дослідженні дані про взаємодію регуляторів проліферації та гіпертрофії міокарду і їх місце у патологічному процесі формування серцевої недостатності.

Наукова новизна та теоретичне значення дослідження. Підсумовуючи сказане вище можна стверджувати, наукова і теоретична цінність роботи Балацького В.В. полягає в отриманні низки фундаментальних даних, які значно доповнюють та розширюють попередні знання про роль α -E-катеніну у функціонуванні післянатального міокарду та патогенезі серцевої недостатності. Автором було показано, що функція α -E-катеніну не обмежується лише адгезивною, цей білок має важливе сигнально-регуляторне значення у постнатальному розвитку серця та патогенезі серцевої недостатності. Отримані автором дані свідчать, що α -E-катенін виконує супресорну роль у контролюванні активності канонічного WNT-сигнального шляху та *Yap* як у неонатальних, так і дорослих кардіоміоцитах, а також PI3K/Akt- та MEK1-Erk1/2-сигнальних каскадів у дорослих тварин, порушення функції яких спричиняє розвиток серцевої недостатності та передчасну летальність. Крім того, автором було вперше виявлено порушення метаболізму ліпідів та їхнє накопичення у дорослих кардіоміоцитах в наслідок нокауту гену α -E-катеніну. Дуже важливим є те, що на підставі отриманих результатів було запропоновано молекулярно-генетичний механізм, що може призводити до формування та прогресування серцевої недостатності внаслідок мутації/пригнічення експресії α -E-катеніну.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані здобувачем дані про сигнальну функцію α -Е-катеніну та його роль у розвитку та патології міокарду вказують на те, що мутація цього гену у людей може бути причиною серцевої недостатності та ранньої летальності. Таким чином, наведені у дисертації результати і висновки знайдуть застосування не тільки в наукових дослідженнях патофізіології серця, а також і у практичних розробках з метою покращення діагностики і лікування серцево-судинних захворювань.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Результати, отримані автором, опрацьовані та обговорені з врахуванням даних сучасної літератури. **Бібліографічний список складається з 175 літературних джерел, переважна більшість з яких опублікована в останні десять років.** На достовірність отриманих результатів вказує використання **сучасних методів дослідження.** Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачем, аргументовані та логічно узагальнюють отримані результати. Тому **достовірність положень та висновків, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.**

Високо позитивно оцінюючи дану дисертаційну роботу слід зазначити деякі зауваження та побажання, які не впливають на достовірність положень та висновків, сформульованих у даній роботі:

1. зустрічаються помилки друку та не зовсім не коректні вирази, часто пов'язані з відсутністю різниці у позначенні назви білка та кодуючого його гена (напр. «сигнальна функція α -Е-катеніну», «делеція α -Е-катеніну» або «нокаут α -Е-катеніну»);
2. в тексті автореферату та в підписах до рисунків, що містяться в авторефераті, відсутня інформація про кількість тварин у досліджуваних групах, що ускладнює сприйняття результатів дослідження;

Крім того, в ході аналізу представленої дисертаційної роботи виникли наступні запитання:

1) Яким чином можна пояснити підвищений рівень проліферації неонатальних кардіоміоцитів із делецією α -Е-катеніну та розвиток серцевої недостатності у мишей із такою ж делецією з віком?

2) В огляді літератури та обговоренні дисертант згадує роботу Sheikh та ін., у якій автори також описують ефект кардіоспецифічної делеції альфа-Е-катеніну, тож у чому полягає відмінність моделей та отриманого фенотипу?

Незважаючи на наведені зауваження, загальна оцінка роботи є позитивною: в цілому дисертація демонструє належний рівень кваліфікації автора – володіння сучасними молекулярно-генетичними, молекулярно-біологічними, гістологічними, морфологічними методами, здатності аналізувати свої результати та узагальнювати їх.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які висуваються для отримання наукового ступеня кандидата біологічних наук. На основі проведеного аналізу дисертаційної роботи Балацького В.В. "Роль α -Е-катеніну у постнатальному розвитку серця", опублікованих праць, із врахуванням актуальності, новизни, наукової та практичної цінності розв'язуваної проблеми, обґрунтованості сформульованих наукових висновків та достовірності отриманих результатів, вважаю, що рецензована дисертаційна робота цілком відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата 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

Відгук г.б.н. Олександрівна
засвідчено.

ДУ «ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ»
Олександрівна
2018



В.В. Олександрівна