

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про дисертаційну роботу Балацького Володимира Вікторовича за темою «Роль α -Е-катеніну у постнатальному розвитку серця» на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність теми дисертації. Серцево-судинні захворювання є найбільшою групою захворювань, що призводять до передчасної смертності людей. Для розробки ефективної терапії серцевої недостатності критичним є розуміння молекулярно-генетичних механізмів її патогенезу. Нині виявлено велику кількість генів, мутації у яких призводять до розвитку серцевої недостатності у людей, а також змодельовано ефект даних мутацій у модельних тваринах (мишей). Переважна більшість генів, мутації яких призводять до розвитку серцевої недостатності, кодують білки, що залучені до утворення та підтримання міжклітинних контактів між кардіоміоцитами. Проте все одно залишається значний відсоток випадків серцевої недостатності та інших спадкових серцево-судинних захворювань для яких не з'ясовано факторів їхнього розвитку. Тому пошук нових генів-кандидатів із застосуванням модельних організмів, що спричиняють розвиток серцевих патологій та дослідження їхнього залучення до патогенезу серцевих хвороб є надзвичайно актуальним. Саме такому пошуку і присвячена робота Балацького В.В., у якій автор з'ясував вплив нокауту гену α -Е-катеніну на функціонування серця мишей та проаналізував сигнальні каскади активності, яких здатен модулювати α -Е-катенін.

Загальна характеристика роботи. Дисертація побудована за традиційною схемою складається із наступних розділів: вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів дослідження, їх узагальнення та аналізу отриманих результатів, висновків, списку літератури та додатків.

Роботу викладено на 149 сторінках, проілюстровано 32 малюнками та містить 3 таблиці. Список літератури налічує 175 посилань.

У Розділі 1 «Огляд літератури» дисертантом детально описано будову інтеркалярних дисків та комплексів міжклітинної адгезії які залучаються до їхнього утворення і значення α -Е-катеніну для утворення і підтримання структури адгеринових з'єднань. Розглянуто ізоформи α -катеніну та їхній патерн експресії у різних тканинах. Дисертант ретельно проаналізував наявну літературу щодо участі α -катеніну у модуляції активності чисельних сигнально-регуляторних каскадів, а також про можливу сигнальну функцію α -катеніну у серці.

У Розділі 2 «Матеріали і методи» дисертант наводить вичерпний опис усіх методів застосованих при проведенні дослідження. Автором використано гістологічні (забарвлення гематоксилін-еозином, за Ван Гізоном та жировим червоним), фізіологічні (аналіз кардіогемодинамічних параметрів), молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні (плр в реальному часі, вестерн-блот), цитологічні (виділення первинної культури неонатальних кардіоміоцитів, МТТ-тест, забарвлення акридиновим оранжевим) методи. Використано достатній та релевантний набір статистичних методів для аналізу отриманих даних.

У Розділі 3 «Результати досліджень» описано ефект кардіоспецифічного гетерозиготного та гомозиготного нокаута α -Е-катеніну на функцію серця. Так дисертантом було встановлено, що гетеро- та гомозиготна делеція α -Е-катеніну призводить до передчасної загибелі мишей внаслідок розвитку серцевої недостатності. Автор виявив критичні гістопатологічні зміни серця (ішемічне ушкодження, запалення, фіброзне заміщення кардіоміоцитів, накопичення нейтральних ліпідів у кардіоміоцитах). Також, виявлено зростання експресії гіпертрофічних генів. Грунтуючись на вищезгаданих даних дисертант робить правомірний висновок про розвиток серцевої недостатності у мутантних мишей обох генотипів.

Далі дисертант проаналізував активність сигнально-регуляторних каскадів (Wnt/ β -катеніновий та Hippo) каскадів, активність яких за гіпотезою автора може моделюватись α -E-катеніном. І дійсно, було виявлено активацію Wnt/ β -катенінового сигнального шляху у міокарді мутантних мишей (зниження вмісту аксину-1, зростання рівня інгібованої кінази глікогенсинтази 3 β та активного β -катеніну, а також зростання рівня експресії генів-мішеней β -катеніну). На користь припущення автора про інгібувальний вплив α -E-катеніну на канонічний Wnt-сигнальний каскад свідчить, той факт що у гомозигот активність каскаду була вищою порівняно із гетерозиготами. Також дисертант виявив зростання експресії генів-мішеней Yap.

Здобувачем було проаналізовано стан каскадів, які залучені до підтримки гомеостазу серця. Ним було виявлено активацію Akt-сигнального каскаду, інгібування PKA-сигналіну у міокарді мишей обох мутантних генотипів та інгібування Erk1/2-сигналіну у гетерозигот та його активації у гомозигот. Зважаючи на зміни у вищезгаданих каскадах автор робить обґрунтоване припущення щодо можливих змін у метаболізмі ліпідів та аналізує основні регулятори останнього. В результаті чого ним було встановлено інгібування бета-окислення жирних кислот, що призводить до накопичення жирів у серці.

Дисертантом також досліджено вплив делеції α -E-катеніну на проліферацію та термінальне диференціювання неонатальних кардіоміоцитів. Встановлено зростання їхньої проліферації та затримку дозрівання, за припущенням дисертанта внаслідок активації Wnt-та Yap-сигнальних шляхів.

У Розділі 4 «Узагальнення та обговорення отриманих даних» автор аналізує отримані дані у контексті опублікованих результатів інших дослідників. Також ним запропоновано новий механізм розвитку серцевої недостатності при делеції гена α -E-катеніну або зниженні рівня його експресії, що розширює сучасні дані стосовно патогенезу цієї хвороби.

Висновки, які робить здобувач відповідають та ґрунтуються на отриманих результатах.

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: «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 міокарда 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 в рамках угоди про наукове співробітництво між національною академією наук України та Польською академією наук на 2015 – 2017 рр: «Значення β -катенінового сигналіну у метаболізмі серця та патологічної гіпертрофії лівого шлуночка» та 2018-2020 рр: «Сигнальна функція β -катеніну та α -Е-катеніну у регуляції метаболізму серця та патогенезі гіпертрофії лівого шлуночка».

Наукова новизна одержаних результатів. Здобувачем встановлено, що функція α -Е-катеніну у серці не обмежується лише адгезивною, цей білок має важливе сигнально-регуляторне значення у постнатальному розвитку серця та патогенезі серцевої недостатності. Отримані дані свідчать, що α -Е-катенін виконує супресорну роль у контролюванні активності канонічного WNT-сигнального шляху та Υ ар як у неонатальних, так і дорослих кардіоміоцитах. Дисертантом встановлено, що делеція α -Е-катеніну призводить до комплексних змін у активності основних сигнально-регуляторних каскадів, що спричиняє

значні порушення метаболізму ліпідів у серці. Результуючим наслідком зазначених змін є розвиток серцевої недостатності, та як наслідок, передчасна загибель мутантних тварин.

Теоретичне значення одержаних результатів. Дисертантом отримано дані, які доповнюють та розширюють попередні знання про роль α -Е-катеніну у функціонуванні постнатального міокарду та патогенезі серцевої недостатності. А саме, показано що α -Е-катенін є супресором сигнальної активності канонічного WNT- та Yap , і порушення цієї функції спричиняє розвиток серцевої недостатності та передчасну летальність. Запропоновано новий молекулярно-генетичний механізм, що може призводити до розвитку та прогресування серцевої недостатності внаслідок мутації/пригнічення експресії α -Е-катеніну.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані про сигнальну функцію α -Е-катеніну у розвитку постнатального серця та патогенезі серцевої недостатності вказують на те, що мутаційна зміна цього гену у людей може бути причиною серцевої недостатності та ранньої летальності. Дана робота, незважаючи на свою фундаментальність, може бути використана для покращення діагностики та прогнозування перебігу серцево-судинних патологій. Тварини із кардіоспецифічної делецією α -Е-катеніну можуть бути використані як модель серцевої недостатності для проведення фізіологічних досліджень, а також для тестування потенційних лікарських засобів.

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

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, з них 6 статей у фахових журналах та 5 тез доповідей. Автореферат адекватно і повною мірою передає зміст дисертаційної роботи.

До дисертаційної роботи Балацького В. В. виникли наступні **зауваження і запитання:**

1. У тексті зустрічається ряд граматичних помилок та невдалих виразів (“кардіоміоцити експресують” ст. 37 замість “експресується в кардіоміоцитах”; “фенол-хлорофеноменного” ст. 53 замість “фенол-хлороформного” та ін.).
2. Тема дисертації сформульована як “Роль α -Е-катеніну у постнатальному розвитку серця” і сама робота дійсно присвячена з’ясуванню ролі α -Е-катеніну у постнатальному розвитку серця, але сам термін “постнатальний” рідко зустрічається у тексті дисертації.
3. Назви пунктів та підпунктів, а також деяких рисунків містять твердження, які за змістом є висновками.
4. Умовні скорочення у підписах до рисунків варто було розшифрувати при першому використанні та не наводити у наступних рисунках.
5. Підпис осі у на гістограмах результатів обрахунків Вестерн блоту та ПЛР в реальному часі “зміна рівня білка” та “зміна рівня мРНК” слід було наводити як “відносний рівень білка” та “відносний рівень мРНК” відповідно.
6. Чи не можуть зміни, які у дисертації пов’язуються із втратою сигнальної функції α -Е-катеніну, частково бути зумовлені порушенням міжклітинної адгезії між кардіоміоцитами?

7. І чи не є інгібування ліпідного катаболізму у серці мутантних мишей вторинним внаслідок розвитку серцевої недостатності?

Незважаючи на наведені зауваження загальна оцінка роботи є позитивною: в цілому дисертація демонструє належний рівень кваліфікації автора.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Балацького Володимира Вікторовича за темою «Роль α -Е-катеніну у постнатальному розвитку 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 кандидатських дисертацій, а автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 - молекулярна генетика.

Член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
завідувач відділу молекулярної
генетики бактеріофагів,
заступник директора з наукової роботи
Інституту мікробіології і
вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

Говкач **Говкач Ф.І.**



Говкач **Говкач Ф.І.**
Д.В.МАКАРЕЦЬ