

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**» подану на здобуття ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність теми дисертації. Поширеність серцево-судинних захворювань, високий ризик смертності спричинений хворобами серця у країнах світу та в Україні обумовлюють актуальність дослідження у галузі генетики, молекулярної біології, біохімії та патофізіології міокарду та серцево-судинної системи. Особливо цікавими є вивчення функції окремих генів та аналіз їх зв'язку із функціонуванням міокарду. Саме цій проблематиці і присвячено дисертаційну роботу Півень О.О. Із застосуванням тваринної моделі, що дає змогу вивчати та аналізувати роль деяких генів у серці на рівні організму, дисертантка зосередилась на дослідженні функції генів адгеринового комплексу: *Cdh2*, *Cttnb1* та *Cttna1*. Відомо, що продукти цих генів, білки N-кадгерин, β -катенін та α -катенін забезпечують адгезію кардіоміоцитів а також залучені до контролювання динаміки цитоскелету. Проте, цим функції цих білків не обмежуються, відомо, що β -катенін є основним транскрипційним ко-активатором канонічного Wnt -сигнального каскаду, а його цитоплазматичний партнер α -катенін, ймовірно приймає участь у регулюванні активності не лише Wnt -сигнального каскаду а й HIPPO сигнального каскаду. Проте функція генів *Cttnb1* та *Cttna1* з огляду на їхню участь у контролюванні сигналінгу клітин у серці лишалась майже не дослідженою.

Загальна характеристика роботи. Дисертація складається із традиційних 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. Результати досліджень добре проілюстровано, а саме 78 рисунками та 7 таблицями.

Розділі 1 «Огляд літератури» присвячено детальному аналізу сучасних літературних даних про будову інтеркалярних дисків та функції окремих білків і генів що їх кодують. Дисертантом проведено детальний аналіз зв'язку мутацій генів інтеркалярних дисків і деяких патологій міокарду у людей.

У Розділі 2 «Матеріали і методи» дисертантка надає детальний та повний перелік методів, що використовувались при проведенні дослідження. Загалом, у роботі використано низку гістологічних, фізіологічних, молекулярно-генетичних та біохімічних методів. Дослідження проводились із застосуванням модельних тварин: трансгенних мишей та мишей із умовним нокаутом досліджуваних генів. Такий методичний підхід дав змогу проаналізувати функцію генів *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* у серці на рівні органу та організму. Для аналізу отриманих даних дисертанткою було застосовано адекватний набір методів статистичної обробки.

Розділ 3 «*Кадгерин-катеніновий комплекс у кардіогенезі та неонатальному серці*» присвячено дослідженню ролі генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Ctnnb1* у кардіогенезі та формуванні серця новонароджених тварин. Дисертанткою було показано, що нокаут гена *Cdh2* та повна відсутність експресії його продукту - трансмембранного білка N-кадгерина спричиняє порушення розвитку серця ембріону та його летальність. На відміну від гена *Cdh2*, нокаут генів *Cttna1* та *Ctnnb1* не спричиняв затримку розвитку чи морфологічних порушень серця або ембріонів. Проте авторка виявила летальність тварин із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* на пізніх етапах ембріонального розвитку та після народження. Окрім того, було показано зміни активності канонічного Wnt сигнального каскаду у серцях новонароджених тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом досліджуваного гена. Також було доведено участь іншого білка адгеринового комплексу – аЕ-катеніну у регулюванні активності Wnt та НІРОО сигнального каскаду у кардіоміоцитах сердець новонароджених тварин. На

грунті власних даних, авторка робить цілком логічний висновок, що білки адгеринового комплексу α E-катенін та β -катенін, поміж іншого, важливі регулятори проліферації та розмірів кардіоміоцитів, частоти появи двоядерних клітин у неонатальному серці. Також вперше було виявлено участь γ -катеніну, гомолога β -катеніна, у регуляції активності канонічного Wnt-сигналіngu.

Розділ 4 «Дослідження ролі канонічного Wnt сигнального каскаду в розвитку та ремоделюванні міокарду» автором детально проаналізовано роль канонічного Wnt-каскаду у постнатальному міокарді та розвитку гіпертрофії. Із застосуванням Мета-аналізу виявлено зв'язок рівня експресії β -катеніну із гіпертрофічним ремоделюванням та деякими маркерами гіпертрофії. Виявлено найбільш достовірні маркери гіпертрофії міокарду: SERCA, актин DIF, Axin-2, c-Мус, CD1, BNP, ANP та індекс співвідношення білок/ДНК.

Детально охарактеризовано функцію гена *Cttnb1*, та канонічного Wnt-каскаду у формуванні постнатального серця та його адаптації до хронічної гіпертензії і тривалого фізичного навантаження. Показано, що сигнальна активність канонічного Wnt-каскаду є необхідною умовою для росту серця та формування гіпертрофічної відповіді. Гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* спричиняє не лише затримку гіпертрофічного росту серця а й пригнічення активності канонічного Wnt-каскаду та супроводжується підвищенням активності РіЗК/Akt, MAPK сигнальних каскадів.

Розділ 5 «Вивчення функції α -E-катеніну в розвитку та функціонуванні міокарду за умови нокауту гена *Cttna1*» присвячено дослідженню функції гена *Cttna1* та його продукт білка α E-катеніну у функціонуванні серця дорослих тварин. Авторкою виявлено летальність мишей із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttna1* у віці 11 місяців. Летальність тварин супроводжувалась гістопатологічними змінами тканини серця (ішемічне ушкодження, запалення, фіброзне заміщення кардіоміоцитів, накопичення нейтральних ліпідів у кардіоміоцитах), збільшенням маси серця та підвищенням експресії фетальних генів, що є типовими для серцевої недостатності. Окрім того, дисертантка

виявила сигнально-регуляторну функцію білка α E-катеніну і здатність його пригнічувати активність Wnt/ β -катенінового та HIPPO каскадів у тканині серця. Більше того, здобувачка детально проаналізувала стан інших сигнальних систем, що також важливі у підтриманні гомеостазу серця та його перебудов залучених до його перебудов. Було виявлено та описано не лише зміни активності PKA-сигналіну, Akt-сигнального каскаду та Erk1/2-сигналіну а й порушення метаболізму ліпідів у серцях із нокаутом досліджуваного гена.

У Розділі 6 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» проведено детальний та змістовний аналіз літературних та власних експериментальних даних. Дисертантка робить висновок про те, що у кардіогенезі після закладки першого та другого серцевих полів критичною є організації міжклітинних контактів і адгезії і порушення цього процесу внаслідок нокауту гена *Cdh2* є летальним. Адгезивна функція цитоплазматичних партнерів N-кадгерину - α E-катеніну та β -катеніну не є принциповою, проте порушення їхньої сигнально-регуляторної функції у серці може спричиняти молекулярно-генетичні патерни змін та, як наслідок, порушення росту, проліферації, визрівання кардіоміоцитів, рівнів експресії фетальних генів (ANP, BNP та β -MHC) та активності інших сигнальних систем важливих для функціонування міокарду (Wnt/ β -катенінового, HIPPO-, MAPK, PI3-кіназного сигналінгів).

Авторка детально аналізує функцію гена *Ctnnb1* та його продукту у гіпертрофії міокарду, зауважуючи, що транскрипційна активність β -катеніну є обов'язковою умовою перебудови серця, проте відбувається на ранніх етапах гіпертрофії.

Дисертанткою запропоновано ймовірний молекулярно-генетичний механізм розвитку серцевої недостатності в наслідок порушення експресії гена *Cttna1*, що ймовірно може відбуватися і у людей та потребує подальшого вивчення.

Дисертантка, ґрунтуючись на отримані дані, формулює гіпотезу, згідно якої порушення експресії генів *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* може бути першопричиною розвитку серцевих патологій та летальності.

Висновки, зроблені дисертанткою цілком відповідають отриманим результатам дослідженням, обґрунтовані та логічні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Одразу хочу зауважити, що робота виконувалась в рамках кількох науково-дослідних проектів керівником яких є і була дисертантка, окрім того дослідження проводились і у Інституті молекулярної та клітинної біології (Варшава, Польща) та Інституті дослідження легень і серця асоціації Макса Планка (Бад-Наухейм, Німеччина) у рамках стипендій отриманих дисертанткою від Європейської молекулярно-біологічної організації EMBO.

Дисертаційне дослідження 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 сигналіну 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. Дисертантка вперше показала що N-кадгерин має критичне значення для утворення та розвитку тканини серця у кардіогенезі, продемонструвавши, що нокаут гена *Cdh2* призводить до ембріональної смертності та супроводжується порушенням розвитку серця і структур голови. Показано важливе значення канонічного Wnt-сигналіngu у пізньому кардіогенезі та формуванні серця новонароджених тварин. Виявлено летальність мишей із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* продукт якого є транскрипційним ко-активатором Wnt-сигналіngu. З'ясовано роль канонічного Wnt-сигналіngu та β -катеніну у адаптації серця до впливу гіпертрофічних стимулів. Ідентифіковано сигнальну функції γ -катеніну, та показано його здатність регулювати активність канонічного Wnt сигналіngu (зв'язування із промоторами генів *Axin2* та *c-Myc*), що є надзвичайно цікавим і потребує подальшого дослідження.

Вперше виявлено супресорну функцію білка α - E-катеніну та показано що він пригнічує активність канонічного Wnt-сигналіngu. Уперше запропоновано механізм розвитку серцевої недостатності за умови порушення експресії гена що кодує α - E-катенін, детально охарактеризовано фенотип таких тварин.

Виявлено, що порушення регуляторної функції α -E-катеніну та β -катеніну спричиняє порушення термінального диференціювання кардоіміоцитів, розмірів клітин серця та темпу їхнього поділу.

Загалом на ґрунті власних даних дисертанткою запропоновано гіпотезу, про принципову роль генів адгеринового комплексу (*Cdh2*, *Ctnna1* та *Ctnnb1*) у розвитку та функціонуванні серця. Тож порушення експресії генів *Cdh2*, *Ctnna1*

та *Ctnnb1* можуть бути причиною летальності тварин за рахунок порушення адгезивної та регуляторної функції їхніх продуктів (N-кадгерину, α -Е-катеніну та β -катеніну відповідно).

Теоретичне значення одержаних результатів. Отримані дисертантом дані доповнюють та розширюють знання щодо кардіогенезу та особливостей функціонування серця, а власне висвітлюють роль генів адгеринового комплексу (*Cdh2*, *Cttna1* та *Ctnnb1*) у регулюванні зазначених процесів. Продемонстровано участь білків β -катеніну та α -катеніну у контролюванні розмірів кардіоміоцитів та їхньої проліферативної активності у серцях новонароджених тварин, більше того показано участь зазначених білків у модуляції канонічного Wnt- та NRPPO – сигнального каскадів у серці. Детально висвітлено функцію β -катеніну залежного сигналіну у гіпертрофії серця та розвитку післянатального міокарду. Продемонстровано критичну функцію гена *Cdh2* саме у формуванні серця під час ембріогенезу.

Практичне значення одержаних результатів. Незважаючи на фундаментальність роботи, результати дисертаційного дослідження Півень О.О. мають певну цінність і для практиків-клініцистів. Результати роботи не лише розширюють наше розуміння молекулярних механізмів розвитку серця та його патогенезу а й можуть бути використані при розробці нових підходів для діагностики та терапії.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації. При виконанні дослідження дисертантка ставить логічні завдання та застосовує адекватний і відповідний набір методів (молекулярно-біологічні, молекулярно-генетичні, гістологічні, фізіологічні та цитологічні) для їхнього вирішення. Отримані дані проаналізовані із застосуванням релевантних статистичних методів аналізу, що не викликає сумнів у їхній достовірності. Висновки зроблені дисертанткою обґрунтовані.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Матеріали дисертаційної роботи повною мірою висвітлені у 25 статтях у рекомендованих. Результати дослідження доповідалися на 15 міжнародних і вітчизняних конференціях.

Автореферат повністю передає зміст дисертаційної роботи.

Загалом, дисертаційна робота Півень О.О. викликає позитивне враження саме через застосування такої оригінальної тваринної моделі та комплексного підходу.

Проте, мушу зауважити, що текст дисертації містить деякі технічні помилки, а саме: «неонтактних» треба неонатальних, «у серцях ембріональних» - треба у серцях ембріонів; «новонародженого організму» написано разом; «з тої причини», вочевидь треба «з тієї причини». Також у тексті дисертації трапляються деякі невдалі вирази, наприклад: «фарбовані таким чином», правильніше сказати за поданою схемою чи згідно викладеної методики; «у серці експресується» - правильніше все ж таки «у клітинах серця експресується», «у ембріональних кардіоміоцитах», «ембріональні серця», «новонароджені серця» зрозуміло про що хоче сказати автор, проте це сленг, вочевидь правильно писати «у кардіоміоцитах виділених із сердець ембріонів», «у серцях ембріонів», «після зв'язування білка та рецептора», тоді як краще сказати «після зв'язування білка з рецептором» тощо. У тексті дисертації є багато невдалих або прямих перекладів термінів із англійської мови, а саме «негативного «фідбеку»», «вортексування», «ремодельовання» - краще говорити «перебудова міокарду» у контексті гіпертрофії, «кнокдаун» тощо.

У підписах до рисунків, що містять мікрофотографії, дисертант не завжди зазначає масштаб збільшення, або лінійку на мікрофотографіях, наприклад рисунки: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 та 3.6.

До дисертаційної роботи Півень О.О. є кілька зауважень принципового характеру, так наприклад мало би сенс частину даних, що наразі викладені у матеріалах та методах (рис. 2.3 та у додатку Г оформити у окремий розділ чи

підрозділ результатів дослідження: характеристика експериментальних моделей, чи підготовка моделей та характеристика і там навести і результати генотипувань і зміни рівнів експресії білків – продуктів досліджуваних генів.

Проте, помилки, вживання сленгу та невдалі вирази а також зауваження опонента не зменшують актуальності, наукової новизни та вагомості отриманих Півень О.О. результатів.

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

1. На вашу думку, чи може позначитись нокаут досліджуваних вами генів у кардіоміоцитах на стан судин та судинної системи загалом? Чому тварини гинуть після нокауту саме через 11 місяців життя?
2. Чи можна очікувати, що у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1* будуть розвиватися і порушення метаболізму серця? Чи проводили ви дослідження гемодинамічних показників у тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Cttnb1*?
3. Що за дивний “post hoc тест Тюкея” ви використали для розрахунків змін кардіодинаміки (Таб2), що показує достовірну різницю між середніми які мало відрізняються між собою та мають величезні похибки? Чому ви не взяли з дисертації в автореферат класичні показники скоротливої активності міокарду ($dp/dt \max$ та $dp/dt \min$), а взяли максимальний та мінімальний об’єми лівого шлуночку? Яку інформацію вони несуть?
4. Чому в запропонованій схемі механізмів розвитку серцевої недостатності при нокауті гена *Cttna1* не враховані процеси порушень кальцієвого обміну, процеси апоптозу та процеси розвитку фіброзу про що ви маєте власні дані?

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 закінченою та цілісною науковою працею. Рівень виконання роботи, актуальність та наукова новизна отриманих результатів дисертаційного дослідження 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.

Член-кореспондент НАН України,
 доктор медичних наук, професор, завідувач
 відділу фізіології кровообігу
 Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України
Сагач Вадим Федорович

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О.Богомольця
 НАН України
 Підпис В. Р. Сагач
 Засвідчую.
 Вчений секретар В.І. Порубігасюк