

## 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

Дисертаційна робота Півень Оксани Олександрівни присвячена вирішенню важливої проблеми молекулярної генетики - взаємозв'язку експресії генів адгеринового комплексу у міокарді з розвитком нормальної діяльності серця та проявами його патогенних станів.

**Актуальність теми дисертації.** Серцево-судинні захворювання входять до найбільш поширеної групи хвороб і призводять до передчасної смерті людей та їх інвалідизації. Тож поряд із розвитком методів терапії та діагностики хвороб серця важливим є розуміння молекулярно-генетичних механізмів виникнення патологій міокарду. Нині виявлено певні гени, мутації у яких мають пряме відношення до розвитку серцевої недостатності, аритмії, кардіоміопатії і таке інше. Застосування модельних тварин та умовного чи конститутивного нокауту дає змогу дослідити функції певних генів у виникненні та перебігу серцево-судинних захворювань. Переважна більшість генів, мутації яких пов'язані із хворобами серця, кодують білки, що залучені до утворення та підтримання структури інтеркалярних дисків: демосом, порових з'єднань та адгеринового комплексу. Білки адгеринового комплексу, як відомо, забезпечують сильну та сталу фізичну взаємодію між кардіоміоцитами; в першу чергу до них відносяться трансмембранний білок N-кадгерин та його цитоплазматичні партнери -  $\beta$ - та  $\alpha$ -катенін. Варто зауважити, що порушення організації інтеркалярних дисків досить часто спостерігається при патологіях міокарду. З огляду на залучення білків адгеринового комплексу і до контролю деяких сигнальних каскадів клітини, виникає потреба у більш детальному

дослідженні їхньої функції у розвитку та функціонування серця. Власне на такому аналізі і сфокусувала свою увагу дисертантка, а саме на з'ясуванні функції генів *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* та їхніх продуктів, білків: N-кадгерину,  $\beta$ -катеніну та  $\alpha$ -Е-катеніну відповідно в кардіогенезі та постнатальному серці.

**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.

У Розділі 1 «Огляд літератури» дисертантом детально описано будову інтеркалярних дисків та комплексів міжклітинної адгезії, а також значення генів *Cdh2*, *Ctnnb1* та *Cttna1* та їхніх продуктів, білків: N-кадгерину,  $\beta$ -катеніну та  $\alpha$ -Е-катеніну у утворенні та підтриманні міжклітинної адгезії. Досить детально розглянуту і участь зазначених білків у регулювання сигнальних каскадів клітин. В цій частині роботи дисертантом ретельно проаналізовано сучасну літературу щодо зв'язку мутацій генів інтеркалярних дисків та області композита і певних серцево-судинних патологій у людини.

У Розділі 2 «Матеріали і методи» дисертант наводить вичерпний опис усіх методів застосованих при проведенні дослідження. Автором використано широкий арсенал гістологічних (трихром-масонове забарвлення, забарвлення гематоксилін-еозином, за Ван Гізеном та жиривим червоним, імуногістологічне забарвлення), фізіологічних (аналіз кардіогемодинамічних параметрів), молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних (ПЛР в реальному часі, вестерн-блот), цитологічних (виділення первинної культури неонатальних кардіоміоцитів, МТТ-тест) методів. Застосовано достатній та релевантний набір статстичних методів для аналізу отриманих даних.

У Розділі 3 «Кадгерин-катеніновий комплекс у кардіогенезі та неонатальному серці» автор описує ефекти кардіоспецифічного нокаута генів *Cdh2*, *Ctnna1* та *Ctnnb1* на розвиток серця ембріонів та новонароджених тварин.

Так дисертантом було встановлено, що гомозиготний нокаут гена *Cdh2* в серці ембріонів спричиняє порушення розвитку серця, дезінтеграцію кардіоміоцитів, порушення розвитку структур голови та летальність ембріонів терміном гестації E10,5. Автор виявила летальність ембріонів на пізніх строках ембріонального розвитку та новонароджених тварин з гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* у кардіоміоцитах, який, крім того, супроводжувався порушеннями активності канонічного Wnt-каскаду. Так, було показано пригнічення його у серцях тварин із гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* і підвищення активності у серцях із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*. Про що свідчать зміни вмісту фосфорильованої форми GSK3 $\alpha/\beta$ . До того ж було виявлено підвищення експресії  $\gamma$ -катеніну на рівні білка та РНК у серцях новонароджених тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Ctnnb1*. Із застосуванням ChIP-3T-ПЛР аналізу показано, що  $\gamma$ -катенін здатен регулювати експресію деяких генів-мішеней канонічного Wnt-сигналіngu: *Axin*, *c-Myc* за умови гетерозиготного нокауту *Ctnnb1* в ембріональних кардіоміоцитах. Тож автором вперше показано участь  $\gamma$ -катеніну в регулюванні активності канонічного Wnt-сигналіngu у серцях новонароджених тварин з нокаутом *Ctnnb1*.

Автором також однозначно доведена участь продукту гена *Ctnna1* у регулюванні HIPPO-сигнального каскаду у кардіоміоцитах сердець новонароджених тварин. Загалом продемонстровано здатність продуктів генів *Ctnna1* та *Ctnnb1* - аЕ-катеніну та  $\beta$ -катеніну відповідно, регулювати розміри клітин неонатального серця, темпи проліферації, утворення двоядерних кардіоміоцитів та експресії фетальних генів (ANP, BNP та  $\beta$ -МНС). Усе разом це свідчить про участь аЕ-катеніну та  $\beta$ -катеніну у термінальній диференціації клітин серця та переході кардіоміоцитів на дорослу генетичну програму.

У Розділі 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  $\beta$ -катеніну із гіпертрофічним ремоделюванням та деякими маркерами гіпертрофії. Означено найбільш достовірні та відтворювані маркери гіпертрофії: SERCA, актин DIF, Axin-2,  $\alpha$ -Мус, CD1, BNP, ANP та індекс співвідношення білок/ДНК.

Із застосуванням гетерозиготного нокауту гена *Ctnnb1*, що кодує  $\beta$ -катенін, детально охарактеризовано функцію цього гена у формуванні постнатального міокарду. Показано, що нокаут гена *Ctnnb1* спричиняє затримку росту серця у тварин віком 1 та 3 місяці і асоційований із порушенням патернів експресії фетальних генів, що не супроводжується порушенням морфології серця. Також виявлено, що пригнічення активності канонічного Wnt-каскаду супроводжується підвищенням активності Pi3K/Akt, MAPK сигнальних каскадів.

Окрім того, встановлено, що канонічний Wnt-каскад принципово важливий для формування гіпертрофії міокарду як при змодульованій гіпертензії так і при тривалих фізичних навантаженнях. З'ясовано, що активація цього сигнального каскаду є необхідною умовою на ранніх стадіях розвитку гіпертрофії. За умови пригнічення цього сигнального каскаду у серцях дорослих тварин із гетерозиготним нокаутом гена *Ctnnb1* спостерігається затримка розвитку гіпертрофії при тривалих фізичних навантаженнях, що однак супроводжується підвищенням експресії фетальних генів та активності Pi3K/Akt, MAPK сигнальних каскадів.

У Розділі 5 «Вивчення функції  $\alpha$ -E-катеніну в розвитку та функціонуванні міокарду за умови нокауту гена *Cttnn1*» автор описує критичні гістопатологічні зміни серця (ішемічне ушкодження, запалення, фіброзне заміщення кардіоміоцитів, накопичення нейтральних ліпідів у кардіоміоцитах). Дисертант демонструє модуляцію активності Wnt/ $\beta$ -катеніновий та HIPPO

каскадів у тканині сердець тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1*. На основі достовірних даних гістопатологічних, фізіологічних, молекулярно-генетичних та біохімічних досліджень автор робить правомірний висновок щодо розвитку у тварин із гетеро- та гомозиготним нокаутом гена *Cttnn1* серцевої недостатності.

Здобувач детально проаналізувала стан каскадів, які залучені до підтримки гомеостазу серця. Нею було виявлено підвищення активності Акт-сигнального каскаду, інгібування РКА-сигналіngu у тканині серця тварин обох мутантних генотипів та інгібування Erk1/2-сигналіngu у гетерозигот та його активації у гомозигот. На основі вищезгаданих змін зроблено логічне припущення про можливе порушення метаболізму ліпідів. У результаті аналізу активності основних регуляторів метаболізму жирних кислот автором було показано пригнічення бета-окислення жирних кислот, що призводить до накопичення жирів у серці.

У Розділі 6 «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» отримані дані проаналізовані в контексті результатів, опублікованих іншими дослідниками. Автор робить висновок про те, що продукти генів *Cttnn1* та *Cttnnb1* - аЕ-катенін та  $\beta$ -катенін відповідно, не лише компоненти адгезії а й важливі регулятори розмірів клітин неонатального серця, темпу проліферації, утворення двоядерних кардіоміоцитів та експресії фетальних генів (ANP, BNP та  $\beta$ -МНС). І така складна функція цих білків забезпечується і їхньою участю у модуляції Wnt/ $\beta$ -катенінового та HIPPO каскадів у тканині сердець. Дисертант робить обґрунтований висновок про те, що транскрипційна активність  $\beta$ -катеніну є необхідною умовою для адаптації міокарду до тривалих фізичних навантажень та врегулювання активності інших сигнальних каскадів клітин (MAPK, P13-кіназного сигналінгів). Загалом, на ґрунті власних даних, автором було запропоновано ще один можливий молекулярно-генетичний механізм розвитку серцевої недостатності у разі порушення експресії гена *Cttnn1*, що розширює сучасні дані стосовно патогенезу цієї хвороби.

Висновки, які робить здобувач повністю 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: «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  $\beta$ - та  $\alpha$ -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  $\beta$ -катенінового сигналіну у метаболізмі серця та патологічній гіпертрофії лівого шлуночка» на 2018 – 2020 рр: «Сигнальна функція  $\beta$ -катеніну та  $\alpha$ 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 на ґрунті власних експериментальних даних запропоновано гіпотезу, згідно з якою гени адгеринового комплексу (*Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1*) мають критичне значення для

розвитку та функціонування серця. Пригнічення (або порушення) експресії генів *Cdh2*, *Cttna1* та *Cttnb1* спричиняють летальність та молекулярно-генетичні патерни змін міокарду піддослідних мишей за рахунок порушення адгезивної та регуляторної функції їхніх продуктів (N-кадгерину,  $\alpha$ -Е-катеніну та  $\beta$ -катеніну відповідно).

З використанням умовного нокауту гена *Cdh2* автором вперше показано, що N-кадгерин має критичне значення для формування серця в ембріогенезі, гомозиготний нокаут його гена спричиняє порушення формування тканини міокарду, затримку розвитку ембріону і призводить до летальності.

Доповнено і переглянуто роль канонічного Wnt-сигналіngu в кардіогенезі та розвитку міокарду та гіпертрофічному ремоделюванні серця дорослих тварин. Із застосуванням нокауту гена *Cttnb1* в ембріональних кардіоміоцитах було виявлено, що активність канонічного Wnt-каскаду є необхідною умовою для пізнього кардіогенезу (після E12,5) та формування постнатального міокарду (P1 – 3). Гомозиготна делеція гена *Cttnb1*, спричиняє не лише пригнічення активності канонічного Wnt-каскаду а й летальність пізніх ембріонів. Гетерозиготний нокаут гена *Cttnb1* призводить до порушення термінального диференціювання кардіоміоцитів, їхньої проліферативної активності, спричиняє молекулярно-генетичні та молекулярно-біологічні патерни змін у серцях дорослих тварин (пригнічення активності канонічного Wnt-, MEK1-Erk1/2-, PI3K/Akt-, сигнальних каскадів).

Уперше показано сигнальну функцію  $\gamma$ -катеніну, його здатність регулювати транскрипційну активність канонічного Wnt сигналіngu і утворювати комплекс  $\gamma$ -катенін/TCF/LEF/ДНК, регулюючи рівень експресії генів *Axin2* та *c-Myc* у серці.

Вперше показано, що продукт гена *Cttna1*,  $\alpha$ -Е-катенін пригнічує транскрипційну активність канонічного Wnt-сигналіngu в серцях новонароджених та дорослих тварин. Також, підтверджено участь  $\alpha$ -Е-катеніну в регуляції HIPPO сигнального каскаду. Показано, що порушення регуляторної

функції  $\alpha$ -Е-катеніну призводить до порушення термінального диференціювання кардоіміоцитів та їхньої проліферативної активності і збільшення маси серця в дорослих та новонароджених мишей. Уперше описано фенотип, характерний для серцевої недостатності, що призводив до передчасної летальності тварин і розвивався внаслідок нокауту гена *Cttnn1*.

**Теоретичне значення одержаних результатів.** Отримані дисертантом дані значно розширюють сучасні знання про роль генів адгеринового комплексу у кардіогенезі ссавців та функціонуванні серця дорослих тварин. Продемонстровано не лише адгезивну функцію продуктів досліджуваних генів а й участь у сигнальних каскадах клітини.

Поглиблено та доповнено роль канонічного Wnt-каскаду у формуванні ембріонального та післянатального серця. Деталізовано роль канонічного Wnt у гіпертрофічному ремоделюванні серця, що дає змогу вирішити деякі протиріччя, що існували у літературі.

**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*, *Cttnn1* та *Cttnb1*) та порушеннями розвитку серця у ссавців на прикладі модельних тварин. Загалом отримані дані є досить актуальними і можуть бути використані при пошуку та аналізу мутацій у структурі генів *Cttnb1* та *Cttnn1* у пацієнтів із спадковими серцевими патологіями.

**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 релевантний статистичний метод 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 саме комплексним підходом до вирішення наукових завдань. Автор демонструє багатофункціональність досліджених ним генів, продукти яких здатні виконувати не тільки адгезивну функцію, та бути задіяними у формуванні і підтриманні пластичності чи жорсткості цитоскелету, але й приймати безпосередню участь у сигнально-регуляторних каскадах клітини.

Однак, текст дисертації містить деякі технічні помилки, а саме: «механосентором», «до тепер» (написано окремо), рівню апоптозу (а треба рівня апоптоза); деякі невдалі вирази, наприклад: «білки мають приймають»; «на честь китайського слова - серце»; «аналогічно до структури АК, до структури десмосом також входять»; «є необхідним», коли краще сказати просто – необхідний; «на пізніх термінах гестації»; «у мутантних серцях» або «новонароджених серцях», коли правильніше «у серцях новонароджених тварин», «у серцях мутантних тварин»; «ген-інтересу» коли доречніше писати таргетний ген, чи досліджуваний ген або ген-мішень; «широко поширена».

В списку умовних скорочень, дисертант подає скорочення англійською мовою як то: SCD, SHF та FHF і пояснення українською мовою, при цьому не наводить пояснення англійською мовою; і навпаки, APC, BMP, UTR наводить розшифрування скорочень тільки англійською мовою, без перекладу на українську; також не варто було б пояснювати загальноприйняте скорочення «ДНК».

У рукописі дисертації досить часто зустрічається сленг та прямий переклад термінів з англійської мови: «секвеструє», «кнокдаун», «вортексували» та інші. При описі методик, після скорочення «година» чи «хвилина» стоять крапки, тоді коли - це загальноприйняті скорочення без крапок. Окрім того, дисертант вживає у тексті багато власних скорочень у тому числі і у назвах розділів та підрозділів, коли у таких випадках правильно вживати повні назви: адгериновий комплекс, інтеркалярні диски, а не АК та ІД тощо.

Також, у підписах до рисунків зазначається якими статистичними методами користувались, проте ці методи повною мірою, тож достатньо було зазначити методи один раз із приміткою номерів рисунків де вони застосовувались. У підписах до рисунків, що містять мікрофотографії, дисертант пише, що це «імуногістохімічний аналіз» або «морфологічний аналіз» (рисунки 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 4.2 і так далі) тоді як вірно було б - «мікрофотографії зрізів парафінових препаратів». У тексті дисертант вживає повні назви латиною деяких модельних об'єктів, наприклад *Xenopus leavis* та *Drosophila melanogaster* тоді як варто після першого згадування в тексті вживати скорочення - перша літера родової назви з крапкою і повна видова назва.

До дисертаційної роботи Півень О.О. є кілька зауважень принципового характеру, по-перше: дисертант кілька разів у тексті наголошує, що «серце це перший орган що формується у ембріогенезі і працює усе життя», тоді як серце не є першим органом що формується під час ембріонального розвитку; по-друге: у розділі Матеріали та методи не вірно зазначені деякі хімічні речовини: у підрозділі 2.1.2 Реактиви написано «EDTA<sub>2</sub>Na» тоді як правильно писати «Na<sub>2</sub>EDTA», у підрозділі 2.15, написано 5мМ «EDTA» а треба «Na<sub>2</sub>EDTA», при описі методики фарбування зразків тканини X-gal наведена речовина – «деоксихолат», а повна назва «деоксихолат натрію»; по-третє: у вступі дисертант пише – про поширення ССЗ – «в Україні фактично склалася епідеміологічна ситуація», тоді як термін «епідемія» стосується інфекційних

захворювань. І останнє, на рисунках 3.18 та 3.19 не зазначено у яких одиницях виражено рівень збагачення при ПЛР аналізі результатів хроматинової імунопреципітації.

Однак, технічні помилки, невдалі вирази та наведені зауваження 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 доцільно було б застосовувати у роботі подвійний нокаут генів *Ctnnb1* та *Ctnna1* (або комбінації інших генів) у кардіоміоцитах серця ембріона для однозначного з'ясування деяких складних процесів того ж сигналінгу?
2. Чому робота виконувалась виключно із застосуванням самців мишей різних ліній? Чи було принциповим положенням не використовувати самок?
3. Чи була проаналізована можлива участь  $\gamma$ -катеніну у контролюванні активності канонічного Wnt-каскаду у досліджувані вами терміни ембріогенезу (E10,5; E12,5 та E14,5) у серцях з нокаутом гена *Ctnnb1*?
4. Чи не може бути однією з причин летальності ембріонів з нокаутом гена *Cdh2* порушення активності канонічного Wnt-каскаду, оскільки ви спостерігали у своїй роботі зменшення експресії у зразках сердець ембріонів основного медіатора цього сигналінгу –  $\beta$ -катеніну?
5. Чому в роботі не зазначено вплив на прояв ключових генів генів-двійників, або паралогів? Чи виражаються дані зміни через сплайсинг?

6. Питання стосовно результатів аналізу проліферативної активності клітин за умови гетерозиготного та гомозиготного нокауту гена  $\beta$ -катеніну порівняно із контролем (рис. 3.8.a) незважаючи на повний нокаут гена  $\beta$ -катеніну, ви все одно спостерігаєте незначну (слідову) кількість клітин, чим ви це поясните?

**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.

Член-кореспондент НАН України,  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
завідувач відділу молекулярної генетики бактеріофагів,  
заступник директора

**Товкач Федір Іванович**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного  
НАН України

*Григорук*

