

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Гончарова Сергія Вікторовича

«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕННЯ ПРОТЕАСОМНОГО ПРОТЕОЛІЗУ ПРИ АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ ТА ПІДХОДИ ДО ЇЇ КОРЕКЦІЇ»,

що подана до спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології імені
О.О. Богомольця для здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за
спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Актуальність теми дисертаційної роботи

Дисертація Сергія Гончарова «Молекулярно-генетичні порушення протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та підходи до її корекції», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук, спрямована на дослідження механізмів змін протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та корекції останньої за допомогою кверцетину.

Україна посідає перше місце серед країн Європи за смертністю населення від серцево-судинних захворювань, серед яких значне місце займає артеріальна гіпертензія, що спостерігається майже у 30% дорослих мешканців та навіть у дітей (від 14,8 до 16,3%). У механізмах розвитку АГ важливе значення мають процеси синтезу та вчасної утилізації протеїнів як в клітинах судинної стінки, так і серця. Такою внутрішньоклітинною системою деградації зношених протеїнів є убіквітинзалежний протеасомний протеоліз, за рахунок якого руйнується до 90% внутрішньоклітинних протеїнів.

Вперше на сучасному методичному рівні отримано дані про розподіл різних алельних варіантів промотору гену PSMA6 та генів, що кодують субдиниці імунпротеасоми (LMP2 та LMP7) у дітей з первинною артеріальною гіпертензією в українській популяції. Показано, що розподіл алельних варіантів PSMA6 та LMP2 у нормо- та гіпертензивних осіб має суттєві відмінності. Вперше доведено, що в аорті і серці шурів переважає експресія мРНК субдиниць імунпротеасом, а при АГ експресія генів, що кодують конститутивні та регуляторні субдиниці протесом

у нормо- та гіпертензивних щурів суттєво розрізняються. Доведено, що біофлавоноїд кверцетин, який є інгібітором протеасом, забезпечує суттєве зниження артеріального тиску у щурів з генетично детермінованою гіпертензією, впливаючи як на експресію низки субодиниць протеасом, так і на протеолітичну активність останніх.

Сукупність наведених результатів дозволяє охарактеризувати їх як такі, що є новими. У зв'язку з цим можна з упевненістю сказати, що ця дисертаційна робота є актуальним дослідженням, присвяченим важливій науковій проблемі – ролі протеасом в патогенезі патологічних змін в ефекторних елементах серцево-судинної системи при розвитку артеріальної гіпертензії.

Зв'язок теми дисертації з державними галузевими науковими програмами

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення молекулярно-генетичних механізмів розвитку ішемії-реперфузії та розробка нових методів генотерапії інфаркту міокарда» (№ держреєстрації 0107U005336), «Дослідження ендогенних, молекулярно-генетичних механізмів ушкодження та цитопротекції при ішемічній патології» (№ держреєстрації 0107U005323), «Вивчення механізмів розвитку серцево-судинної патології за допомогою багаторівневих досліджень: від поліморфізму та експресії генів до патофізіологічних проявів» (№ держреєстрації 0107U005336).

Обґрунтованість положень, висновків, рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність і новизна, повнота викладення в опублікованих роботах

Дисертаційна робота С.В. Гончарова є повноцінною науковою завершеною працею. Дисертація характеризується самостійністю у підходах до висвітлення проблеми, ґрунтовною практичною перевіркою отриманих результатів, їх суттєвою теоретичною і практичною значущістю. Автор детально проаналізував сучасний стан проблеми, опрацювавши близько 100 літературних джерел. Було сформульовано проблематику з досліджень ролі протеасомного протеолізу у

молекулярному механізмі розвитку артеріальної гіпертензії, поставлено мету і завдання. Для виконання поставлених задач, автором було використано сучасні методики, що дозволили отримати дані на кількох рівнях: молекулярному, клітинному, органному. Використано коректні методи статистичної обробки даних, що дало можливість сформулювати адекватні висновки стосовно ролі протеасомного протеолізу у розвитку артеріальної гіпертензії, що була викликана різними чинниками в динаміці експерименту у щурів ліній Wistar та SHR.

Винесені на захист положення ґрунтуються на аналізі матеріалів власних досліджень, володіють науковою новизною. Зокрема шукачем доведено, що в аорті і серці щурів переважає експресія мРНК субодиниць імунопротеасоми, а при артеріальній гіпертензії експресія генів, що кодують конститутивні та регуляторні субодиниці суттєво відрізнялась у нормо-та гіпертензивних щурів. Доведено також, що біофлавоноїд кверцетин, що є потенційним інгібітором протеасоми, достовірно знижує артеріальний тиск у щурів з генетично детермінованою гіпертензією, впливаючи як на експресію ряду субодиниць протеасоми, так і на протеолітичну активність останньої.

Матеріали дисертації опубліковано у 17 наукових працях, в тому числі у 8 статтях у наукових журналах, а також у 9 тезах доповідей (в тому числі 5 представлених на зарубіжних конференціях). Таким чином, положення, що виносяться на захист, володіють новизною, достовірністю і в повній мірі представлені в наукових публікаціях.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Проведені дослідження обґрунтували висновок про істотне значення генетичних факторів (однонуклеотидних замін) у генах, що кодують субодиниці протеасом, в етіології артеріальної гіпертензії. Це дозволяє застосувати генотипування за цими сайтами з метою оцінки ризику виникнення вказаної патології. Експериментальні дослідження на щурах зі спонтанною гіпертензією дозволили встановити особливості експресії генів, що кодують різні субодиниці протеасом, та вперше вказати на більше значення імунопротеасом у порівнянні з конституційними протеасомами у тканинах аорти та серця. Застосування інгібітору протеасом кверцетину в експерименті на SHR дозволило показати його

ефективність як антигіпертензивного засобу при експериментальній терапії і створило експериментальну базу для можливого розширення показань для застосування цього кардіо- та ангіопротектора у клініці при лікуванні артеріальної гіпертензії.

Оцінка змісту дисертації, її завершеності, ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації

Дисертаційна робота Гончарова С.В. оформлена відповідно до «Основних вимог до дисертацій та авторефератів дисертацій» ДАК України. Дисертація складається зі вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення), висновків та списку використаних джерел (93 найменувань). Робота викладена на 166 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 43 рисунками.

У вступній частині надано: обґрунтування актуальності дисертації; зв'язок роботи з науковими темами відділу; формулювання мети та завдань дослідження; визначення об'єкту, предмету і перелік використаних методів дослідження зі стислою конкретизацією необхідності їх застосування; наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення; особистий внесок здобувача; перелік наукових форумів, де були апробовані основні положення роботи; перелік публікацій дисертанта за матеріалами дисертації; також поряд з описом сучасного стану і актуальності вирішуваних питань автор чітко окреслює мету та п'ять завдань своєї роботи.

Огляд літератури даної дисертації є інформативним, повним і достатньо добре викладеним.

У розділі 2 «*Матеріали і методи дослідження*» ретельно описані методики з характеристикою досліджуваних показників. Комплекс методів, за допомогою яких вирішувались поставлені завдання, був спрямований на з'ясування ролі протеасомного протеолізу при розвитку артеріальної гіпертензії на моделі щура з генетично-детермінованою гіпертензією. Визначення параметрів кардіодинамічних показників *in vivo* проводили за допомогою мікро катетера для реєстрації тиску-об'єму (Millar Instruments). Також були використані морфометричні, морфологічні

та електронно-мікроскопічні методи дослідження; виділення РНК з тканин серця та аорти; зворотна транскрипція та полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі; виділення ДНК з букального епітелію та цільної крові дітей та підлітків з подальшим визначенням поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми. Обрані методики є адекватними, сучасними і охоплюють різні функціональні рівні, а дані отримані за їх допомогою доповнюють і пояснюють одне одного.

У *третьому розділі* дисертації наводяться данні щодо розподілу алельних варіантів поліморфізмів генів LMP2, LMP7 та PSMA6 у контрольної групи дітей та дітей зі спонтанною гіпертензією.

У *четвертому розділі* дисертації, автором було представлено результати власних досліджень, щодо поліморфізму генів, що кодують субодиниці протеасоми у дітей з первинною артеріальною гіпертензією та здорових дітей. Містить результати, що присвячені дослідженню змін кардіогемодинаміки, морфології серця щурів лінії Wistar та SHR. Визначено рівні експресії генів PSMB1, PSMB2, PSMB5, PSMB8, PSMB9, PSMB10, PSME1, PSMC1 у тканинах серця та аорти. Також було визначено активності протеасоми у тканинах серця та аорти у досліджуваних груп тварин.

У *п'ятому розділі* проведено аналіз і обговорення отриманих результатів дослідження, що дозволило зробити аргументовані висновки, які чітко сформульовані і повністю відповідають меті та завданням дисертаційної роботи та відображають основні результати роботи.

Дисертація викладена у відповідності з логікою наукової роботи. Мова і стиль викладення матеріалів дисертації відповідають вимогам, що пред'являються до дисертацій. Викладення матеріалу дозволяє засвоїти основні положення дисертації.

Питання та зауваження, що виникли при ознайомленні з дисертацією

Принципових зауважень до змісту й оформлення дисертації, які могли б вплинути на загальну позитивну оцінку роботи немає. Однак виникли наступні запитання та зауваження:

1. Відомо, що однією з ключових ланок патогенезу АГ є порушення функції ендотелію. Яким чином збільшення активності протеасом може призводити до дисфункції ендотелію? Можливо активність протеасом як

прибиральників клітини збільшується лише з тієї причини, що в ендотеліоцитах через порушення функції (не пов'язаної з протеасомами) накопичуються продукти обміну? Або ж ці процеси не пов'язані між собою і йдуть паралельно? Очевидно, пов'язані якимось чином, так як відомо, що інгібітори протеасом покращують функцію ендотелію.

2. Відомо, що кверцетин у різних фармацевтичних модифікаціях ефективно відновлює функцію ендотеліоцитів, порушену при артеріальній гіпертензії та оксидативному стресі. Яка роль протеасом у цьому процесі? Яким чином вони можуть впливати, наприклад, на відновлення ацетилхолін-індукованого розслаблення судин при гіпертензії?
3. З чим пов'язане збільшення активності протеасом при АГ? Зважаючи на мультикомплексність дії протеасоми, ви, дійсно, вважаєте, що інгібітори протеасоми є перспективними фармпрепаратами?
4. Які саме докази впливу порушень протеасомного протеолізу в аорті та серці на їх функцію ви отримали? Я маю на увазі не зміни експресії та активності генів, а саме результати, наслідки цих змін.
5. Під впливом кверцетину рівень експресії мРНК генів, що кодують субодиниці протеасом, змінюється в аорті гіпертензивних щурів у рази (від 5 до 20 разів), а рівень артеріального тиску змінюється при цьому зовсім незначним чином. Тобто між ними начебто немає кореляції? «Слідом за тим» або «разом з тим» не завжди означає «внаслідок того». Чому не вимірювали вплив кверцетину на аналогічні рівні експресії мРНК у здорових щурів?
6. Що Ви вкладаєте у поняття «есенціальна» гіпертензія? Група хворих на АГ підлітків була абсолютно однорідною?
7. Кверцетин – це хімічна сполука, що володіє мультифункціональною активністю. Це засіб для гальмування медіаторів запалення, імуномодулятор, антиоксидант (у високих концентраціях прооксидант), інгібітор ліпооксигеназ і пероксидаз, засіб для лікування алергічних реакцій і навіть блокатор протеїнкінази С. Яка його роль в процентному або порівняльному відношенні як інгібітора протеасом?

8. Наскільки специфічний кверцетин, як інгібітор протеасом, у порівнянні з іншими інгібіторами? Він погано розчинний у воді, не відрізняється гарною біодоступністю і відноситься до 3 групи токсичності (LD50 -161 мг\кг при оральному введенні), тобто не зовсім безпечний. Чому ви рекомендуєте його для тривалого терапевтичного використання (адже АГ лікується все життя)?
9. Відомо, що для того щоб білок-мішень розщепився протеасомою, він має бути позначений шляхом приєднання до нього білка убіквітину. Реакція приєднання убіквітину каталізується ферментами убіквітин-лігазами. Внаслідок чого до білка виявляється приєднаним поліубіквітиновий ланцюг, який зв'язується з протеасомою і забезпечує далі розщеплення білка-мішені. На що, на вашу думку, діє кверцетин? Безпосередньо на протеасому або ж на систему убіквітин-залежної деградації білка.
10. Яким чином блокада активності протеасом – так званого сміттєспалювального заводу клітини – може призводити до нормалізації артеріального тиску?
11. При написанні символів генів та їх продуктів слід враховувати вимоги міжнародних номенклатурних комітетів, таких як NGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). Згідно положень номенклатурного комітету з геному щурів Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat назви генів пишуться курсивом, починаючи із великої літери, а назви білків пишуться великими прямими літерами.

Поставлені запитання не впливають на загальну позитивну оцінку роботи та не зменшують її наукової цінності.

Висновок:

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значущістю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота

Гончарова Сергія Вікторовича «Молекулярно-генетичні механізми порушення протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та підходи до її корекції» відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор Гончаров Сергій Вікторович заслуговує присудження наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія.

Офіційний опонент

Доктор медичних наук, професор

Завідувач відділу фармакології клітинних

сигнальних систем та експериментальної терапії

ДУ «Інституту фармакології та

токсикології НАМН України»

Соловйов Анатолій Іванович

Підпис засвідчую, вчений секретар, к.м.н.



Хавич О.О.