

14 січ 2019

78/03-07 № 20

ВІДГУК

офиційного опонента доктора біологічних наук, професора Варбанець Людмила Дмитрівна на дисертаційну роботу **ЖЕРНОСЕКОВА Дмитра Даниловича "Поліфункціональна роль адгезивних протеїнів у міжклітинних контактах тканин ссавців в онтогенезі та за патологічних станів"**, представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, галузь знань 091 - біологія

Розвиток будь-якого багатоклітинного організму неможливий без динамічної та врегульованої міжклітинної адгезії, яка відіграє принципову роль в регуляції таких життєво важливих біологічних процесів, як міграція нейронів, проліферація і диференціація тканин, генна експресія, сигнальна трансдукція та морфогенез. Ключову роль в міжклітинних взаємодіях відіграють адгезивні протеїни, яких на сьогодні ідентифіковано багато, а саме представники родин імуноглобулінів, кадгеринів, селектинів, інтегринів, які характеризуються різною функціональністю. Одержані на сьогодні дані щодо структурно-функціональних досліджень адгезивних протеїнів сприяли формуванню сучасних уявлень щодо просторово-функціональної організації клітинного мікрооточення як складнішої надмолекулярної структури міжклітинного простору, яка визначає цитоархітектонікуожної тканини. Але незаважаючи на значний прогрес, який був досягнутий в цій області клітинної біології, не можна стверджувати, що процес дослідження будови і функції міжклітинного простору вже повністю досліджений. В цьому аспекті ідентифікація нових протеїнів адгезії або встановлення особливостей структури і функції раніше досліджених протеїнів адгезії і на сьогодні продовжує залишатись **однією з актуальних проблем сучасної біології клітини.** Особливо це важливо при дослідженнях змін, що відбуваються в організмі протягом розвитку, зокрема при старінні, коли експресія адгезивних протеїнів або зовсім не відбувається, або значно зменшується, та змін, що мають місце при різних патологічних станах.

Тому дисертаційна робота Д.Д. Жерносекова, присвячена виявленню особливостей адгезивних зв'язків у клітинах ссавців, що забезпечуються

представниками різних родин адгезивних протеїнів, в онтогенезі та за патологічних станів є **актуальною** не тільки з фундаментальної точки зору, але й відкриває можливості вирішення деяких практичних задач медицини, пов'язаних з порушенням експресії певних класів протеїнів адгезії при деяких патологічних станах зокрема при шизофренії, а також щодо участі протеїнів кадгеринового типу у механізмі розвитку порушень функцій міокарда, у формуванні таких складних функцій мозку як пам'ять та навчання. Дослідження такого напрямку привертають до себе увагу фахівців як з науково-теоретичної, так і практичної точки зору.

Про це свідчить те, що дисертаційна робота виконувалася протягом 1991-2006 рр у рамках тематичних планів кафедри біохімії Дніпровського університета ім. О. Гончара Міністерства освіти України у рамках бюджетних наукових тем: №40-94, № ДР 095U014532 «Дослідження нервово специфічних білків у нормі та за наявності факторів ризику з ціллю розробки методів діагностики патологічних станів дітей» та №02-20-97, № ДР 0197U000653 «Фундаментальні дослідження впливу синергічної дії екопатогенних чинників та наукове обґрунтування нових комплексних методів діагностики, корекції та профілактики порушень стану здоров'я населення». Експериментальна частина роботи в період 2006-2017 рр виконувалася згідно з бюджетною науковою тематикою відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім.О.В. Палладіна НАН України в рамках бюджетних наукових тем «Структурно-функціональний аналіз білків за норми та деяких патологій» (№ ДР 0107U007187, 2007-2011 рр.), «Молекулярні механізми функціонування ферментів системи гемостазу» (№ДР 0110U002701, 2010-2012 рр.), «Розробка діагностикумів для тестування стану системи руйнування тромбів» (№ ДР 0113U003649, 2013-2015 рр.), «Ангіостатини як ендогенні регулятори функціональної активності клітин» (№ ДР 0112U002624, 2012-2016 рр.), «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (№ ДР 0113U003203, 2013-2017 рр.).

Дисертація добре спланована, її мета і задачі сформульовані автором чітко і конкретно. Робота побудована традиційно, викладена логічно і доступно, а також вдало проілюстрована наочними матеріалами, які включають 75 рисунків та 5 таблиць. Вона налічує 319 сторінок друкованого тексту і складається із вступу, основної частини, що включає огляд літератури, експериментальну частину (2 розділи), заключення, висновки, список використаних літературних джерел, що містить 498 найменувань.

В огляді наукової літератури, який складається з семи підрозділів, наведено аналіз даних сучасної літератури щодо адгезивних молекул різних родин, зокрема 1) імуноглобулінів, які беруть участь в міжклітинній адгезії, відіграють важливу роль під час ембріогенезу, заживлення ран, імунної відповіді та формування пам'яті; 2) кадгеринів, які є кальцій-залежними протеїнами, що відповідають за гомофільні адгезивні контакти; 3) інтегринів – гетеродимерні молекул, які функціонують як клітинно-субстратні та міжклітинні адгезивні рецептори; 4) селектинів – адгезивних молекул, що мають у своєму складі лектин-подібний домен, який забезпечує адгезію лейкоцитів до ендотеліальних клітин. Дисертант наводить дані щодо їх структурно-функціональних особливостей. Особливу увагу Д.Д. Жерносеков приділяє плазміноген/плазміновій системі, яка забезпечує розчинення фібринових згустків та підтримує гемостатичний баланс крові, та її ролі во взаємодіях клітина-матрикс та міжклітинних взаємодіях

Огляд написано на високому професійному рівні з залученням сучасних посилань. Він свідчить про те, що Д.Д. Жерносеков не тільки добре орієнтується у наукових проблемах, які обговорюються в цьому розділі дисертації, але й може робити цікаві узагальнення відносно значення одержаних результатів для їх практичного застосування.

Експериментальна частина роботи, яка складається з двох розділів, присвячена вирішенню поставлених задач та обговоренню результатів проведеної роботи. Наведений в розділі «Матеріали та методи» перелік методів яскраво свідчить про те, що Д.Д. Жерносеков добре володіє та

вправно користується арсеналом сучасних біохімічних, фізико-хімічних, імунохімічних та статистично-математичних методів, необхідних для вирішення поставлених задач. Саме ця розмаїтість використаних методик і обумовила успішне виконання роботи і одержання важливих наукових результатів. Хочу відмітити, що всі використані дисертантом методи описані в роботі досить повно.

Робота є монолітною, її результати представлені різними підрозділами (всього 12) одного розділу, написана логічно і послідовно. **Наукова новизна** та основні здобутки дисертаційної роботи, що мають фундаментальне значення, стосуються певних змін в експресії адгезивних протеїнів різних родин – імуноглобулінів, кадгеринів, селектинів та інтегринів, що відбуваються під час постнатального розвитку та старіння тканин серцевих і скелетних м'язів, навантаженні спеціалізованих клітин головного мозку та при утворенні адгезивних контактів між клітинами крові.

Дисертантом вперше показано:

- під час постнатального розвитку скелетних та серцевих м'язів експресія мРНК, що кодують протеїн NCAM-1, знижується, а під час старіння – підвищується, що свідчить про залучення цього протеїну до компенсаторних механізмів, які мають місце у м'язах під час старіння ссавців. Аналогічно змінюється і кількість протеїну NCAM-1 в тканинах скелетних та серцевих м'язів. Уваги заслуговують отримані дисертантом дані щодо експресії мінорних екзонів протеїну NCAM-1, тому що вона є унікальною не тільки для всіх представників адгезивних протеїнів, але й серед представників молекул адгезії імуноглобулінової родини. Додатковий екзон VASE, для якого показана виражена експресія в мРНК протеїну NCAM-1 в тканинах серцевих та скелетних м'язів практично не визначається, що може свідчити щодо тканино-специфічного характеру експресії екзону VASE в м'язах щура під час постнатального розвитку;

- вперше показано, що в сироватці крові хворих з гострою формою шизофренії присутні аутоантитіла, що реагують з поліпептидами мембральної

та цитоскелетної фракції протеїнів головного мозку людини. В сиворотці здорових донорів аутоантитіла до нейрональних адгезивних протеїнів не визначалися. Наявність аутоантитіл до мембраних ізоформ протеїну NCAM-1 у сироватці крові свідчить про деструктивні зміни в нервовій тканині під час гострої фази шизофренічної хвороби. Виявлення аутоантитіл у сироватці хворих з гострою формою шизофренії можуть бути використані при розробці діагностичного тесту;

- виявлено специфічну експресію мРНК кадгеринових протеїнів в тканинах різного генезу (головний мозок, печінка, нирки, легені, серцеві та скелетні м'язи). Високий рівень експресії мРНК N-кадгерину (CDH2) показано для усіх досліджуваних тканин, в той час як експресія мРНК CDH1 обмежується тканинами печінки, нирок та легенів, а експресія мРНК CDH3 характерна головним чином для тканин нирок та легенів;

- на основі отриманих експериментальних даних дисертант приходить до висновку, що експресія нейронального протеїну NCAM-1 може виступати в якості маркера нормального постнатального розвитку серцевих та скелетних м'язів організму ссавців, в той час як кадгеринова експресія за цих умов здається менш інформативною. Встановлено, що експресія N-кадгерину не є критичною для нормального розвитку підшлункової залози, проте дуже важлива для нормального функціонування гранулярного апарату бета-клітин;

- Дмитром Даниловичем вперше показано вплив компонентів плазміноген/плазмінової системи на інтегрин-залежну агрегацію тромбоцитів. Встановлено, що Lys-плазміноген, на відміну від Glu-форми, інгібує індуковану ADP, тромбіном та колагеном агрегацію тромбоцитів. Інгібуваній ефект Lys-плазміногену виявляється переважно на другій необоротній стадії агрегації, що обумовлена секрецією адгезивних протеїнів з а-гранул тромбоцитів (фібриногену, вітронектину, тромбоспондину) та формуванням адгезивних контактів за участі інтегрину αІІІβ₃. Ефект Lys-плазміногену реалізується завдяки лізин-зв'язуючим сайтам кринглових структур молекули та виявляє специфічність щодо протеїнів, асоційованих з

поверхнею тромбоцитів, оскільки не чинить інгібуванального впливу на адгезивні контакти, що забезпечуються глікопротеїном GP Ib-IX-V та фактором фон Віллебранду. Ймовірно, що реалізація ефектів різних форм плазміногену на клітини опосередкована різними механізмами, при яких конформація молекули плазміногену відіграє визначальну роль. Отримані дисертантом дані створюють передумови щодо практичного застосування плазміногену в клінічній практиці. Так, Lys-плазміноген, здатний перешкоджати адгезивним контактам між тромбоцитами, може виявитись перспективним агентом для запобігання тромбозів у хворих на діабет другого типу, тромбоцити яких мають підвищенну адгезивність до ендотелію порівняно зі здоровими донорами;

- використання моделі виробленого умовного рефлексу пасивного уникнення показало, що блокування кадгеринових протеїнів за допомогою введення антитіл до протеїну CD2 (N-кадгерину) в структури гіпокампу та кори головного мозку шурів не є критичним для формування навику у дослідних тварин.

До здобудків дисертаційної роботи необхідно віднести те, що Д.Д. Жерносеков показав, що використання антикоагулянтних препаратів (зокрема, гепаринів різної молекулярної маси) у терапевтичній концентрації не впливає на інгібуванальний ефект Lys-плазміногену при утворенні адгезивних зв'язків під час агрегації тромбоцитів;

Результати аналізу фактичних даних, які наведені в дисертаційній роботі, свідчать на користь того, що сформульовані Д.Д. Жерносековим основні наукові положення та висновки базуються на використанні сучасних засобів та методів проведення досліджень. Сформульовані автором висновки та рекомендації послідовні, повністю витікають із змісту дисертації. Статистичний аналіз результатів досліджень проведений на сучасному рівні, за допомогою стандартних програм статистичного аналізу. Результати роботи представлені в достатній кількості (67) публікацій у наукових фахових виданнях та апробовані на наукових форумах різних рівнів.

Перераховане вище дозволяє оцінити основні наукові положення, висновки та одержані результати експериментальних досліджень Д.Д. Жерносекова як достовірні і науково обґрунтовані.

Практична значимість одержаних дисертантом експериментальних результатів заключається у тому, що результати щодо встановлення поліфункціональної ролі адгезивних протеїнів у створенні міжклітинних контактів та їх диференційованій експресії в онтогенезі та за патологічних станів в подальшому можуть бути використані при розробці оптимальних методів фармакологічної корекції патологічного тромбоутворення за серцево-судинних захворювань.

Характеризуючи в цілому розділ власних досліджень, можно стверджувати, що Д.Д. Жерносековим одержані результати, які мають певну наукову і практичну цінність. Результати власних досліджень представлено автором послідовно, з використанням загальноприйнятих для подібних робіт стилем. Заключення написане добре: невелике за розміром, але об'ємне за змістом. Висновки повністю відображають результати проведених досліджень.

Дисертаційна робота Д.Д. Жерносекова повністю відповідає профілю «біохімія». Дисертант використав широкий набір сучасних методів і одержав коректні результати щодо розуміння особливостей експресії адгезивних протеїнів та участі лігандів у забезпечені адгезивного зв'язку за фізіологічних умов та при патологічному стані.

Високо оцінюючи експериментальний рівень дисертаційної роботи, є необхідність задати дисертанту кілька дискусійних запитань стосовно фактичного матеріалу та інтерпретації одержаних даних:

- На ранніх стадіях постнатального розвитку в поліпептидах скелетних м'язів з м.м. 200 та 145 кДа виявлені сіалові кислоти, які були взагалі відсутні або присутні в мінорних кількостях в скелетних м'язах дорослих та старих тварин. Яку роль відіграють сіалові кислоти в цих ізоформах?

2. Хотілось би почути думку дисертанта щодо функціонального значення додаткових екзонів протеїну NCAM-1?
3. Відображенням саме яких компенсаторних механізмів, що мають місце у м'язовій тканині під час її старіння, автор вважає експресію мРНК протеїну NCAM-1?
4. Дисертантом проведена дуже велика робота по виділенню, очистці ряду протеїнів, гомогенність яких була доведена електрофоретично. Але чомусь результати цієї важливої роботи наведені в розділі «Матеріали і методи», а не в розділі «Результати та їх обговорення». Разом з тим, в результатах роботи дисертант іноді наводить методики проведення деяких експериментів.
5. Не зовсім зрозуміло наведення автором в розділі «Результати досліджень та їх обговорення» ряду рисунків, зокрема 3.20 і 3.37, на яких надані схеми протеолітичної деградації N-кадгерину і механізм антикоагулянтної дії гепаринів, що були опубліковані в 2009 та 2015 роках іншими авторами.

Однак, ці зауваження не мають кваліфікаційного характеру, не стосуються суті роботи і тому не впливають на високу позитивну оцінку виконаних досліджень. Їх сучасний рівень, однозначність отриманих результатів і використання адекватних методів математичного аналізу, а також надійна апробація на ряді вітчизняних та міжнародних з'їздах і конференціях, а також сторінках 67 друкованих праць, в тому числі однієї монографії, 33 статей, з яких 22 у наукових фахових виданнях України, 4 статей у закордонних виданнях та 33 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних конференціях та з'їздах свідчить, що ступінь обґрунтування **наукових положень, висновків та рекомендацій, наведених в дисертаційній роботі Д.Д. Жерносєкова, є достатньо високим та надійним.**

Рукопис дисертації написано державною мовою з використанням фахової наукової термінології. Стиль викладу матеріалів досліджень, наукових положень, висновків та рекомендацій забезпечує в цілому їх сприйняття. Структура Автореферату повністю відображає зміст дисертації.

ВИСНОВОК

Все вищезазначене вказує на те, що дисертаційна робота Д.Д. Жерносекова на тему “Поліфункціональна роль адгезивних протеїнів у міжклітинних контактах тканин ссавців в онтогенезі та за патологічних станів”, яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук, повністю відповідає спеціальності 03.00.04 – біохімія, є завершеною працею, в якій отримані нові науково-обґрунтовані результати, що у сукупності вирішують одну з конкретних наукових проблем біохімії, спрямовану на більш поглиблене знання механізмів адгезивної взаємодії у тканинах ссавців та людини, що відкриває можливості вирішення практичних задач медицини, зокрема для діагностики деяких патологічних захворювань, пов’язаних з порушенням експресії певних класів протеїнів адгезії. Наведене вище дозволяє вважати, що дисертаційна робота Жерносекова Дмитра Даниловича за змістом, обсягом, новизною, практичним значенням одержаних результатів, актуальністю та оформленням повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 року № 567 на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, галузь знань 091 – біологія, а сам здобувач заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук.

Зав. відділу біохімії мікроорганізмів
Інституту мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України
доктор біологічних наук, професор

Л.Д. Варбанець

