

6 БЕР 2018

Вх. №

67/03

## ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук, професора Варбанець Людмили Дмитрівни на дисертаційну роботу **ЯЦЕНКО Тетяни Андріївни** “Молекулярні механізми регуляції фібринолізу за участі фрагментів фібриногену/фібрину”, представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, галузь знань 091 - біологія

Процеси фібринолізу привернули увагу дослідників ще в середині 20 ст., тому на сьогодні молекулярний механізм фібринолізу в цілому встановлений, але заслуга автора і її керівника в тому, що вони змогли знайти в ньому деякі ще не вирішені, але дуже важливі питання, пов'язані зі з'ясуванням механізмів участі в процесі фібринолізу фрагментів та певних ділянок молекул фібрину та фібриногену, які утворюються під час лізису фібринового тромбу плазміном або в результаті фібринолізу - патологічного процесу, що супроводжується гіперактивацією фібринолітичної системи, або є наслідком заниженого рівня інгібіторів фібринолізу в плазмі крові. Фібриноген/фібрин, як і плазміноген/плазмін – це унікальні молекули, перетворення яких в деяких випадках має кардинальне значення для життя людини. Оскільки серцево-судинні захворювання на сьогодні займають перше місце серед причин смертності населення не тільки в Україні, але і в інших розвинутих країнах, стає питання про необхідність більш глибокого і цілісного розуміння механізмів регуляції фібринолізу за участі не тільки всієї молекули фібриногену/фібрину та плазміногену/плазміну, але і їх окремих фрагментів. Зокрема з'ясування таких питань, як механізм експонування сайтів зв'язування плазміногену та тканинного активатора в різних доменах фібриногену/фібрину під час полімеризації, а також участь окремих кринглових структур плазміногену у взаємодії з D-доменами фібриногену/фібрину. Вирішення цих питань є необхідною умовою розкриття механізмів регуляції фібринолізу на рівні протеїн-протеїнових взаємодій. **Про актуальність теми** свідчить і той факт, що на сьогодні всі відомі тромболітичні препарати є активаторами плазміногена, які перетворюють його в плазмін. Це і тканинний активатор плазміногена, урокіназа, стрептокіназа, стафілокіназа. Але нещодавно дослідниками був створений рекомбінантний білок – дельта-плазмін, що включає крингл 1 плазміна та його протеазний домен, який в дослідженнях на моделях ішемічного інсульту виявився більш ефективним по відношенню до деградації тромбів, ніж тканинний активатор плазміногена. Тому пошук



серед фрагментів і окремих доменів молекул, здатних регулювати процес фібринолізу, відкриває можливості вирішення практичних задач медицини, пов'язаних з порушеннями фібринолітичної системи. 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 у рамках тематичних планів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України "Молекулярні механізми функціонування ензимів системи гемостазу" (№ держреєстрації 0110U002701, 2010-2012 рр.), «Розробка діагностикумів для тестування стану системи руйнування тромбів» (№ держреєстрації 0113U003649, 2012-2015 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (№ держреєстрації 0112U002624, 2012-2016 рр.), «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (№ держреєстрації 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 2 таблиці та 46 рисунків. Вона налічує 140 сторінок друкованого тексту і складається із вступу, огляду наукової літератури, матеріалів і методів дослідження, одного розділу власних досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури, що містить 176 посилань.

В огляді наукової літератури, який складається з чотирьох підрозділів, наведено аналіз даних сучасної літератури щодо фібринолітичної системи та її основних компонентів. Автор акцентує увагу на доменній організації плазміногену/плазміну, їх ліганд-зв'язуючих ділянках, тканинному активатору плазміногену, його структурній організації. Особлива увага приділяється фібриногену, структурі його молекули, механізмам полімеризації фібрину, взаємодії плазміноген/плазміну з фібриногеном/фібрином. Розглянувши всі компоненти фібринолітичної системи, Тетяна Андріївна зупиняється на сучасних уявленнях щодо молекулярного механізму фібринолітичного процесу, який полягає в комплексі взаємопов'язаних міжпротеїнових взаємодій компонентів систем зсідання і фібринолізу. Аналіз проаналізованого матеріалу дає їй можливість зупинитись на питаннях, які на сьогодні залишаються ще не визначеними. З'ясування деяких з них і було метою досліджень дисертанта.

Огляд написано на високому професійному рівні з залученням сучасних посилань. Він свідчить про те, що Т.А. Яценко не тільки прекрасно



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. Так, наведений в розділі «Матеріали та методи» перелік методів яскраво свідчить про те, що Т.А. Яценко 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 дисертанткою методи описані в роботі досить повно.

Робота є монолітною, її результати представлені різними підрозділами одного розділу, написана логічно і послідовно. **Наукову новизну** та основні здобутки дисертації, що мають фундаментальне значення, можна сформулювати наступним чином:

- Дослідження молекулярних механізмів регуляції активності фібринолітичної системи продуктами плазмінової деградації фібриногену та фібрину свідчить щодо їх різної ролі в процесі фібринолізу. В той час як деякі з них, такі як DDE-комплекс, DD-фрагмент фібрину та E<sub>p</sub>-фрагмент фібриногену стимулюють активацію плазміногену тканинним активатором, інші - високомолекулярні продукти гідролізу фібрину та DDE-комплекс уповільнюють гідроліз фібрину плазміном.
- В інтактній молекулі фібриногену центри взаємодії з компонентами плазміноген/плазмінової системи є прихованими, тому в кровотоці комплексоутворення між ними не відбувається, але під час полімеризації фібрину в молекулах фібрин-мономеру центри взаємодії плазміногену і тканинного активатора експонуються, що веде до активації фібринолітичної системи.
- Визначення ділянок молекули E-фрагментів, що відповідають за перетворення плазміногену в плазмін під дією тканинного активатора, свідчить, що С-кінцеві залишки лізинів всіх трьох пар поліпептидних ланцюгів, а також і N-кінцева ділянка A<sub>α</sub> ланцюга є важливими в цьому процесі: перші відповідають за зв'язування тканинного активатора з кринглом 2, а друга – за зв'язування плазміногену. Даний механізм взаємодії характерний для E-фрагментів як фібрину, так і фібриногену.

- Дуже цікавим є одержання Тетяною Андріївною невідомих досі результатів, що в DD-фрагменті фібрину існують окремі центри зв'язування



для кринглів 1-3 та крингла 5 молекули плазміногена і які можуть бути локалізованими в A $\alpha$ , B $\beta$  та  $\gamma\gamma$ -ланцюгах цього фрагменту. Вперше доведено, що Glu-плазміноген взаємодіє з окремими поліпептидними ланцюгами D- та DD-фрагментів фібриногену/фібрину, що свідчить про наявність в них потенційних центрів взаємодії з проензимом поза відомою ділянкою A $\alpha$  148-160.

- Тетяною Андріївною вперше одержано результати, що іони Ca дозозалежно інгібують реакцію перетворення плазміногену до плазміну, індуковану D-димером фібрину. Показано, що видалення іонів Ca з D-фрагмента фібриногену та DD-фрагменту фібрину специфічним для Ca хелатуючим агентом етиленглікольтетраацетатом призводить до дозозалежного підвищення швидкості активації плазміногену тканинним активатором та кількості утвореного плазміну. Інші дивалентні катіони Mg<sup>2+</sup> та Mn<sup>2+</sup> не впливають на кінетику активації проензиму на DD-фрагменті фібрину. Тобто, вона показала, що ініціація активації плазміногену тканинним активатором є кальцій-залежним процесом.

- До здобутків дисертаційної роботи необхідно віднести також те, що Тетяна Андріївна розробила новий, високочутливий, ефективний, економічний та швидкий у виконанні спосіб визначення рівня тканинного активатора з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного ефективного стимулятора реакції активації плазміногену в присутності хелатуючого агента EGTA, який підсилює ефективність дії стимулятора. Відомо, що його рівень є одним із показників, що характеризує стан фібринолітичної системи, тому може служити маркером ряду серцево-судинних захворювань при застосуванні в лабораторно-клінічній практиці. Обґрунтованість розробки такого методу обумовлена тим, що існуючі на сьогодні методи характеризуються рядом недоліків, зокрема невисокою чутливістю, тривалим часом проведення аналізу, а також використанням високотоксичного бромціану для отримання фрагментів фібрин(оген)у.

- Результати аналізу фактичних даних, які наведені в дисертаційній роботі, свідчать на користь того, що сформульовані Т.А. Яценко основні наукові положення та висновки базуються на використанні сучасних засобів та методів проведення досліджень. Одержані результати були статистично проаналізовані. Результати роботи представлені в достатній кількості (17) 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 Т.А. Яценко як достовірні.** Достовірність одержаних даних, наукових положень і висновків дисертації ґрунтуються на ретельно



виконаних експериментах, які доповнюють один одного, та на їх коректній інтерпретації.

Практична значимість одержаних дисертанткою експериментальних результатів підтверджена одним патентом України на винахід. Характеризуючи в цілому розділ власних досліджень, можна стверджувати, що Т.А. Яценко 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 Т.А. Яценко повністю відповідає профілю «біохімія». Дисертантка використала широкий набір сучасних методів і одержала коректні результати щодо розуміння молекулярних механізмів реалізації ефекторної функції фібрину в регуляції активності фібринолітичної системи і які можуть бути основою для подальшого пошуку підходів для корекції патологічних станів, пов'язаних з розвитком серцево-судинних захворювань.

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

1. Дисертанткою проведена дуже велика робота по виділенню, очистці ряду протеїнів, гомогенність яких була показана електрофоретично. Але чомусь результати цієї важливої роботи наведені в розділі «Матеріали і методи», а не в розділі «Результати та їх обговорення».
2. З плазміногену були виділені окремі крингли але не обосновано, чому, наприклад, не розділяли крингли 1-3. Яку роль вони відіграють в активності плазміногену?
3. Автор пропонує механізм ініціації фібринолізу на D-доменах фібриногену/фібрину за участі кальцій-зв'язуючих центрів. Хотілось би, щоб Тетяна Андріївна відмітила, які саме стадії в цьому механізмі запропоновані нею і є новими.
4. Дуже важливим для клінічної медицини є розроблений дисертанткою метод визначення активності тканинного активатора плазміногену. Оскільки точне визначення рівня тканинного активатора у плазмі крові є необхідним для прогнозування тромботичних станів та кровотеч, а також для контролю його активності під час тромболітичної терапії, цей метод може знайти застосування в лабораторно-клінічній практиці. Але дуже прикро, що Тетяна Андріївна тільки сказала, що він кращий за існуючі, але не показала,



наскільки він точніший, ефективніший за існуючі, який час проведення аналізу.

5. Відомо, що функціональні властивості плазміногена визначаються не тільки специфічністю його кринглів щодо певних лігандів і конформацією молекули, але і типом глікозилювання (N-, O- або обидва). Тому хочу побажати Тетяні Андріївни в подальшому вирішити питання щодо ролі окремих типів глікозилювання в процесі фібринолізу.

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 17 наукових публікацій, у тому числі 7 статей в українських фахових виданнях, 3 з яких входять до науко-метричної бази Scopus, 1 статті в закордонному виданні та 9 тез доповідей у збірниках наукових конференцій та одному патенті України на винахід свідчить, що **ступінь обґрунтування наукових положень, висновків та рекомендацій, наведених в дисертаційній роботі Т.А. Яценко, 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 Т.А. Яценко на тему “ Молекулярні механізми регуляції фібринолізу за участі фрагментів фібриногену/фібрину”, яка представлена на здобуття наукового ступеня кандидата 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 регуляції фібринолізу на рівні протеїн-протеїнових взаємодій, що відкриває можливості вирішення практичних задач медицини, пов'язаних з порушеннями фібринолітичної системи.

Наведене вище дозволяє вважати, що дисертаційна робота Яценко Тетяни Андріївни 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 кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, галузь знань 091 – біологія, а сам здобувач заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук.

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

Л.Д. Варбанець

05.03.2018



*Варбанець*  
Секретарі  
Л.В. МАКАРЕЦЬ  
*Мабу*