

7 БЕР 2018

Вх. №

68/03-07/12
/kay

ВІДГУК

офіційного опонента Кучменко Олени Борисівни,
доктора біологічних наук, професора, завідувача кафедри біології
Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя
на дисертаційну роботу Яценко Тетяни Андріївни
«Молекулярні механізми регуляції фібринолізу за участі фрагментів
фібриногену/фібрину», подану на здобуття ступеня
кандидата біологічних наук до спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01
при Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України за спеціальністю
03.00.04 - біохімія

Актуальність теми. Дисертація Яценко Тетяни Андріївни безумовно є актуальною в теоретичному і практичному відношенні тому, що вона спрямована на дослідження молекулярних механізмів фібринолізу. Як відомо, саме порушення балансу між системами зсідання крові і фібринолізу призводить до тромбоутворення або геморагічних станів, які мають місце за багатьох патологічних станів та можуть призводити до розвитку ускладнень. На сьогодні достатньо детально вивчені механізми функціонування систем зсідання крові. Проте механізми функціонування фібринолітичної системи вивчені недостатньо. За деяких патологічних станів, зокрема таких серцево-судинних патологій як артеріальна гіпертензія, спостерігаються зміни величини показників, що характеризують фібринолітичну систему, в той час як деякі показники системи коагуляції не зазнають достовірних змін. На жаль, на сьогодні в клінічній практиці оцінка показників функціональної активності фібринолітичної системи робиться дуже рідко, що не дозволяє адекватно оцінити стан пацієнта та ефективність лікування.

Дослідження молекулярних механізмів регуляції фібринолізу, зокрема на рівні протеїн-протеїнових взаємодій, розширяє можливості розв'язання практичних завдань медицини, що пов'язані з порушеннями фібринолітичної системи.

У зв'язку з цим актуальність роботи Яценко Т.А. відповідає сьогоденним запитам біологічної та медичної науки, оскільки її метою є з'ясування молекулярних механізмів ініціації та регуляції фібринолітичного процесу за участі фрагментів та певних ділянок молекул фібриногену/фібрину.

Зв'язок теми дисертації з державними та галузевими науковими програмами. Робота виконувалась в рамках наукових тем відділу хімії та біохімії ензимів: «Молекулярні механізми функціонування ензимів системи гемостазу» (№ державної реєстрації 0110U002701, 2010 – 2012 рр.), «Розробка діагностикумів для тестування стану системи руйнування тромбів» (№ державної реєстрації 0113U003649, 2012 – 2015 рр.), «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (№ державної реєстрації 0113U003203, 2013 – 2017 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (№ державної реєстрації 0112U002624, 2012 – 2016 рр.).

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертантом показано, що продукти плазмінової деградації фібриногену та фібрину регулюють активність фібринолітичної системи. Встановлено, що фрагменти фібрину DDE, DD і E₁E₂ проявляють ефекторні властивості – стимулюють активацію плазміногену тканинним активатором. Високомолекулярні продукти гідролізу та DDE-фрагмент пригнічують швидкість гідролізу фібрину плазміном, конкуруючи з ензимом за субстрат. З усіх досліджуваних фрагментів тільки високомолекулярні продукти захищають плазмін, що утворюється на їх поверхні, від інгібування α_2 -антиплазміном. Висунуто припущення, що накопичення в мікрооточенні згустку продуктів деградації фібрину, які зв'язують на своїй поверхні плазміноген і не захищають утворений плазмін від інгібіторів плазми, може знижувати фібринолітичний потенціал плазміноген/плазмінової системи і бути однією з причин резистентності згустку до лізису.

Автором вперше встановлено стимулюючий ефект E_p -фрагменту фібриногену на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором. Показано, що взаємодія тканинного активатора з E_p -фрагментом забезпечується лізин-зв'язуючими ділянками активатора та С-кінцевими залишками лізину α - та γ -ланцюгів фрагменту. Встановлено двоцентрову взаємодію Glu-плазміногену з E_p -фрагментом, що є необхідною умовою презентації активаційної петлі проензиму та високої швидкості процесу активації.

Дисертантом досліджено механізм активації Glu-плазміногену тканинним активатором на D-доменвісних фрагментах фібриногену/фібрину. Показано, що виснаження кальцію хелатуючими агентами призводить до появи або значного підвищення стимулюючих властивостей D- та DD-фрагментів фібриногену та фібрину відповідно. Вперше встановлено, що іони кальцію дозозалежно інгібують реакцію перетворення плазміногену до плазміну, індуковану D-димером фібрину. Показано, що DD-фрагмент, одержаний з ковалентно прошитого фібриногену, також проявляє стимулюючу дію на активацію Glu-плазміногену тканинним активатором. Запропоновано механізм ініціації фібринолізу на ранніх стадіях полімеризації фібрину, згідно якому структурні перебудови в β C та γ C модулях D-домену, що мають місце при видаленні іонів кальцію з β 2 сайту під час взаємодії "B"- β центрів полімеризації та ковалентній прошивці $\gamma\gamma$ ланцюгів D-доменів суміжних молекул під час формування протофібрил, є необхідною умовою експонування центрів взаємодії плазміногену і тканинного активатора і початку процесу активації.

Доведено існування в D-домені фібрину різних сайтів зв'язування для фрагментів плазміногену K 1-3 та K 5. Вперше показано, що сайти зв'язування плазміногену можуть бути розташовані поза ділянкою A α 148-160 D-домену фібриногену/фібрину.

Практичне значення результатів дослідження. Отримані Яценко Т.А. у дисертаційній роботі результати свідчать про необхідність для ініціації структурних перебудов в D-доменах фібриногену/фібрину, пов'язаних зі змінами в кальцій-зв'язуючих центрах субдоменів і ковалентною прошивкою γ -ланцюгів D-доменів під час полімеризації фібрину. Показано можливість багатоцентрової взаємодії плазміногену з D-доменами фібрину. Встановлено шляхи залучення продуктів деградації фібриногену та фібрину до регуляції фібринолітичного процесу.

Запропоновано новий кількісний функціональний спосіб визначення активності тканинного активатора в зразках плазми крові донорів з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного стимулятора реакції активації плазміногену та хелатуючого агенту EGTA. Останній використовується з метою пришвидшення реакції активації плазміногену тканинним активатором зразка плазми. Спосіб є високочутливим, економним, простим та нетривалим у проведенні аналізу та може бути використаним в діагностичній практиці. На основі розробки отримано патент (заявка на винахід № а201501206, МПК (2015.01) А61К 38/49. «Спосіб визначення тканинного активатора плазміногену» / Рибачук В.М., Савчук О.В., Харченко С.М., Яценко Т.А., Юсова О.І., Гриненко Т.В., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України. – Заявл. 13.02.2015. – Позитивний висновок про відповідність винаходу умовам патентоздатності від 27.09.2016 р. – Опубл. 25.11.2016, Бюл. № 22.).

Ступінь обґрунтованості та достовірність положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Достовірність результатів та висновків дисертаційної роботи базується на достатній кількості експериментально-біохімічних досліджень. У дисертації Яценко Т.А. застосовані сучасні біохімічні, фізико-хімічні, хроматографічні, імунохімічні методи, адекватні поставленим завданням. На основі чітко сформульованих завдань, використання комплексного методичного підходу дисертанту

вдалося досягти поставленої в роботі мети. Усі висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими і доведеними.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. У приведених публікаціях повністю відображено основні результати з усіх розділів дисертації. Автореферат Яценко Т.А. повністю розкриває зміст дисертації і дає повне уявлення про наукову цінність і практичну значимість дисертаційної роботи. Зміст автореферату ідентичний основним положенням дисертації. Оформлення дисертації та автореферату здійснено у відповідності до вимог ДАК МОН України. Ступінь оприлюднення матеріалів дисертації достатній.

Загальна характеристика дисертації. Дисертація Хоменко А.В. побудована за загально прийнятою та рекомендованою структурою: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, висновки та список використаних джерел, що налічує 176 найменувань. Дисертація викладена на 140 сторінках друкованого тексту, містить 46 рисунків та 2 таблиць, написана гарною науковою мовою.

У загальній характеристиці роботи автор розкриває суть обраного напрямку наукових досліджень та обґрунтовує його актуальність. Автором сформульовані мета, завдання дослідження, викладені наукове і практичне значення отриманих результатів.

В огляді літератури Яценко Т.А. усебічно охарактеризувала сучасний стан досліджень основних компонентів фібринолітичної системи, системи згортання крові та механізму фібринолітичного процесу. Автором детально описано структуру молекул плазміногену/плазміну, тканинного активатора плазміногену, фібриногену/фібрину, особливу увагу приділено локалізації комплементарних центрів взаємодії плазміногену/плазміну та фібриногену/фібрину. Крім того, автором детально розглянуто механізми активації фібринолітичної системи на фібрині та шляхи гідролізу фібринового згустку.

У розділі «Матеріали і методи» докладно описано широке коло методів, які використовував дисертант для вирішення поставлених завдань. В цілому методи підбрані адекватно здійсненню поставленим меті та завданням.

З власних досліджень дисертанта випливає, що їм виконано велику за обсягом експериментальну роботу. Обговорення отриманих результатів проведено докладно і по суті. Воно відображає гарну обізнаність дисертанта з сучасним станом цієї наукової проблеми. Автором запропонована модифікація до способу визначення активності тканинного активатора в плазмі крові з використанням DD-фрагмента фібрину як стабільного ефективного стимулятора реакції активації плазміногену, яка є високочутливою, безпечною, недорогою та нетривалою у виконанні. Саме це робить такий підхід корисним для клініки.

Недоліки дисертації і автореферату щодо їх змісті і оформлення

Оцінюючи дисертаційне дослідження, впевнено можна сказати, що одержані матеріали мають значне теоретичне та практичне значення.

В роботі є дискусійні питання:

1. Чому саме E_p-фрагмент фібриногену проявляє стимулюючу активність?
2. Аналізуючи взаємодію фрагментів плазміногену з DD-фрагментом фібрину, автор припускає, що на ділянці A α 148-160 за взаємодію з K 1-3, а саме з ЛЗС крингла 1, може відповідати пара позитивно і негативно заряджених амінокислотних залишків (Arg 149-Glu 151 або Asp 155-Lys 157). А до зв'язування з K 5 ймовірно долучається боковий радикал Lys 157 або Arg 159. Базуючись на чому автор виділяє саме ці амінокислотні залишки?
3. Як автор бачить можливість впровадження отриманих результатів в медичну практику?

Відповідність дисертації встановленим вимогам. Висновок.

Дисертаційна робота Яценко Тетяни Андріївни “Молекулярні механізми регуляції фібринолізу за участі фрагментів фібриногену/фібрину”,

представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є самостійною, завершеною науково-дослідною роботою.

За актуальністю, новизною отриманих результатів, їх теоретичною та практичною значимістю, глибиною узагальнень та висновків, а також за технічним оформленням представлена дисертаційна робота у повному обсязі відповідає вимогам МОН до кандидатських дисертацій та п. п. 10, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015 року, а її автор, без сумніву, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Завідувач кафедри біології
природничо-географічного факультету
Ніжинського державного університету
імені Миколи Гоголя,
доктор біологічних наук, професор



О.Б. Кучменко

