

13 жовт 2015

Вх.№

30/03-07/15

Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу Рока-Мойї Яни Маріовни "Регуляція агрегації тромбоцитів плазміноген/плазміновою системою", подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Тромботичні ускладнення найрізноманітнішого генезу посідають одне з чільних місць серед причин смертності та становлять одне з найтяжчих ускладнень перебігу незліченої кількості захворювань. Тому дослідження різноманітних систем, що задіяні в процесах нормального та патологічного тромбоутворення, належить до вкрай актуальних як з наукової, так і практичної точок зору напрямків дослідження сучасної біохімії та фізіології. Однак істотним недоліком більшості подібних досліджень є неврахування високого ступеня багатофункціональності найрізноманітніших систем та окремих молекулярних та клітинних компонентів, взаємної узгодженості, а нерідко – й різнонаправленості їх дії. Тому виявлення взаємного впливу клітинних та молекулярних складових системи гемостазу та з'ясування процесів, що опосередковують вплив біологічно активних речовин на клітини крові має велике наукове та практичне значення.

За мету розглянутої роботи було обрано з'ясування ролі компонентів плазміноген/плазмінової системи в регуляції агрегації тромбоцитів та встановлення закономірностей активації плазміногену за участі тромбоцитів. Для досягнення подібної мети поставлено низку практичних задач, а саме - визначити кінетичні параметри активації плазміногену тканинним активатором плазміногену за присутності інтактних та активованих тромбоцитів, розробити метод та визначити активність інгібітора активатора плазміногену I типу в тромбоцитах та плазмі крові, вивчити вплив Glu- та Lys-форм плазміногену на агрегацію тромбоцитів та перебудову їх актинового цитоскелету за стимуляції різними агоністами, оцінити внесок окремих кринглових доменів та серинпротеїназного домену молекули плазміногену у його здатність впливати на агрегацію тромбоцитів та дослідити вплив антикоагулянтних препаратів гепарину на агрегацію тромбоцитів та ефект плазміногену щодо агрегації. Тобто йдеться про комплексне дослідження з залученням як молекулярних, так і клітинних систем, визначенням їх взаємного впливу та спільної ролі. Така постановка питання є сучасною, актуальною та заслуговує на схвалення. Водночас комплексний характер роботи вимагає залучення як широкого за об'ємом

Писавська
Розу за з'ясування
Розу за з'ясування

літературного матеріалу, так і практичного оволодіння широким набором сучасних біохімічних методів.

Дисертація побудована за традиційною схемою і містить вступ, огляд літератури, методичну частину, результати досліджень та їх обговорення (7 підрозділів), заключення, висновки, список літератури (267 найменувань), викладена на 164 сторінках машинописного тексту, проілюстрована 25 рисунками та 7 таблицями.

У вступі роботи висвітлено наукову проблему, обґрунтовано актуальність теми роботи, сформульовано мету і завдання дослідження, окреслено наукову новизну і практичне значення результатів, надано загальні відомості про обсяг дисертації. Огляд літератури свідчить про належне ознайомлення автора з найсучаснішими даними стосовно морфо-функціональної організації тромбоцитів, механізмів їх активації та агрегації, структури та функції плазміноген/плазмінової системи. Великої уваги приділено даним щодо різноспрямованих взаємодій між молекулярними та клітинними компонентами досліджуваних систем, опосередкованих цими взаємодіями процесів. Методична частина містить широкий набір сучасних біохімічних препаративних та дослідницьких методів – різні види афінної, гель-фільтарційної та іонообмінної хроматографії, методи фракціонування та ферментативної фрагментації та оцінки чистоти білків, активації, визначення активності та інгібування ферментів тощо. Великої уваги приділено методам роботи з тромбоцитами, їх виділенню, механізмам активації, визначенню кінетичних параметрів агрегації та різноманітних взаємодій, пов'язаних зі впливом численних білкових компонентів досліджуваної системи. Математичний аналіз отриманих результатів проведено з застосуванням сучасних обчислювальних програм. Все це дозволяє говорити про високий науково-методичний рівень роботи в цілому.

Внаслідок проведеної роботи отримано нові експериментальні дані, що істотно поглиблюють наші уявлення про участь плазміноген/плазмінової системи в регуляції тромбоцитарної ланки гемостазу. Вперше показано, що плазміноген/плазмінова система обмежує агрегаційну здатність тромбоцитів і в такий спосіб залучається до регуляції функціонального стану цих клітин. При цьому виключно важлива роль відводиться взаємодіям, опосередкованим зв'язуючими ділянками плазміногену. Так, Lys-плазміноген вибірково пригнічує агрегацію тромбоцитів людини, індуковану ADP, тромбіном і колагеном та не впливає на ристоміцин-залежну аглютинацію тромбоцитів, тоді як ні інтактна Glu-форма плазміногену, ні його окремі

кринглівмісні фрагменти не виявляють подібного впливу. При цьому специфічне зв'язування Glu-плазміногену з поверхнею активованих тромбоцитів може призводити до його претворення на Lys-плазміноген, а 6-аміногексанова кислота та кринглівмісні фрагменти плазміногену (K1-3, K4 та K5) перешкоджають інгібуванню Lys-плазміногеном агрегації тромбоцитів. При цьому ні активний плазмін, ні його заінгібована по активному центру форма якихось ефектів не виявляли. Тобто доведено ключову роль в цих процесах лізинзв'язувальних ділянок кринглових доменів плазміногену. Вперше встановлено, що Lys-плазміноген перешкоджає агоніст-індукованій реорганізації актинового цитоскелету тромбоцитів, тобто виявляє певну антиагрегаційну дію. Тобто експериментально доведено, що процес взаємодії плазміногену з клітинними рецепторами тромбоцитів є значно складнішим, багатофакторним процесом, що аж ніяк не може бути зведеним до простого зв'язування білка з певним рецептором. Обґрунтовано припущення про антиагрегаційний ефект Lys-плазміногену як наслідок взаємодії з мембраноасоційованими протеїнами тромбоцитів, що експонуються під час активації та беруть участь в процесі агрегації. Не менш вагомими видаються й результати дослідження участі тромбоцитів у регуляції активності плазміноген/плазмінової системи. Показано, що тромбоцити істотно сприяють активації плазміногену тканинним активатором плазміногену. Показано, що протягом агоніст-індукованої агрегації тромбоцити вивільняють значні кількості інгібітора PAI-1, що ефективно пригнічує активацію плазміногену під дією тканинного активатора плазміногену. Значний інтерес становлять дані щодо впливу на тромбоцити різних форм гепарину. Встановлено, що за терапевтичних концентрацій в плазмі крові препарати гепарину не індукують спонтанну агрегацію та не впливають на агрегацію тромбоцитів, стимульовану ADP. Водночас нефракціонований гепарин може індукувати помірну активацію тромбоцитів з наступним вивільненням тромбоцитами PAI-1 в плазму крові.

Варто згадати й методичні здобутки проведеної роботи. Розроблено та валідовано кількісний метод визначення активності PAI-1 в тромбоцитах та плазмі крові людини із використанням desAB-фібрину бика як стимулятора. Створено спосіб визначення анти-IIa-факторної (непрямої протитромбінової) активності препаратів низькомолекулярного гепарину турбідиметричним методом із використанням плазми крові як джерела антитромбіну й фібриногену. Інформативність та висока відтворюваність робить ці методи перспективними для застосування в лабораторно-клінічній практиці та у фармацевтичній промисловості. Виявлені закономірності підвищення

тромбоцитами ефективності активації плазміногену тканинним активатором та пригнічення агоніст-індукованої агрегації тромбоцитів Lys-плазміногеном видаються перспективними стосовно розробки нових терапевтичних підходів контролю тромбоутворення та тромболізису. Отже, як з науково-теоретичною, так і з прикладної точок зору розглянута робота заслугоує на схвалення.

Висновки роботи повною мірою відповідають отриманим результатам і заперечень не викликають. Варто підкреслити високий рівень оформлення роботи, що всупереч наявній сумній тенденції написана бездоганною мовою з яким та логічним викладенням змісту, деталізацією окремих питань та якісним оформленням роботи в цілому. За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у фахових виданнях, 1 патент України на винахід та 18 тез доповідей вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів та конференцій.

Принципових зауважень до роботи немає. Водночас хотілось би отримати відповіді на наступні питання:

- Одним з найвагомійших здобутків роботи є експериментальне доведення ключової ролі кринглових структур у взаємодії плазміногену з тромбоцитами, причому показано синергічний характер подібної взаємодії за рахунок кількох зв'язуючих ділянок. Постановка експерименту, рівень його виконання та трактовка отриманих результатів можуть слугувати взірцем комплексного вирішення досить-таки складного питання. Однак лишається незрозумілим, чому серед застосованих в дослідках фрагментів плазміногену не використано важкого ланцюга плазміну – фрагменту, утвореного кринглами 1-5? Порівняно з застосованими в дослідках K1-3, K4, K5 та міні-плазміногеном, отримання важкого ланцюга є простою задачею, а за інформативність даних, отриманих за його допомогою, могла б бути значно вищою та безпосередньо свідчити про мале значення активного центру плазміну в процесах пригнічення агрегації тромбоцитів.

- З тих же міркувань видається дискусійною доцільність застосування плазміну з активним центром, блокованим за допомогою апротиніну (фірмова назва основного панкреатичного інгібітора трипсину). Результати, отримані за допомогою комплексу плазміну з білковим інгібітором, вносять непевність через можливий вплив стеричних ускладнень, створених хоч і невеликою (6,5 кДа), але все ж білковою молекулою інгібітора. Чи не доцільніше було б застосувати низькомолекулярні інгібітори типу дізопрпілфторфосфату, фенілметилсульфотриду, в ідеалі –

ангідропохідне плазміну чи щось подібе? При цьому б не виникало запитань щодо можливого впливу стеричних перешкод.

- Враховуючи виявлену автором роль зв'язуючих ділянок кринглових структур, саме собою повстає питання про можливу участь в досліджуваних процесах аполіпропротеїнів. Чому цьому питанню приділено вкрай мало уваги?

Як видно, наведені зауваження породжені масивом отриманих автором даних і аж ніяк не знижують наукову та практичну значимість роботи. Вважаю, що дисертаційна робота Рока-Мойї Яни Маріовни "Регуляція агрегації тромбоцитів плазміноген/плазміновою системою" за актуальністю, обсягом і змістом проведених досліджень, за науковою новизною та практичним значенням одержаних результатів відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент

завідувач лабораторії біохімії

ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України",

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

В.В. - Верьовка С.В.

