

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертацію Ревки Ольги Володимирівни
«Координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі
клітин крові»,

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія,
галузь знань 091 – біологія

Процеси згортання крові та фібринолізу вивчаються дослідниками починаючи з XIX століття і на сьогодні молекулярні механізми, що лежать в основі даних процесів, в цілому є встановленими. Однак важливу роль у функціонуванні системи гемостазу відіграють не тільки її плазмові компоненти, але й її клітинна ланка, і саме на детальне вивчення механізмів залучення клітин крові до процесів тромбоутворення та тромболізу спрямовуються сучасні дослідження гемостазу. Клітини крові здатні виступати поверхнею, на якій відбувається акумуляція комплексів протеїнів систем згортання крові та фібринолізу, таким чином залучаючись до окремих стадій утворення та лізису тромбу як кофактори. Окрім того, вони є джерелом як активаторів, так і інгібіторів процесів фібриноутворення та лізису, здатні регулювати активність інших клітин, впливати на структуру та час існування згустку і т.д. Однак залишається нез'ясованим, як різноспрямовані ефекти клітин крові здатні узгоджуватись між собою задля забезпечення гемостатичного балансу та виконання системою гемостазу своєї фізіологічної функції – запобігання крововтрати з одного боку, а з іншого – попередження надмірного тромбоутворення. Оскільки серцево-судинні захворювання на сьогодні займають перше місце серед причин смертності населення не тільки в Україні, але і в інших розвинутих країнах, з'ясування біохімічних механізмів залучення клітин крові до узгодження процесів тромбоутворення та фібринолізу, чому і присвячена дисертаційна робота Ревки Ольги Володимирівни, є актуальним напрямом дослідження і представляє інтерес як з фундаментальної, так і з

практичної точок зору, адже дає можливість для кращого розуміння генезу та пошуку засобів корекції серцево-судинних захворювань тромботичної та геморагічної природи.

Дисертаційна робота виконувалась в рамках плану науково-дослідних робіт відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України: тема «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гемостазу за норми та патології» (ДРН№ 0113U003203, 01.01.2013 – 31.12.2017); тема «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (ДРН№ 0112U002624, 01.01.2012 – 31.12.2016); тема «Молекулярні та клітинні механізми реалізації дії плазміноген/плазмінової системи за норми та патології» (ДРН№0118U000377, 01.01.2018 – 31.12.2022); тема «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (ДРН№ 0117U004344, 01.01.2017 – 31.12.2021). Частина роботи було виконано в рамках гранту FEBS Collaborative Developmental Scholarship.

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 39 рисунків та 1 таблицю. Вона налічує 169 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 162 посилань.

В огляді літератури наведено аналіз щодо сучасних відомостей про функціонування систем згортання крові та фібринолізу, структуру і функції плазміногену та його активаторів, систему протеїну С. Автором також висвітлено існуючі на сьогодні дані про участь моноцитів та нейтрофілів у процесах згортання крові та фібринолізу, звернено увагу на дані про структуру та функції тромбоцитів, субпопуляції тромбоцитів, сигнальні шляхи, що

запускаються при їх активації, та роль тромбоцитів у процесах утворення та лізису фібринових згустків.

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 автор володіє та користується арсеналом сучасних методів препаративної біохімії, методів виділення клітин крові, фізико-хімічних (спектрофотометрія, турбідиметрія, електрофорез), хроматографічних, імунохімічних, методів конфокальної мікроскопії та проточної цитометрії, методів визначення активності ензимів за хромогенним субстратом, статистичних та ін. методів, необхідних для вирішення поставлених задач.

Наукову новизну та основні здобутки дисертації, що мають фундаментальне значення, можна сформулювати наступним чином:

- В досліджах *in vitro* вперше показано, що моноцити збільшують швидкість формування фібринового згустку, зміщуючи гемостатичний баланс процесів згортання та лізису фібринових згустків в бік тромбоутворення. Нейтрофіли однаково ефективно прискорюють утворення та лізис фібринових згустків, зменшуючи загальний час існування фібринового згустку вдвічі.
- Автором вперше з використанням методу конфокальної мікроскопії в реальному часі показано, що тромбоцити виступають центрами полімеризації фібрину та просторової організації структури фібринового згустку, що сприяє прискоренню та координуванню у просторі та часі процесів утворення фібрину і фібринолізу та обмежує розмір тромбу та час його існування.
- Методами конфокальної мікроскопії та спектрофлуориметрії показано, що нативні тромбоцити здатні зв'язувати тканинний активатор плазміногену. Вперше встановлено, що взаємодія тканинного активатора плазміногену з тромбоцитами здійснюється фібрин-залежним та фібрин-незалежним шляхом.
- Встановлено кількість плазміну, що генерується з сорбованого на поверхні активованих тромбоцитів плазміногену за дії ендогенних (тканинного активатора і урокінази) та екзогенних (стрептокінази) активаторів.

- Вперше визначено окремі молекулярні механізми, за якими клітини крові координують утворення та лізис фібринових згустків, а саме: ендотелій-незалежний шлях активації протеїну С, за якого активація протеїну С відбувається безпосередньо на поверхні тромбоцитів, моноцитів та нейтрофілів; ефекторна дія компонентів протромбінового комплексу на активацію плазміногену тканинним активатором в присутності активованих тромбоцитів; організація структури фібринового згустку шляхом утворення агрегатів тромбоцитів, вбудованих у фібриновий каркас; акумулювання на їх поверхні фібрину та фібрин-асоційованих плазміногену і тканинного активатора плазміногену, з формуванням центрів ініціації фібринолізу.

Про практичну значимість одержаних дисертанткою експериментальних результатів свідчить вперше запропонований метод визначення кількісних параметрів кривої оптичного поглинання процесу утворення та лізису фібрину в плазмі, збагаченій тромбоцитами, у порівнянні з безклітинною плазмою. Це дає змогу оцінити баланс між прокоагулянтною та антикоагулянтною дією тромбоцитів і може бути інформативним для скринінгової оцінки гемостатичних порушень у хворих з резистентною артеріальною гіпертензією.

Характеризуючи в цілому розділ власних досліджень, можна стверджувати, що Ревкою О.В. одержані результати, які мають наукову і практичну цінність. Результати власних досліджень представлено автором послідовно, з використанням загальноприйнятих для подібних робіт стилем. Висновки повністю відображають результати проведених досліджень.

Дисертаційна робота Ревки О.В. повністю відповідає профілю «біохімія». Дисертантка використала широкий набір сучасних методів і одержала коректні результати щодо розуміння біохімічних механізмів координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові, що може бути основою для подальшого пошуку підходів для корекції патологічних станів, пов'язаних з розвитком серцево-судинних захворювань. Основні висновки дисертаційної роботи є добре аргументованими і відповідають представленому експериментальному матеріалу. Матеріали дисертації повністю відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на наукових конференціях.

Однак, незважаючи на позитивне враження від роботи в цілому, все ж виникають певні зауваження та запитання.

1. Розділ «Огляд літератури» складає більше 20% від основної частини дисертації. Добре відому інформацію можна було б не виносити у цей розділ.

2. У розділі «Матеріали та методи» немає підрозділу статистичних методів аналізу отриманих результатів. У частині методів описано як проводилась статистична обробка результатів, але частина не містить цієї інформації.

3. Розділ «Узагальнення результатів дослідження» представлений лише на двох сторінках. Враховуючи отримані автором результати цей розділ можна було б зробити більшим та надати узагальнюючу схему.

4. У списку використаних джерел з 162 найменувань лише 9 за останні 5 років.

5. Чому при дослідженні впливу моноцитів, нейтрофілів та тромбоцитів на швидкість процесів утворення та лізису фібринового згустку *in vitro* ви використовували лише одну концентрацію моноцитів і нейтрофілів, а тромбоцитів дві: 50 млн/мл та 300 млн/мл?

6. При проведенні досліджень на людях ви пропонуєте показові параметри та умови тестування для індивідуального моніторингу гемостатичної системи пацієнтів із резистентною гіпертензією. Діагностичне значення цих параметрів запропоноване вами вперше?

Проте, зроблені зауваження та поставлені запитання, в основному, мають дискусійний характер і суттєво не впливають на позитивну оцінку дисертаційної роботи.

Загальний висновок

У цілому кандидатська дисертація Ревки Ольги Володимирівни «Координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові», подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є завершеною науковою працею, в якій отримано результати, щодо ролі клітин крові у процесах згортання крові та фібринолізу.

Зміст автореферату в цілому відповідає змісту дисертації.

Дисертація та автореферат оформлені відповідно до вимог, які ставляться до такого роду робіт.

На підставі всього вище викладеного дисертаційну роботу Ревки Ольги Володимирівни «Координування процесів тромбоутворення та фібринолізу за участі клітин крові» можна вважати такою, що за актуальністю, науковою новизною, обсягом виконаних досліджень, методичним рівнем та значимістю відповідає вимогам п. 9, 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабміну України від 24. 07. 2013 № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Д.б.н., с.н.с., зав. НДЛ «Біохімії»

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

К.О. Дворщенко

Підпис _____	засвідчую _____
підписпрізвище та ініціали посадової особи, що засвідчує підписи, та	