

ВІДГУК

на дисертаційну роботу Тихомирова Артема Олександровича
“Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори клітинних процесів та маркери патологічних станів різного генезу”,
що подається до захисту на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія»

Тематика дисертаційної роботи є актуальною, оскільки широкий спектр порушення метаболізму людини (за умов патологічного стану різного генезу й за фізіологічного старіння також) торкається системи гемостазу. Поширення ускладнень у пацієнтів після інфікування Covid19 також акцентувало увагу на проблемі порушення гемостазу. Adam Miszta та співавтори (*Int J Mol Sci.* 2021 Mar; 22(5): 2758) визначають, що кінетика генерації плазміну та інгібування під час фібринолізу ще недостатньо вивчені для розвитку аналізів для кількісної оцінки цих показників. Оцінка кінетики плазміну дозволяє ідентифікувати фібринолітичну дисфункцію та краще зрозуміти взаємозв'язок між аномальним розчиненням фібрину та патогенезом захворювання. Зважаючи на провідну роль, яку виконують тромбоцити у гемостазі та репаративних процесах, вкрай актуальною є необхідність дослідження механізмів реалізації Lys-плазміногеном його антиагрегантних властивостей та інших регуляторних механізмів за участі протеїнів плазміноген/плазмінової системи.

Дослідження, що проведені дисертантом, пов'язані з розкриттям механізмів регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи клітинних процесів за норми та патологічних станів, є безсумнівно актуальними.

Метою представленої роботи було з'ясування ролі плазмін(оген)у в регулюванні функціональної активності тромбоцитів та зляккісно трансформованих клітин та встановити значення ангіостатинів як діагностичних та прогностичних маркерів різних патологічних станів.

Для досягнення поставленої мети в дисертаційні завдань, а саме:



1. Дослідити вплив різних форм плазміногену на агоніст-індуковані перебудови актинового цитоскелету тромбоцитів та експонування Р-селектину як маркера екзоцитозу α -гранул.

2. З'ясувати регуляторну роль плазміногену в реалізації ангиогенної функції тромбоцитів через його вплив на вивільнення фактора росту ендотелійних клітин (VEGF) та утворення ангиостатинів *de novo*, визначити залежність цих процесів від функціонального стану тромбоцитів.

3. Вивчити вплив плазмін(оген)у на автофагію та регулювання сигнальних шляхів у пухлинних клітинах як механізмів їхньої резистентності до апоптозу/аноїкісу.

4. Дослідити здатність доброякісних новоутворень міометрію матки та грудної залози, а також аденокарциномних клітин продукувати ангиостатини, з'ясувати вплив цих протеїнів на основні ознаки малігнізації.

5. Визначити зв'язок між утворенням ангиостатинів та загоєнням хронічних ран м'яких тканин за цукрового діабету II типу та гіпертонічної хвороби (синдром Марторелла).

6. Проаналізувати кількісні зміни ангиостатинів у сітківці ока щурів за експериментальної гіперглікемії та її корекції із застосуванням інгібіторів ензиму PARP-1.

7. Визначити рівні ангиостатинів у сироватці крові пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями та їхньої фармакотерапії й оцінити діагностично-прогностичне значення ангиостатинів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Відповідно до матеріалу презентованої дисертації усі поставлені завдання були успішно реалізовані в рамках основного плану науково-дослідних робіт відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України 2010-2021 рр. за темами «Молекулярні механізми функціонування ензимів системи гемостазу» (№ державної реєстрації 0110U002701, 01.01.2010–31.12.2012 рр.), «Розробка діагностикумів для тестування стану системи руйнування тромбів» (№ державної реєстрації 0113U00364, 01.01.2012–31.12.2015

рр.), «Механізми регуляції плазміноген/плазміном міжмолекулярних та міжклітинних взаємодій в системі гомеостазу за норми та патології» (№ державної реєстрації 0113U003203, 01.01.2013–31.12.2017 рр.), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (№ державної реєстрації 0112U002624, 01.01.2012–31.12.2016 рр.), «Біохімічні механізми контролю системних міжклітинних взаємодій, регулювання сигнальних мереж та клітинних функцій за умов норми та патологічних станів» (№ державної реєстрації 0117U004344, 01.01.2017 –5 31.12.2021 рр.), «Молекулярні та клітинні механізми реалізації дії плазміноген/плазмінової системи за норми та патології» (№ державної реєстрації 0118U000377, 01.01.2018–31.12.2022 рр.), «Дослідити протеїни системи активації плазміногену у контролі малігнізації пухлинних клітин» (№ державної реєстрації 0120U000016, 2020–2021 рр.).

Новизна дослідження та одержаних результатів.

У дисертаційному дослідженні отримано нові дані стосовно залучення Lys-плазміногену до регулювання функціонального стану тромбоцитів. Вперше встановлено, що інгібіторні ефекти Lys-плазміногену на агрегацію тромбоцитів реалізуються через порушення агоніст-індукованих перебудов актинового цитоскелету та пригнічення вивільнення α -гранул. Доведено, що Lys-плазміноген послаблює ангіогенну функцію тромбоцитів через інгібування агоніст-індукованого вивільнення VEGF та генерування ангіостатинів. Продемонстровано залежність здатності тромбоцитів утворювати ангіостатини від функціонального стану клітин. Вперше запропоновано механізм генерування ангіостатинів на поверхні плазматичної мембрани активованих тромбоцитів за участі експонованого актину. Отримано оригінальні дані стосовно механізмів залучення плазміноген/плазміну до регулювання виживання та рухливості пухлинних клітин аденокарциноми легені. Вперше показано, що одним з механізмів набуття пухлинними клітинами резистентності до плазмін-індукованого апоптозу/аноїкісу, є індукція репаративної автофагії. Новими є дані щодо індукування плазміном синтезу регуляторного ензиму TP53-inducible glycolysis

and apoptosis regulator (TIGAR), який має важливе значення в підтриманні міграційної активності клітин аденокарциноми легені. Визначено зворотну залежність між здатністю клітин аденокарциноми грудної залози продукувати ангіостатини та їхнім міграційним/інвазійним потенціалом. Значно розширено уявлення про участь ангіостатинів у процесах неопластичного росту завдяки новим даним про роль цих протеїнів як негативних регуляторів запальних процесів та проліферації в гіперпластичних тканинах доброякісних новоутворень матки та грудної залози. Вперше показано асоціацію між змінами рівнів ангіостатинів з розвитком ускладнень цукрового діабету та серцево-судинних хвороб. Встановлено, що стан хронічної гіперглікемії сприяє зниженню рівнів ангіостатинів у сітківці ока щурів, що може робити внесок до розвитку діабетичної ретинопатії. Вперше продемонстровано, що одними з клітин, які відповідають за конститутивне генерування ангіостатинів у нервовій тканині, є астроцити. Показано, що підвищений рівень ангіостатинів та надмірна активність MMP є факторами, що сповільнюють загоєння ран. Новизну роботи також визначають дані стосовно того, що фармакодинамічні властивості деяких кардіо- та нейропротекторних препаратів реалізуються через зміни рівня ангіостатинів у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями (ішемічною хворобою серця, фібриляцією передсердь та гострим порушенням мозкового кровообігу).

Практичне значення результатів дослідження.

Отримані експериментальні дані формують підґрунтя для використання Lys-плазміногену з метою створення нових антитромботичних засобів для профілактики та лікування станів, асоційованих з надмірною активацією тромбоцитів. Інгібувальний вплив Lys-плазміногену на секрецію тромбоцитів, зокрема, на вивільнення тромбоцитарного VEGF, може знайти застосування в терапії онкологічних хвороб для обмеження ангіогенезу в солідних пухлинах. Розроблені й застосовані у дисертаційному дослідженні підходи для визначення ангіостатинів у біологічному матеріалі із використанням імунохімічних методів значно розширюють спектр можливого застосування цих протеїнів як діагностико-прогностичних маркерів різних патологічних станів. Зокрема,

ангіостатини можуть бути використані як маркери ступеня малігнізації ракових пухлин та предиктори розвитку доброякісних новоутворень. Кількісний аналіз ангіостатинів може бути корисним для моніторингу загоєння хронічних ран. Визначення вмісту циркулюючих ангіостатинів у сироватці крові може слугувати чутливим показником ефективності фармакотерапії патологій серцево-судинної системи. Дані стосовно активації автофагії як одного з механізмів набуття пухлинними клітинами стійкості до апоптозу/аноїкісу, індукованого плазміном, можуть бути використані для розроблення принципово нових терапевтичних стратегій, спрямованих на обмеження розвитку злоякісних новоутворень та метастазування. З'ясування важливої ролі мотогенного протеїну TIGAR у підтриманні плазмін-індукованої міграції має вагоме прикладне значення, яке полягає в можливості створення вискоефективних протипухлинних та антиметастатичних препаратів. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані для проведення лекційних курсів та лабораторних практикумів з таких дисциплін, як «Біохімія», «Біомедична хімія», «Молекулярна біологія», «Клітинна біологія» та «Біотехнологія» для студентів природничих факультетів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність.

Свідченням обґрунтованості та достовірності наведених у дисертації результатів та зроблених висновків є використання автором широкого спектру адекватних експериментальних моделей та застосування різноманітних сучасних методів, великий об'єм отриманих даних, їх обробка з використанням статистичного аналізу та спеціального програмного забезпечення. Формування експериментальних груп та статистичний аналіз отриманих даних дає базу для довіри до отриманих результатів. Особливо слід відзначити застосування таких сучасних методів, як гель-електрофорез, ензим-форез, афінна хроматографія, гель-проникна хроматографія, протокова цитофлуориметрія, конфокальна лазерна скануюча мікроскопія, спектрофотометрія, ензиматичні методи, методи хімічної модифікації протеїнів, імунохімічні методи (імунізація тварин та отримання

імунних сироваток, імуноблотинг, імуноцитохімія, імуногістохімія), методи клітинної біології (отримання тромбоцитів *ex vivo*, культивування клітинних ліній), молекулярно-генетичні методи (siRNA-технологія). Загальні висновки дисертаційної роботи побудовані відповідно власних експериментальних даних.

Дисертаційну роботу побудовано за загальноприйнятою схемою. Дисертація складається з анотації, вступу, основної частини, яка охоплює огляд літератури, методичну частину, результати власних досліджень (три підрозділи), узагальнення, висновків, переліку використаних джерел літератури (695 найменувань) та додатки. Роботу викладено на 488 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 124 рисунками та 12 таблицями.

Зміст наукового рукопису за всіма розділами відповідає напрямку спеціальності, за яким дисертант здобуває науковий ступінь. Рукопис за структурою і змістом розділів є впорядкованим згідно офіційних вимог та виконаний на високому науковому рівні.

Дисертант провів глибокий аналіз літературних джерел, що відображено в огляді літератури у трьох підрозділах:

- 1.1. Загальна характеристика протеїнів плазміноген/плазмінової системи
- 1.2. Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори функціонального стану клітин
- 1.3. Ангіостатини – нові компоненти плазміноген/плазмінової системи.

Об'єм огляду літератури складає 21 % від загального об'єму дисертації. Ретельний та структурований огляд надає можливість проникнутися головною ідеєю дисертаційної роботи.

Другий розділ «Матеріали та методи дослідження» містить 13 підрозділів (14,3 % від загального об'єму дисертації), що розкривають увесь спектр застосованих методів сучасної біохімії та клітинної біології. Методична частина рукопису за оформленням відповідає вимогам, що висуваються до дисертацій.

Результати власних досліджень викладено у розділі 3 «Результати та обговорення» у 3-х підрозділах, які логічно пов'язані між собою.

3.1. Реципрокні взаємодії протеїнів плазміноген/плазмінової системи з тромбоцитами. Механізми модулювання плазміногеном ангиогенної функції тромбоцитів. У цьому підрозділі надані власні результати експериментальних досліджень дисертанта стосовно перебудови актинового цитоскелету тромбоцитів за дії Glu-та Lys-плазміногену, впливу плазміногена на екзоцитоз тромбоцитарних α -гранул тромбоцитів, ефекти плазміногену на продукування активних форм кисню як вторинних месенджерів тромбоцитарного сигналювання, впливу плазміногену на вивільнення VEGF з тромбоцитів та запропонований механізм утворення ангиостатинів тромбоцитами.

3.2. Роль протеїнів плазміноген/плазмінової системи в процесах малігнізації та неопластичного росту. У другому підрозділі за експериментальними даними доведено вплив плазміноген/плазміну на апоптоз/автофагію у пухлинних клітинах *in vitro*, регулювання ангиостатинами міграційної активності пухлинних клітин, утворення ангиостатинів за розвитку доброякісних новоутворень матки та грудної залози.

3.3. Ангиостатини як регулятори та маркери патологічних станів.

В третьому підрозділі викладено результати дослідження ангиостатинів як регуляторів патологічних процесів, зокрема за розвитку ускладнень цукрового діабету, експериментальної діабетичної ретинопатії та її корекції інгібіторами PARP-1, за серцево-судинних захворювань та їх фармакокорекції.

Після кожного підрозділу, що висвітлюють власні результати експериментальних досліджень презентовані висновки та відкриті публікації.

Найбільш цікавим є розділ 4 “Аналіз та узагальнення результатів дослідження” де автор вже надає цілісну картину власно отриманих експериментальних даних за темою дисертації.

В цілому робота складає добре враження, але є декілька питань та зауважень:

1. Бажано було б скоротити об'єм дисертації (488 стор.) за рахунок літературного огляду.
2. У роботі застосовується суміш англомовних та українських скорочень, бажано дотримуватися одного стилю.

3. Чому при отриманні кролячих антитіл проти ангіостатину використовували імуно-ферментний аналіз (ELISA), а визначення ангіостатинів у біологічному матеріалі проводили методом імуноблотингу?
4. У чому був сенс отримання антитіл до плазміногену щура? Чому для імунізації кролів використовували антиген, імобілізований у поліакриламідному гелі?
5. Яке відношення до матеріалів дисертації має стаття щодо отримання антитіл до протеїну фактора VIII, які безпосередньо не використовували в експериментальній роботі?
6. Блотограми регуляторних протеїнів клітин A549, наведені на рисунку 3.28 дисертаційної роботи, було б доцільно представити разом з відповідними результатами денситометричного аналізу.
7. Чи проводився кореляційний аналіз отриманих даних за різними патологічними станами?
8. Чи запатентовані отримані нові експериментальні дані?

Висловлені зауваження та запитання ніяк не знижують актуальність та значимість дисертаційної роботи в цілому.

Дисертаційна робота оформлена і написана на високому науковому рівні, а окремі помилки, переважно, стилістичного та технічного характеру, як і деякі дискусійні моменти, що обговорені персонально з дисертантом, не зменшують її наукової цінності.

Автореферат дисертації ідентичний основним її положенням. Дисертація і автореферат написані фаховою українською мовою і оформлені згідно чинних вимог.

Повнота викладення основних результатів дисертаційних досліджень. Результати дисертаційного дослідження достатньо повно висвітлено у 55 друкованих працях, у тому числі 26 статтях, з яких 20 у наукових фахових виданнях України (14 з яких індексуються у базі даних Scopus кuartиль Q4), 6 статей у фахових закордонних виданнях, з яких 2 віднесені до Q1, 3 – до Q2, 1 – до Q4 відповідно до класифікації CImago Journal & Country Rank, 1 розділ

монографії та 28 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях, конгресах та симпозиумах.

Зважаючи на відсутність суттєвих зауважень та позитивне враження від отриманих результатів роботи в цілому, вважаю, що дисертація Тихомирова Артема Олександровича містить цілком оригінальне і достатньо повне вирішення наукового завдання. Дисертаційна робота за своєю актуальністю, об'ємом отриманих результатів, новизною та науково-практичною значимістю отриманих результатів відповідає усім вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів щодо докторських дисертацій», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присвоєння наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – «біохімія».

Завідувачка кафедри біохімії та фізіології
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара, МОН України
д-р біол. наук, професор

Галина УШАКОВА

Дніпровський національний
університет імені Олеся Гончара
Підпис *Г. Ушакова* Завідуючою
Начальник відділу кадрів
Ушакова
2508 20 26

