

## ВІДГУК

опонента на дисертаційну роботу  
Тихомирова Артема Олександровича



«Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори клітинних процесів та маркери патологічних станів різного генезу»,  
поданої на розгляд для здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

### Актуальність теми дисертації

Робота присвячена протеїну плазміногену, що кодується геном *PLG*, який знаходиться на короткому плечі 6-ї хромосоми людини. Протеїн складається із 810 амінокислот і належить до проферментів, що секретується в кров, причому при секреції відсікається 19 амінокислот, і проходить N-глікозилування амінокислотного залишка Asn289 та O-глікозилування залишка Thr346. Тобто, циркулюючий в організмі плазміноген є глікопротеїном і містить 791 амінокислоту. Далі плазміноген розщиплюється між амінокислотними залишками Arg560 і Val561, утворюючи плазмін – фермент класу гідролаз, протеаз, серинових протеаз. Плазмін бере участь у ряді біологічних процесів, таких, як зсідання крові, гемостаз, фібриноліз, відновлення тканин. В свою чергу, плазмін далі фрагментується при дії різних металопротеїназ, еластази, простата-специфічним антигеном, сериновою протеазою (13 кДа) або ендопептидазою (24 кДа), утворюючи ангіостатин. Ангіостатин - це фрагмент плазміну масою 38 кДа, що містить три-п'ять протеїнових мотивів крингл (крендель). Ангіостатин є природним інгібітором ангіогенезу.

Така мультифункціональність плазміноген/плазмінової системи визначає її важливу роль у загоєнні ран, ембріогенезі, фіброзі і ангіогенезі, причому останній впливає на прогресію епітеліальних пухлин та їх метастазування. Зрозуміло, що любі порушення у роботі плазміноген/плазмінової системи може дати поштовх розвитку серцево-

судинних захворювань, ускладнень цукрового діабету, появи і прогресії злякисних новоутворень.

Відомо, що надекспресія протеїнів системи активації плазміногену, а також відповідних клітинних рецепторів, часто спостерігається в пухлинних клітинах та є несприятливою ознакою перебігу захворювання на рак. Більше того, підвищений відносний рівень експресії таких протеїнів асоціюється із прогресією пухлин, а також із підвищеною здатністю пухлинних клітин до інвазії та метастазуванню. Проте багато питань, пов'язаних із функціонуванням протеїнів системи плазміноген/плазмін/ангіостатин не з'ясовано, особливо при патологіях.

Таким чином, тема дисертації є важливою і актуальною задачею сучасної біомедицини.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**  
Дисертаційна робота виконувалася згідно основного плану науково-дослідних робіт відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України 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 гемостазу 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 – 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.)



та «Дослідити протеїни системи активації плазміногену у контролі малігнізації пухлинних клітин» (№ державної реєстрації 0120U000016, 2020–2021 рр.).

**Достовірність та ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Метою дисертаційної роботи було з'ясувати роль плазміногену і плазміну в регулюванні функціональної активності тромбоцитів та злякано трансформованих клітин та встановити значення ангіостатинів як діагностичних та прогностичних маркерів різних патологічних станів. Мету роботи повністю розкривають поставлені задачі.

Для виконання поставлених задач дисертантом застосовано сучасні методи дослідження, включаючи методи експериментальної біохімії – виділення та очищення плазміногену і отримання його фрагментів, виділення тромбоцитів, отримання поліклональних антитіл; методи клітинної біології – культивування та аналіз проліферації клітин, культивування первинних клітин; методи експериментальної онкології і патофізіології – робота із експериментальними тваринами, тести на інвазивність та міграційну активність клітин; а також біохімічні (вестерн-блот аналіз, імуноблоттінг, желатинова зимографія, протокова цитофлуориметрія, спектрофотометрія, МТТ тест), молекулярно-біологічні (siRNA) та статистичні методи.

Достовірність наукових положень, висновків і практичних рекомендацій дисертаційної роботи обґрунтовано вдало обраним комплексом методологічних підходів для досягнення поставленої мети та вирішення завдань дослідження.

**Новизна та практичне значення одержаних результатів.** Наукова новизна результатів дисертації Тихомирова А.О. полягає у тому, що вперше показано, що інгібіторна дія плазміногену на агрегацію тромбоцитів реалізується через порушення будови актинового цитоскелету, викликаного агоністами, причому спостерігається пригнічення вивільнення  $\alpha$ -гранул. Показано, що плазмін індукує синтез регуляторного ензиму TIGAR, який відіграє важливе значення у підтриманні міграційної активності пухлинних

клітин на прикладі лінії аденокарциноми легені. Показана роль ангіостатинів як негативних регуляторів запальних процесів та проліферації при гіперплазії репродуктивних жіночих органів (матка, грудна залоза). 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 ММР є факторами, що сповільнюють загоєння ран. Показано, що фармакодинамічна дія ряду кардіо- та нейропротекторних препаратів призводить до зміни рівня ангіостатинів у пацієнтів із серцево-судинними захворюваннями.

Отримані результати дисертаційного дослідження є експериментальним підґрунтям для подальшого вивчення потенційного використання ангіостатинів у лікуванні найбільш поширених хвороб, таких як серцево-судинні захворювання та розвиток солідних злоякісних новоутворень.

**Повнота викладу результатів дисертації в опублікованих працях.** Основні положення та результати дисертації повністю висвітлені у наукових працях та оприлюднені на наукових конференціях, усього у 55 наукових роботах: 26 статтях у провідних фахових виданнях, затверджених МОН України, 1 розділі монографії та у 28 тезах доповідей на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях, конгресах та симпозіумах. Основний зміст дисертаційної роботи повністю відображено в опублікованих наукових працях.

**Оцінка змісту дисертації та автореферату.** Дисертація оформлена із дотриманням існуючих правил, побудована за традиційною схемою, складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділів Матеріали та методи досліджень, Результати та обговорення (у трьох частинах), Аналіз та узагальнення результатів дослідження та Висновків. Дисертацію викладено на 489 сторінках машинописного тексту. У роботі налічується 127 рисунків та 12 таблиць. Список використаних джерел містить 695 найменувань.



У вступі автор ґрунтовно означив актуальність обраної теми, сформулював мету і задачі, розкрив наукову новизну і практичне значення дисертаційної роботи.

Огляд літератури структурований і складається із 3-х підрозділів, у яких автор проаналізував більшість вагомих літературних першоджерел за темою дослідження. Так, детально описано характеристику протеїнів плазміноген/плазмінової системи, освітлено їх роль як регуляторів функціонального стану клітин, описано рецептори плазміногену, регулювання запальних процесів протеїнами плазміноген/плазмінової системи та роль цих протеїнів у функціонуванні тромбоцитів і регулюванні пухлинного росту та метастазування. Велику увагу автор приділив ролі протеїнів плазміноген/плазмінової системи в розвитку серцево-судинних захворювань та у загоєнні ран. Важливо, що детально обговорено ангіостатини, історію їх відкриття та дослідження їх властивостей, а саме - механізми утворення ангіостатинів та їх біологічної дії. Описані дані щодо ангіостатинів як маркерів патологічних станів.

Практично всі найбільш вагомні наукові джерела за останніх 5 – 10 років було включено в аналіз. Огляд літератури змістовний, логічно побудований, аргументовано викладений.

У другому розділі «Матеріали та методи досліджень» представлено методи, які було застосовано для з'ясування ролі плазмін(оген)у в регулюванні функціональної активності тромбоцитів та злоякісно трансформованих клітин та встановлення значення ангіостатинів як діагностичних та прогностичних маркерів різних патологічних станів. Детально описано методи дослідження, включаючи методи експериментальної біохімії, клітинної біології, молекулярно-біологічні та статистичні методи. Загалом, алгоритм дослідження є вдалим та цілком виправдовує поставлену мету.

У третьому розділі «Результати досліджень та обговорення» у трьох підрозділах викладено результати власних досліджень; цей розділ є найбільш фундаментальним з точки зору залучення сучасних біохімічних та

молекулярно-біологічних методів і демонструє оволодіння дисертантом усіма сучасними лабораторними методами та вміння глобального аналізу зібраного матеріалу із аналізом подальшої перспективи досліджень.

У першому підрозділі вивчено взаємодії протеїнів плазміноген/плазмінової системи з тромбоцитами та визначено механізми модулювання плазміногеном ангіогенної функції тромбоцитів. Так, встановлено, що Lys-плазміноген залучається до регулювання тромбоутворення та ангіогенезу через модулювання функціонального стану тромбоцитів; показано, що антиагрегативна активність Lys-плазміногену реалізується через інгібування агоніст-індукованої реконструкції актинового цитоскелету тромбоцитів та пригнічення секреції  $\alpha$ -гранул; продемонстровано, що Lys-плазміноген обмежує ангіогенну функцію тромбоцитів; встановлено, що утворення ангіостатинів залежить від функціонального стану тромбоцитів і здійснюється активованими клітинами; показано, що Lys-плазміноген підсилює генерування активних форм оксигену в тромбоцитах та пригнічує метаболізм інтактних та тромбін-стимульованих тромбоцитів *ex vivo*. У другому підрозділі продемонстровано роль протеїнів плазміноген/плазмінової системи в процесах малігнізації та неопластичного росту. Так, на прикладі лінії клітин аденокарциноми легені людини A549 показано, що ці клітини конвертують екзогенний Glu-плазміноген на плазмін *in vitro*, що порушує адгезивність клітин. Встановлено, що плазмін(оген) сприяє зменшенню рівнів проапоптотичних регуляторних протеїнів та інгібіторів клітинного циклу (Bax, caspase 9, p21) та зростання рівнів протеїну системи репарації геному PARP-1 та MDM2. Показано, що активація автофагії та індукція синтезу регуляторного протеїну TIGAR є одними з потенційних механізмів набуття пухлинними клітинами резистентності до плазмін-індукованого апоптозу/аноїкісу. Встановлено, що рівень ангіостатину в тканинах доброякісних новоутворень міометрію матки (міоми) та грудної залози (фіброаденоматоз) обернено корелює з розвитком запальних процесів та високим проліферативним індексом гіперпластичних тканин. Тобто,



ангіостатини можуть розглядатися як інгібітори малігнізації тканин та маркери позитивного прогнозу захворювання. У третьому підрозділі вивчено ангіостатини як регулятори та маркери патологічних станів. Показано, що відновлення росту судин та скорочення термінів загоєння хронічних виразок пацієнтів з цукровим діабетом II типу після застосування курсу вакуумної терапії (VAC-therapy) можуть реалізуватися через елімінацію з пошкоджених тканин протеїнів-інгібіторів ангіогенезу та надмірної активності колагенолітичних ензимів (матриксних металопротеїназ). Доведено, що в утворенні й продукуванні ангіостатинів у нервовій тканині беруть участь астрогліальні клітини. Показано зниження рівня ангіостатину в сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця та дисліпідемією після курсу терапії з використанням симвастатину. Зниження вмісту циркулюючого ангіостатину в результаті ліпідознижувальної терапії корелювало з нормалізацією показників ліпідного обміну та пригніченням запальних процесів у пацієнтів означеної групи.

**В четвертому розділі «Аналіз та узагальнення результатів»** дисертаційної роботи проведено аналіз отриманих результатів. Автор, інтегруючи результати власних досліджень, зводить їх у єдину систему, зіставляє з даними джерел літератури, а також висловлює власні міркування з приводу лікувальної дії природних ангіостатинів при терапії серцево-судинних захворювань, цукрового діабету II типу та при злоякісних новоутворень. У цьому розділі надається можливість у цілому охопити масштабну наукову роботу дисертанта, простежити за умотивованою послідовністю реалізованих дослідницьких кроків, усвідомити основні положення, їх інтерпретацію та з'ясувати зв'язок з наступними висновками, які сформульовано в дванадцяти пунктах, які повністю відповідають меті, задачам та результатам проведеного дослідження. Вірогідність одержаних результатів підтверджена їх адекватною статистичною обробкою.

**В авторефераті** з оптимальною повнотою відображено зміст усіх розділів дисертації, її наукові положення і висновки, а його зміст, беззаперечно, відповідає змісту дисертації.

В дисертації мають місце окремі орфографічні та стилістичні помилки, які, втім, не перешкоджають адекватному сприйняттю результатів роботи, не впливають на загальну високу оцінку дисертаційної роботи у розв'язанні важливого наукового завдання щодо з'ясування ролі плазміногену, плазміну та ангіостатину в регулюванні функціональної активності тромбоцитів та злоякісно трансформованих клітин та встановленні значення ангіостатинів як діагностичних та прогностичних маркерів різних патологічних станів.

Втім, виникло кілька запитань:

1. У чому Ви вбачаєте перспективи застосування результатів вашого експериментального дослідження у клінічній практиці?

2. Як ви збираєтесь продовжувати цю роботу? Як дані, отримані у експериментальній моделі на лінії клітин аденокарциноми легені, ви плануєте перенести на реальних пацієнтів?

3. Як ви прокоментуєте той факт, що при лікуванні пацієнтів із солідними пухлинами анти-ангіогенні препарати, такі як антитіла проти VEGF, часто призводять до погіршення стану хворого і до кровотеч. Наскільки безпечним може бути використання ангіостатинів у лікуванні?

Таким чином, дисертація Тихомирова А.О. є закінченим науковим дослідженням з експериментального обґрунтування можливості і перспективи використання ангіостатинів як діагностичних та прогностичних маркерів різних патологічних станів, а також можливого молекулярного механізму дії плазміногену на регулювання функціональної активності тромбоцитів та злоякісно трансформованих клітин.



## Висновок

Дисертація Тихомирова Артема Олександровича «Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори клітинних процесів та маркери патологічних станів різного генезу», поданої на розгляд для здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є закінченим, самостійно виконаним науковим дослідженням, яке присвячене експериментальному обґрунтуванню можливості використання ангіостатинів як діагностичних та прогностичних маркерів різних патологічних станів.

Дисертація відповідає вимогам п. 11 Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 (зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Завідувачка лабораторії молекулярних механізмів  
трансформації клітини Інституту експериментальної патології,  
онкології і радіобіології ім. Р.Є Кавецького  
НАН України  
доктор біологічних наук

О.В. Кашуба

