

## ВІДЗИВ ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА



завідувачки кафедри сучасних технологій медичної діагностики та лікування  
Національного медичного університету імені О.О.Богомольця, доктора  
медичних наук, професора **Натрус Лариси Валентинівни** на дисертаційну  
роботу **Тихомирова Артема Олександровича** «*ПРОТЕЇНИ  
ПЛАЗМІНОГЕН/ПЛАЗМІНОВОЇ СИСТЕМИ ЯК РЕГУЛЯТОРИ КЛІТИННИХ  
ПРОЦЕСІВ ТА МАРКЕРИ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ*»,  
що подана для захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних  
наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Система гемостазу вважається найскладнішою саморегуляційною системою організму, яка забезпечує важливу константу гомеостазу – підтримання об'єму циркулюючої крові. За умов порушення цілісності судинної стінки, активується коагуляційний каскад і завдяки цьому призупиняється кровотеча. Традиційно, в академічному середовищі, активація гемостазу асоціюється саме із зупинкою кровотечі на тлі пошкодження судини і формуванням тромбу. Водночас, практичні лікарі, переважно пов'язують порушення в системі гемостазу не стільки із загрозою кровотечі, скільки навпаки, із спонтанним тромбоутворенням, яке може виникати у пацієнта без візуального пошкодження судини, а на тлі певних ендогенних порушень (гіподинамії, ендотеліальної дисфункції, оксидативного стресу, стану гіперкоагуляції тощо). Враховуючи, що вказані порушення можуть виникати без клінічних предикторів, спонтанне тромбоутворення, яке раптово виникає в мозкових або коронарних судинах, складає основну загрозу життя і виводить інфаркти та інсульти на перше місце серед причин смерті населення в усьому світі.

Однак, не слід забувати, що основною причиною виникнення тромбу є відсутність балансу між системою коагуляції та антикоагуляції і своєчасне підключення у цей послідовний сценарій подій – системи фібринолізу. Одже, фібриноліз, якій попереджає утворення фібринового тромба і лізірує його на стадії розчинної молекули, або лізірує залишки фібрину для оновлення



кровотоку в судинному руслі – є фінальною, але вкрай важливою стадією гемостазу.

Фібриноліз в організмі забезпечує система складних біохімічних активацій і перетворень, головну роль в яких відіграє плазміноген/плазмінова система. Її складність через багатокomпонентність, а також складність через невизначеність ряду механізмів, нез'ясованість взаємодії учасників – визначає, на жаль, відсутність ефективних фармакологічних засобів та терапевтичних схем впливу на цей етап гемостазу.

Тому, надана дисертаційна робота, яка присвячена біохімічним основам плазмін/плазміногеновій ланці системи гемостазу, як найскладніших процесів в біології, біохімії, фізіології та клінічній практиці є актуальною та визначає серйозний фундаментальний інтерес.

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

У роботі було використано комплекс різноманітних **методів** для проведення експериментальних досліджень у галузі сучасної біохімії та біомедицини.

В ході роботи автором визначені механізми регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи клітинних процесів за норми та патологічних станів. Вперше досліджено модулювальну дію плазміногену на агрегативну та ангіогенну функцію тромбоцитів та встановлено, що антиагрегативна активність Lys-плазміногену реалізується шляхом інгібування агоніст-індукованої реконструкції актинового цитоскелету тромбоцитів та пригнічення вивільнення з  $\alpha$ -гранул адгезивного протеїну P-селектину. Ангіогенні властивості тромбоцитів обмежуються через пригнічення Lys-плазміногеном агоніст-стимульованої секреції фактору росту VEGF та утворення на плазматичній мембрані фрагментів плазміногену – ангіостатинів, які є потужними інгібіторами ангіогенезу. Встановлено, що



важливу роль у зв'язуванні плазміногену та утворенні з нього ангіостатинів є експонування на поверхні тромбоцитів актину. Запропоновано схему генерування ангіостатинів активованими тромбоцитами за участі активатора урокіназного типу та експонованого на поверхні актину як центра зв'язування плазміногену. На основі одержаних експериментальних даних сформульовано наукове положення про залучення протеїнів плазміноген/плазмінової системи до тромбоутворення, ангіогенезу та репаративних процесів через регулювання функціонального стану тромбоцитів та утворення ангіостатинів.

Одже, отримані експериментальні дані створюють підґрунтя для розроблення новітніх антитромботичних засобів на основі використання Lys-плазміногену для профілактики та лікування станів, асоційованих з гіперфункцією тромбоцитів. Lys-плазміногену завдяки своїм інгібувальним ефектам на секрецію тромбоцитів та обмеженню викиду тромбоцитарного VEGF може знайти застосування в терапії онкологічних хвороб з метою пригнічення ангіогенезу, індукованого в пухлинах.

Рукопис дисертації побудована за класичним планом у вигляді огляду літератури, опису методичних аспектів, результатів власних досліджень та узагальненням отриманих даних, але матеріал викладений у вигляді фундаментальної праці, яка сприймається як монографія за визначеною темою. Вважаю, авторові було б доцільно і оформлювати матеріал для захисту положень саме у формі монографії, а не рукопису. Оскільки, за умов зміненого формату, очікування знайомства із класичною дисертаційною роботою декілька втрачається. Одже, дисертація являє собою величезний манускрипт на 488 сторінок та джерел літератури із 695 найменуваннями.

Об'єм огляду літератури, сягає практично 100 сторінок. Однак, по мірі викладення результатів оригінальних досліджень, автор також додає дуже глибокий екскурс у літературний огляд за напрямком розділу. Тим самим миттєво втрачається враження від аналізу даних отриманих власно дисертантом. Поряд із посиланням на літературні джерела автор наводить ретельний аналіз стану проблеми із висловлюванням багатьох припущень,



думок та гіпотез. Що також унеможливило чітко окреслити – де результати які автор висловлює як свої підсумки, а де припущення та роздуми.

Хоча, структура викладення матеріалу зберігає порядок наведення висновків дослідження в кінці кожного розділу, але їх кульмінаційний момент втрачається через багато висловів попереду.

Основні висновки наведені і в заключенні рукопису, але вони також не є класичним результатом виконання завдань роботи із цифровими даними, а є скоріше констатацією нових аспектів, які автор розглядав під час дослідження.

Важливо підкреслити, що дисертація відображає комплекс окремих досліджень в галузі біохімічних властивостей компонентів, які єднає напрямок «плазміноген/плазмінова система», але зрозуміло, що ці дослідження не планувалися як єдиний системний підхід вирішення проблеми і не виконувалися проспективно згідно плану.

Хочу підкреслити, що висловленні враження від рукопису – це суб'єктивна думка опонента і описана форма наведення результатів дослідження не є перешкодою до обговорення роботи та її оцінки як дисертації на здобуття наукового ступеня доктора наук, оскільки формат рукопису, як і алгоритм виконання досліджень визначається власно дослідником, є результатом креативного мислення, творчості і отримані результати мають оцінюватися виключно із точки зору вирішення проблеми, набуття евристичних даних щодо наукової та практичної новизни. Всі ці властивості рукопис має, і якість дисертаційного дослідження не викликає сумніву.

Також важливо акцентувати на бездоганному методичному підході, ступеню статистичного аналізу даних та їх певній ексклюзивності у підборі та комбінації методів дослідження, як то технологія siRNA, гель-електрофорез, ензим-форез, афінна хроматографія, гель-проникна хроматографія, протокова цитофлуориметрія, конфокальна лазерна сканувальна мікроскопія, спектрофотометрія, ензиматичні методи, методи хімічної модифікації протеїнів, імунохімічні методи: імунізація тварин та отримання імуних сироваток, імуно-ензимний аналіз, імуноблотинг, імуноцитохімія,



імуногістохімія, методи клітинної біології, культивування клітинних ліній тощо.

Отриманий матеріал викладений класичною науковою мовою, хоча є багато англіцизмів, та складних речень, а також виразів які б варто було спростити або замінити україномовними аналогами: «кринглових доменах», «ділянки апоптотичних блеббів», або невдалі в даному контексті – сформований «постулат» - краще – «концепція», «драматичне зростання» - зазвичай «драматичне» вживається до «падіння, зменшення, втрати», і т.п.

Весь рукопис дисертації та автореферату має єдиний стиль, але, як було вже сказано, сприйманню матеріалу суттєво заважає значний об'єм та величезна кількість посилань на літературні джерела.

Хочу підкреслити, що не зважаючи на ряд стилістичних зауважень, до наукового сенсу дисертаційної роботи принципових заперечень не має.

**У процесі ознайомлення із матеріалами виникли запитання, які пропонуються для дискусії:**

1. Отримані автором результати свідчать про те, що один зі шляхів обмеження Lys-плазміногеном агрегативної активності тромбоцитів та їхніх адгезивних властивостей реалізується через модулювання цим протеїном вивільнення тромбоцитарних  $\alpha$ -гранул та пригнічення агоніст-індукованого експонування P-селектину.

*Як це впливає на властивості тромбу? зменшує або збільшує його міцність і які впливи фармакологічні можуть реалізовуватися через цей механізм?*

2. МТТ-тест використовувався як додатковий, альтернативний агрегатометрії, підхід для оцінки життєздатності тромбоцитів та їх клітинного метаболізму.

В ході дослідження за умов впливу агоністів (тромбіну або колагену) було отримано протилежні результати. При стимуляції тромбоцитів тромбіном спостерігалось практично дворазове зростання метаболічної активності клітин, то вплив колагену призвів до пригнічення метаболічних процесів.



*Чому виникає така різниця? І як це пов'язати із відомим однонаправленим підсиленням агрегації під дією цих стимуляторів?*

3. У роботі досліджується механізм апоптозу клітин A549 через мітоптоз і маркером виступає протеїн ВаХ. На рисунку вказана -мол. м. 23 кДа., значить це свідчить про ідентифікацію ВаХ мономеру, якій має 20 кДа? Адже мономер є неактивним, а активує утворення пор в мембрані мітохондрій лише його форма димеру із мол.м 40 кДа.

Результати, отримані в дисертаційному дослідженні, свідчать на користь здатності клітин A549 проявляти резистентність до плазмін-індукованого апоптозу/аноікісу за створених експериментальних умов.

*Можливо, що зменшення рівня Вах клітин A549 є не «одним з факторів виживання», а навпаки ознакою його – олігомеризації? і все ж таки загибелі?*

4. В роботі висвітлені деякі суперечливі дані щодо маркера малігнізації зони проліферативного росту на тлі запалення. З одного боку показано, що наявність запальних та проліферативних процесів супроводжується зменшенням вмісту плазміногену та ангіостатину в тканинах міоми, що свідчить про активізацію ангіогенезу та малігнізацію. З іншого - висвітлені дані про рівень плазміногену в кістозних вузлах, що у 4,4 рази перевищував його вміст в умовно нормальній тканині, а кількість ангіостатину перевищувала рівень втричі.

*Як оцінювати маркери ангіогенезу в зоні проліферації?*

5. За даними автора - загоєння хронічних ран не відбувається навіть за наявності значних кількостей судинного фактору росту. На підставі отриманих результатів автор пропонує висунути гіпотетичний механізм інактивації VEGF-індукованого проангіогенного стимулу у хронічних ранах. Провідну роль у цьому можуть відігравати ангіостатини, які, ініціюючи пошкодження мітохондрій ендотеліоцитів та активуючи апоптотичні сигнальні шляхи у цих клітинах, функціонують як ефективні антагоністи VEGF.



*На основі яких даних висловлюється припущення про участь мітохондрій ендотеліоцитів? Чому не припустити, що до регуляції залучені інші клітини крові, наприклад?*

6. Автор припускає, що надпродукція ангіостатинів у тканинах хворих із ССЗ може бути наслідком активації протеолітичних систем, що супроводжується *інтенсивною деградацією плазміногену міжклітинного матриксу*. Можна припустити, що деструктивні процеси в міокарді, стінці аорти та ділянках пошкодження судин є головними джерелами надходження ангіостатину до системного кровообігу.

*Чому виникла така думка оскільки не досліджували деструктивні процеси в міокарді, стінці аорти та ділянках пошкодження судин?*

7. В таблиці «Вплив статинової терапії на деякі біохімічні показники в сироватці крові пацієнтів з ішемічною хворобою серця» вказано зміна вмісту загального холестеролу у здорових осіб та пацієнтів з  $6,26 \pm 0,16$  ммоль/л до  $0,33 \pm 0,06$  ммоль/л, можливо це технічна помилка?

## ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Тихомирова Артема Олександровича «Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори клітинних процесів та маркери патологічних станів різного тенезу», що подана для захисту на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія, є завершеною науково-дослідною працею, у якій представлені результати комплексного дослідження механізмів регулювання протеїнами плазміноген/плазмінової системи функціонального стану тромбоцитів та процесів, асоційованих з виживанням та міграцією/інвазією пухлинних клітин, а також визначено значення фрагментів плазміногену (ангіостатинів) як маркерів патологічних станів. Вперше встановлено, що

зміни рівня ангіостатинів у тканинах та крові супроводжують розвиток доброякісних новоутворень матки та грудної залози, ускладнень цукрового діабету та серцево-судинних захворювань, що відкриває перспективи використання цих протеїнів у клінічній діагностиці.

Дисертаційна робота Тихомирова Артема Олександровича «Протеїни плазміноген/плазмінової системи як регулятори клітинних процесів та маркери патологічних станів різного тенеузу» за своєю актуальністю, методичним рівнем, обсягом виконаних досліджень, новизною отриманих даних, висновкам **відповідає** п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 року зі змінами, внесеними згідно постанови Кабінету Міністрів України № 656 від 10.08.2015 року та №1159 від 30.12.2015 року, щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук, **а автор заслуговує** на присудження їй наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Завідувачка кафедрою  
сучасних технологій медичної діагностики  
та лікування НМУ імені О.О.Богомольця,  
д.мед.н., професор

 Л.В.Натрус

Підпис д.мед.н., проф. Натрус Л.В., засвідчую

Вчений секретар  
НМУ імені О.О. Богомольця,  
к.мед.н.



Р.С. Паливода