Голові спеціалізованої разової
вченої ради
при Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
доктору біологічних наук, с.н.с.,
завідділу хімії та біохімії
ферментів Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна
НАН України
Артему ТИХОМИРОВУ

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, завідувача лабораторії біохімії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломійченка НАМН України» Сергія ВЕРЬОВКИ на дисертаційну роботу Анастасії Вадимівни УДОВЕНКО «Регулювання активності тромбіну і плазміну в процесі формування і розчинення згустку в плазмі крові людини», що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія, 09 – Біологія.

Актуальність дисертаційної роботи.

Гемостатична система крові забезпечує її рідкий стан та запобігає крововиливу у випадку порушення цілісності судин. Вона складається з двох підсистем - зсідання крові та фібринолізу, що знаходяться між собою та багатьма іншими системами організму у складних взаємовідносинах. Активація процесу зсідання крові відбувається двома каскадними шляхами за участі цілої низки факторів. Не менш складним шляхом відбуваються активація ферментативного розщеплення фібрину, причому останній водночас є й субстратом і ключовим кофактором процесу. Заслуговують уваги значення структури фібринового згустку, роль компонентів розщеплення фібрину, участь останніх в формуванні зворотних зв'язків між окремими ланками компонентів гемостатичної системи.

З'ясування цих питань потребує не лише глибокого ознайомлення з сучасними уявленнями про механізми функціонування системи, але й застосування та істотного удосконалення відповідних дослідницьких методів. Зокрема, незважаючи на багаторічні дослідження лишається відкритим питання про зміни активності плазміну протягом розчинення фібринового згустку. Для отримання обґрунтованої відповіді на це питання необхідно істотне удосконалення існуючих методів оцінки активності плазміну та їх комплексного застосування по відношенню до різних за своєю природою субстратів.

Мета даної роботи полягала в дослідженні зв'язків між процесами генерації активності тромбіну і плазміну та формуванням і розчиненням фібринового згустку в плазмі крові. Для досягнення цієї мети було сформульовано низку практичних завдань, а саме:

- розробку та удосконалення турбідиметричного методу визначення активності тромбіну та плазміну;

- з'ясування ролі фібриногену і фібрину в ініціації процесів системи зсідання крові;

- удосконалення способу розрахунку активності і концентрації тромбіну;

- дослідження зв'язків між активністю тромбіна та активністю плазміна протягом формування та розчинення фібринового згустку;

- дослідження зв'язків між діаметром та кількістю протофібрил у фібрилі при утворенні згустку.

- характеристика стану системи гемостазу у опікових пацієнтів.

Подібна деталізація завдань видається цілком виправданою і заперечень не викликає.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота побудована за традиційною схемою і містить анотацію, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, заключний розділ та

висновки, список використаних джерел, що містить 139 посилань - переважають публікації останніх років.

Огляд літератури свідчить про належне ознайомлення автора з ключовими питаннями задуманого дослідження. Наведено дані про ключові механізми гемостазу, зокрема ретельно розглянуто системи зсідання крові та фібринолізу, механізму розчинення фібринового згустку, розглянуто ролі власне фібринового згустку в регуляції балансу між зсіданням та розчиненням фібринового згустку. Ознайомлення з літературним оглядом роботи дозволяє зробити висновок про належне занурення пошукувачки в досліджувану проблему.

Методична частина роботи містить широкий набір сучасних препаративних та дослідницьких методів. Отримано препарати ключових компонентів досліджуваних систем та проведено їх оцінку щодо чистоти та активності. Рівень виконання препаративної частини роботи заслуговує на схвалення, однак ще більшого схвалення заслуговують методи турбідиметричного дослідження процесів зсідання фібринового згустку та розчинення останнього. Вірніше сказати – творчий розвиток цього класичного методу, його комплексного застосування з методами, що гуртуються на застосуванні хромогенних субстратів і, що варто підкреслити, створеними при виконанні роботи підходами до оцінки отриманих експериментальних даних. Оцінка структури утворюваних фібринових згустків за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії також повною мірою відповідає поставленим завданням роботи.

Отримані наукові результати істотно поглиблюють існуючі уявлення щодо механізмів утворення фібринового згустку та його лізису. Варто підкреслити й їх великий практичний потенціал. Встановлено, що тривимірна фібрилярна структура фібринового згустку є ключовим чинником ефективної генерації тромбіну на стадії ініціації коагуляції та забезпечує перехід системи до фази ампліфікації. Показано, що фібриновий згусток виконує функцію локального депо тромбіну, захищаючи ензим від інактивації інгібіторами плазми та підтримуючи його концентрацію,

необхідну для активації факторів V, VIII і XI та подальшої стабілізації згустку. Встановлено часовий взаємозв'язок між завершенням формування фібрилярної структури згустку і початком активації фібринолізу, що свідчить про координовану взаємодію коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу. Показано, що механізми формування та латеральної асоціації протофібрил обмежують формування фібринолітичних комплексів усередині структури згустку та зміщують активацію плазміногену на поверхню фібрил. Отримані результати свідчать про конкурентний характер взаємодії між процесами формування фібрилярної структури фібрину та активації фібринолізу. Виявлено, що параметри структурної організації фібрил залежать від шляху ініціації зсідання та можуть визначати механічні властивості й чутливість згустку до фібринолізу. Розроблено та модифіковано методичні підходи до кількісного визначення активності тромбіну, плазміну та концентрації тромбіну в межах тромбограми, що розширює можливості оцінки динамічного балансу між процесами зсідання і фібринолізу в плазмі крові.

Розроблено методи визначення активності тромбіну та плазміну, що дають можливість кількісно визначити коагуляційну компоненту активності тромбіну на стадії ініціації активації системи зсідання і фібринолітичну активність плазміну в момент повного розчинення згустку. Істотно удосконалено турбідиметричний метод оцінки формування та лізису фібринового згустку, розширено його інформативні можливості. Показано роль тривимірної структури полімерного фібрину в процесі активації протромбіну на стадії ініціації активації системи зсідання. Виявлено вкрай цікавий і, як на мою думку, недооцінений факт спалаху активності тромбіну протягом лізису фібринового згустку. Обґрунтовано положення про конкуренцію компонентів формування згустку з компонентами системи фібринолізу за фібрили згустку. Запропоновано механізм формування структури згустку, що гальмує активацію ендогенної фібринолітичної системи і витісняє фібринолітичний процес на поверхню фібрил згустку.

Отримані при виконанні роботи експериментальні дані обчислено належним чином, а зроблені на їх підставі висновки принципових зауважень не викликають, хоча й могли б бути істотно розширені. Рівень опублікованості наукових здобутків повною мірою відповідає існуючим вимогам: опубліковано ***7 робіт, серед яких 5 статей в фахових наукових виданнях, що представлені в базах Scopus, та 2 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях.***

Питання та зауваження. Принципових зауважень до роботи немає. Як на мою думку, отримані дані щодо змін показників амідолітичних активностей плазміну та тромбіну від перебігу процесів утворення та лізису фібринового згустку явно недооцінені пошукувачкою як з точки зору механізмів цих процесів, так і їх можливого діагностичного значення. Трактовка ролі фібринового згустку як депо надлишку тромбіну є щонайменше дискусійною. Щирий жаль викликає обмеження застосування розроблених методів двома ***пацієнтами з опіками,*** хоча інформативний потенціал створеного комплексного методу явно вартий значно більш широкого вжитку.

Також хотілось би отримати відповіді здобувачки на наступні питання:

- Чому виникла потреба в розробці нового методу визначення коагуляційної активності тромбіну і амідолітичної активності плазміну, оскільки такі методи існують і існують прилади для визначення часу зсідання плазми крові?

- Чим Ви пояснюєте співпадіння моменту спалаху активності тромбіну і початку розчинення фібринового згустку? Чи є функціональний зв'язок між ними, чи це випадковість?

- Наскільки реальним є застосування турбідиметричного методу визначення кількості протофібрил у фібрилі фібринового згустку як характеристики його фібринолітичної стабільності у недалекому майбутньому.

- Чи не перевіряли Ви відношення часу зсідання плазми крові до часу її розчинення як потенціальний показник рівноваги між формуванням і розчиненням згустку в плазмі крові?

Висновок. Оцінюючи роботу в цілому, маю підкреслити її високий науковий та методичний рівень, актуальність поставлених завдань та обґрунтованість висновків. Представлені результати є оригінальним дослідженням, виконаним самостійно і, що варто підкреслити, з великим науковим та практичним потенціалом.

З наведених міркувань вважаю, що дисертаційна робота Удовенко Анастасії Вадимівни «Регулювання активності тромбіну і плазміну в процесі формування і розчинення згустку в плазмі крові людини» являє собою завершене цілісне наукове дослідження, що повною мірою відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України "Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії" від 12 січня 2022 р., № 44, а здобувач заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Офіційний опонент – доктор біологічних наук, професор, завідувач лабораторії біохімії ДУ "Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України"

С.В. Верьовка

Підпис С.В. Верьовки
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. відділом кадрів

ВІДДІЛ КАДРІВ