РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу
Анастасії УДОВЕНКО
«РЕГУЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ ТРОМБІНУ І ПЛАЗМІНУ В ПРОЦЕСІ ФОРМУВАННЯ І РОЗЧИНЕННЯ ЗГУСТКУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЛЮДИНИ»,
яка подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії
у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія
к.б.н., наукового співробітника відділу структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
Володимира ГРИЩУКА

Актуальність дисертаційної роботи.

Система гемостазу є важливою складовою частиною гомеостазу. Її основною функцією є збереження балансу між процесами зсідання крові та фібринолізу, що, у свою чергу, забезпечує ефективний кровообіг та швидке припинення кровотечі у разі порушення цілісності судин. Розлади системи гемостазу часто є важливою ланкою патогенезу різноманітних за етіологією та клінічними проявами патологій, а також фактором, що впливає на перебіг захворювання та процес одужання пацієнта

Надзвичайно актуальним було відтворення цілісної картини динаміки ініціації, ампліфікації та завершення формування структури фібринового згустку в плазмі крові, з'ясування ролі тромбіну на усіх стадіях його формування, з'ясування зв'язку між формуванням структури згустку і активацією фібринолітичної системи та динамікою зміни активності плазміну в ході розчинення згустку. Оскільки в процесі активації системи гемостазу активація систем зсідання крові і фібринолізу відбувається неодночасно, а для активації фібринолітичної системи необхідна структура фібринового згустку, яка здатна утворитися тільки на заключній стадії формування фібрилярної структури згустку, важливим було питання локалізації структур в згустку, на яких формуються активаційні тріади фібринолітичної системи – Glu-Pg-фібрин-t-PA, та молекулярний механізм їх формування.

Розробка методу отримання плазмінограм для визначення активності плазміну в процесі формування і розчинення фібринового згустку в плазмі крові

є перспективною для характеристики стану системи гемостазу в цілому та фібринолізу зокрема.

Дослідження процесів, які лежать в основі формування і розчинення фібринових згустків, аналізу зв'язків між формуванням і розчиненням згустку та активацією протромбіну і плазміногену які характеризують коагуляційну компоненту активності тромбіну і фібринолітичну активність плазміну на момент повного розчинення згустку в плазмі крові людини є надзвичайно важливим для розуміння функціонування системи гемостазу за норми та різних патологічних станів. Для дослідження динаміки формування структур фібринового згустку було використано турбідиметричні методи аналізу, визначення амідазної активності тромбіну і плазміну у часі – тромбограми для активності тромбіну та плазмінограми для активності плазміну, які дозволяють відслідковувати активності ензимів в процесах формування і розчинення фібринового згустку та визначати загальний гемостатичний потенціал. Саме використання такого підходу дозволило дисертантці проаналізувати стан системи гемостазу у хворих з різним ступенем опікових травм.

Тому дисертаційна робота Анастасії УДОВЕНКО є актуальною та має не лише фундаментальну, а й прикладну спрямованість. Самі дослідження, викладені у дисертаційній роботі, беруть за мету дослідження зв'язку між генерацією активності тромбіну і плазміну та формуванням і розчиненням фібринового згустку у плазмі крові людини.

Наукова новизна одержаних результатів.

Встановлено, що тривимірна структура фібринового згустку на стадії ініціації активації системи зсідання необхідна для забезпечення швидкої і ефективної генерації тромбіну та переходу системи в стадію ампліфікації. Сформульовано гіпотезу про механізм підтримання балансу між формуванням та розчиненням структури фібринового згустку в плазмі крові людини. Показано зв'язок у часі між закінченням формування фібрил фібринового згустку і початком ініціації активації системи фібринолізу на них. Припускається, що фібрили є тими структурами на яких реалізується баланс між системами зсідання та розчинення згустку плазми крові. Вперше висловлено думку про те, що

механізм взаємодії сайтів полімеризації фібрину desA функціонує таким чином, що в процесі згортання останнього, йде конкурентне витіснення компонентів фібринолітичної системи на поверхню сформованих фібрил згустку, де вони створюють активаційні тріади Glu-Pg–фібрин–Glu-Pm, які запускають механізм фібринолізу.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено метод визначення активності тромбіну, використовуючи коагуляційну компоненту активності ензиму в плазмі крові. Сформульовані нові уявлення про умови рівноваги процесів зсідання і розчинення згустку, які дають ширшу можливість вибирати ефектори для регуляції балансу між системою зсідання та системою розчинення структури згустку та перевірити експериментально межі їх застосування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 0124U000251. Дослідження та пошук способів регуляції молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення.

Апробація результатів дисертації.

Дисертант представив результати виконання дисертаційної роботи на 5 міжнародних та вітчизняних конференціях.

За результатами роботи опубліковано 5 статей, зокрема в журналах Q2-Q4.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота має загальноприйняту структуру, яка включає анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, заключний розділ та висновки, список використаних джерел, що містить 144 посилання, додаток. Дисертаційна робота викладена на 149 сторінках, містить 36 рисунків та 15 таблиць.

Основні результати дисертаційної роботи. Метою роботи було дослідження зв'язку між генерацією активності тромбіну і плазміну та формуванням і розчиненням фібринового згустку у плазмі крові людини.

Відповідно до мети було сформульовано шість основних завдань, які було успішно завершено, використовуючи наступні методи: спектроскопія,

турбідиметрія, електронна мікроскопія, ІФА, виділення і очистка білків, електрофоретичний та ензиматичний аналіз тромбіну і плазміну, метод аналізу генерації тромбіну (TGA), метод аналізу генерації плазміну (PGA), метод аналізу параметрів турбідиметричних кривих формування і розчинення згустків плазми крові, денситометрія з використанням програмного забезпеченням Image, метод розрахунку діаметру, маса-довжина відношення і кількості протофібрил у фібрилі фібринового згустку.

Спершу автором було накопичено дані по визначенню активності тромбіну і плазміну в плазмі крові людини з застосуванням турбідиметричної кривої формування і розчинення згустку. Визначення швидкості утворення і активності тромбіну проводили на основі параметру τ, а плазміну – вимірюючи безпосередньо в кюветі його амідазну активність в момент повного розчинення згустку. Використання параметру τ турбідиметричної кривої формування і розчинення згустку дозволив визначати концентрацію протромбіну, що активувався у тромбін, і середню швидкість активації протромбіну в плазмі крові, зсідання якої ініціює АЧТЧ реагент.

Активність утвореного плазміну визначали в момент, коли тривимірну структуру згустку було повністю зруйновано, і оптична густина досягла нульового значення, а не за часом напівжиття згустку, що дозволило отримати більш точні результати. Запропоновані методи дозволяють на рівні активності ензимів охарактеризувати стан системи гемостазу людини в нормі та за різних патологій.

Надалі авторка запропонувала удосконалити метод аналізу генерації тромбіну для розрахунку активності і концентрації тромбіну в процесі формування і розчинення фібринового згустку. В ході роботи, порівнюючи стадії формування згустку, а саме формування протофібрил, їх латеральну асоціацію та формування фібрилярної структури та фазу ініціації активації протромбіну, було виявлено, що закінчення формування структури згустку збігається з початком прискорення генерації тромбіну. Запропонований підхід, дозволив визначити концентрацію та прослідкувати динаміку активності тромбіну в кожний момент реакції формування фібринового згустку.

Надалі було поставлено завдання з'ясувати роль фібриногену і фібрину як кофакторів тромбіну в процесі активації системи зсідання плазми крові.

Було показано, що генерація тромбіну різко прискорюється в обох системах ініціації зсідання крові – після закінчення формування структури згустку, що свідчить про зв'язок у часі між генерацією тромбіну та стадіями формування згустку в плазмі крові людини, зсідання якої ініціює TF або АЧТЧ реагент, і в свою чергу може вказувати на участь фібриногену і фібрину в регуляції ініціації активації протромбіну. За час латеральної асоціації протофібрил та завдяки високій спорідненості тромбіну до фібрину, що формується та сформованого у згусток, генерований тромбін насичує ділянки зв'язування на фібринових фібрилах згустку, перетворюючи його на депо тромбіну і починає вивільнятися у міжфібрилярний простір згустку, викликаючи сплеск амідазної активності. Таким чином показано, що фібриноген і фібрин послідовно і у різних формах регулюють ініціацію активації системи зсідання.

Для з`ясування ролі структури полімерного фібрину у ініціації генерації тромбіну, було використано високоспецифічний інгібітор формування полімерного фібрину GPRP пептид. За рахунок цього дослідження було показано, що комплекси TF-FVIIa-FXa і FIXa-FXa в плазмі крові у відсутності полімерного фібрину (згустку) є слабкими активаторами генерації тромбіну, хоча саме за рахунок включення цих комплексів йде виплеск активності тромбіну, що необхідно для завершення формування згустку і тромбу. Було показано, що інгібувальна дія субстрату S2238 та продуктів його гідролізу проявляється тільки на рівні формування протофібрил. Електронно-мікроскопічні дослідження згустків показали, що формування структури згустку тільки гальмується, а товщина фібрил та частота їх галуження змінюється не суттєво.

Таким чином, було виявлено зв'язок між активністю (концентрацією) тромбіну і стадіями формування фібринового згустку. Показано, що на етапі ініціації тромбін трансформує фібриноген у фібрин і тому не проявляє амідазної активності, а на стадії ампліфікації – перемикається на активацію факторів VIII, V і XI, що супроводжується спалахом амідазної активності. Встановлено, що

інгібуюча дія субстрату S2238 та продуктів його гідролізу проявляється тільки на рівні формування протофібрил.

В подальшому авторкою було досліджено зв'язок між активністю плазміну і формуванням та розчиненням фібринового згустку. Було показано, що для стадії ініціації і ампліфікації характерна пауза активації плазміногену, що є необхідною умовою для стабілізації структури згустку. Після досягнення точки балансу вирішується доля згустку: чи почнеться його розчинення плазміном, чи згусток залишиться стабільним. Було показано, що у системі з АЧТЧ реагентом і з тканинним фактором величини точок балансу співпадають.

Також було проведено розрахунок діаметру та маса/довжина відношення фібрил фібринового згустку та було показано, що для плазми крові, зсідання якої ініціюється АЧТЧ реагентом, TF або тромбіном, визначені величини d і μ параметрів знаходяться в межах, описаних в літературі. Знайдено, що у плазмі, зсідання якої ініціюється АЧТЧ реагентом, формуються фібрили більшого діаметру з найбільшою щільністю протофібрил. У плазмі, зсідання якої ініційоване тромбіном, формуються найтовщі фібрили з найменшою щільністю протофібрил. Показано, що в плазмі крові зі скороченням шляху активації системи зсідання від АЧТЧ, TF до тромбіну збільшується діаметр фібрил проте зменшується в них кількість протофібрил і величина маса/довжина параметру. Висловлено припущення про те, що параметр щільність протофібрил у фібрилі, який вказує на механічну міцність і стійкість до фібринолізу згустку, потенційно може бути використаний для діагностичних цілей.

Наступним завданням було охарактеризувати стан системи гемостазу у пацієнтів з опіковою травмою, використовуючи запропоновані в даній роботі підходи. Було показано, що параметри турбідиметричної кривої корелюють з вмістом молекулярних маркерів стану системи зсідання крові і фібринолізу у пацієнтів з опіковою травмою.

Зауваження та питання.

1. У вступі логічніше було б об’єднати завдання 4 і 5 в одне.

2. В огляді літератури присутні неточності перекладу, але вони не впливають на розуміння контексту.
3. Нумерація формул, рисунків і таблиць не відповідають вимогам до оформлення дисертацій. Бажано зробити наскрізну нумерацію, відповідно до нумерації розділів.
4. В розділі матеріали і методи потрібно вказати хто надав плазму крові пацієнтів.
5. В розділі матеріали і методи некоректно описаний метод – Денситометрія у програмі ImageJ.
6. На рисунку 14 не вистачає порівняння із нормальною плазмою, а не лише дефібринованою.
7. У графіках із результатами турбідиметричних досліджень некоректно підписані осі Y.
8. У розділі 3.6 описати плазму крові яких пацієнтів і звідки аналізували, ким була надано плазму.
9. Рисунки 30 А і 30 Б, 31 А і31 Б, 32 А і 32 Б, 33 А і 33 Б розділити на різні рисунки з незалежною нумерацією.
10. Таблиці 8 А і 8 Б, 9 А і 9 Б, 10 А і 10 Б, 11 А і 11 Б розділити на різні таблиці з незалежною нумерацією.
11. В таблицях 8 – 11 варто надати референтні значення для розуміння динаміки стану системи гемостазу.
12. У кінці кожного підрозділу Розділу 3 варто робити локальні узагальнюючі висновки, які логічно будуть завершувати результати досліджень і давати перехід до наступного підрозділу.
13. Висновки мають бути більш чіткими і відповідати отриманим результатам.
14. Текст дисертації потребує редагування та виправлення орфографічних та граматичних помилок.
15. Список використаних джерел потребує уніфікації за одними вимогами.

16. Після списку використаних джерел відсутній Додаток 1, в якому вказуються публікації дисертантки, згідно існуючих вимог до оформлення дисертацій на здобуття ступеня доктору філософії.

Питання 1: Як ви вважаєте яка перспектива впровадження визначення ЗГП в рутинну практику і що для цього потрібно зробити?

Питання 2: Яке відношення величин параметрів ТДК плазми крові пацієнтів до таких у донорів можна вважати ідеальними (референтними) і як можна інтерпретувати зміну відношення кожного параметру?

Втім, наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність представленого дисертаційного дослідження. Результати, що отримано в дисертаційній роботі, істотно розширюють існуючі практичні та теоретичні знання про біохімічні механізми функціонування системи гемостазу.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Анастасії УДОВЕНКО «РЕГУЛЮВАННЯ АКТИВНОСТІ ТРОМБІНУ І ПЛАЗМІНУ В ПРОЦЕСІ ФОРМУВАННЯ І РОЗЧИНЕННЯ ЗГУСТКУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЛЮДИНИ» за актуальністю, методичним рівнем, об'ємом та новизною отриманих експериментальних результатів, особистим внеском здобувача та науково-практичним значенням відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії, скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р. (№ 44) та може бути представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Науковий співробітник
відділу структури і функції білка
Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України Володимир ГРИЩУК

Підпис Грищука
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
Ідентифікаційний код 05417288