

Голові спеціалізованої вченої ради  
при Інституті біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України  
доктору біологічних наук,  
завідувачу відділом нейрохімії  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України  
Тетяні БОРИСОВІЙ

## **ВІДГУК**

офіційного опонента, кандидата біологічних наук,  
старшого дослідника, асистента кафедри біохімії  
ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
Тетяни ГАЛЕНОВОЇ

на дисертаційну роботу Олексія ГРАБОВСЬКОГО на тему  
«Структура, функції та молекулярні механізми інгібування  
активних сайтів ключових протеїнів гемостазу»,  
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії  
з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія

Детальний аналіз дисертаційного дослідження Олексія Грабовського «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу» дозволяє сформулювати наступні узагальнені висновки щодо актуальності, ступеня обґрунтованості основних наукових положень, висновків, рекомендацій, достовірності, наукової новизни, а також загальної оцінки роботи.

**Актуальність обраної теми дослідження.** Система гемостазу є важливою складовою частиною гомеостазу. Її основною функцією є збереження балансу між процесами згортання 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. Тому розуміння тонких механізмів згортання крові та фібринолізу є

запорукою ефективної терапії патологічних станів, розвиток яких обумовлений порушеннями системи гемостазу.

Дисертаційна робота Олексія Грабовського має не лише фундаментальну, а й прикладну спрямованість. З одного боку, детальне вивчення структури та функцій сайтів полімеризації фібриногену, активних центрів фактора Ха та урокінази є необхідним для деталізації механізмів міжмолекулярних взаємодій протеїнів в системі гемостазу та визначення нових мішеней впливу ефекторних молекул. З іншого боку, не менш вагомою є прикладна складова даного дослідження, що пов'язана з вивченням впливу потенційних сполук-інгібіторів процесу полімеризації фібрину та активності окремих факторів, зокрема Ха та урокінази. Встановлення структур та механізму дії ефективних молекул-інгібіторів відкриває нові можливості вирішення наукових і практичних задач біохімії та медицини, пов'язаних з функціонуванням системи гемостазу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Представлена робота містить результати експериментальних досліджень, які було виконано протягом 2019-2023 рр. у відділах структури та функції білка і сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, теми та номери держреєстрації наведені у «Вступі» дисертації: 0122U002132 «Ідентифікація сайтів міжмолекулярних взаємодій фібрин(оген)у», 2022-2023 рр.; 0119U002512 «Взаємодії компонентів системи гемостазу на клітинному та молекулярному рівні в процесі формування та елімінації тромбу», 2019-2023 рр.; 0115U003650 «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих антифібринолітичних та антитромботичних агентів», 2015-2019 рр.; 0120U102682 «Вивчення нового механізму галуження протофібрил, що відбувається у процесі формування тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу», 2020 р.

**Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків сформульованих у дисертації.** Аналіз змісту дисертаційного дослідження Олексія Грабовського та опублікованих наукових публікацій дозволяє стверджувати, що наукові положення, висновки і рекомендації представленої

наукової роботи мають достатнє теоретичне та методологічне обґрунтування. Поставлені завдання, об'єкт, предмет та мета дослідження у повній мірі відповідають темі представленої дисертації.

Для досягнення поставленої мети, яка полягала в дослідженні структури, функцій та способів інгібування сайтів міжмолекулярних взаємодій таких ключових сайтів мішеней: центрів полімеризації фібриногену, активного центру фактора Ха та урокінази, автором було визначено п'ять основних дослідницьких завдань, які є взаємопов'язаними, відображають зміст роботи і послідовно розв'язуються в ході наукового дослідження. Вдалим виявився також підбір методів дослідження, використаних для реалізації мети та завдань дисертаційної роботи, більше того поєднання методів *in silico* та *in vitro* дало змогу якнайглибше розкрити обрану тему дослідження.

**Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів.** Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки проведена дисертантом робота є достатньо комплексною, всебічною, виконана на високому науковому рівні. Застосовані в роботі методи дозволили підтвердити висунуті дисертантом гіпотези. Отримані результати є якісними і не містять ознак підробки.

**Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень і одержаних результатів.** На підставі проведеного аналізу дисертаційного дослідження Олексія Грабовського можна зробити висновок, що наукові положення, висновки і рекомендації, які сформульовані у дисертації, є достовірними, містять усі елементи новизни та мають науково-практичну цінність для галузі знань з біології. Погоджуючись в цілому із сформульованими в дисертаційному дослідженні конкретними положеннями, які визначають наукову новизну отриманих результатів, особливо наголошу на окремих з них, що, на мою думку, є найбільш важливими і вагомими. Так, автором було запропоновано та науково-обґрунтовано додаткову модель галуження протофібрил фібрину, що, на відміну від моделей тетрамолекулярного галуження або простого розгалуження

латерально-асоційованих протофібрил, нагадує модель тримолекулярного галуження. Проте, відмінність цієї моделі полягає в залученні D-регіону однієї протофібрили до DDE-тріади іншої. Дисертантом вперше було ідентифіковано сайт на молекулі фібрину, який комплементарний сайту в шарнірній ділянці фібрину. При латеральній асоціації протофібрил ці сайти, взаємодіючи, додатково стабілізують надмолекулярну структуру. За допомогою специфічних пептидів було підтверджено роль суперспіральних ділянок в другій стадії полімеризації фібрину.

**Практичне значення одержаних результатів.** Практичне значення одержаних дисертантом результатів полягає у встановленні структур інгібіторів урокіназного активатора плазміногену та фактора Ха, які можуть бути використані як інструмент в лабораторних дослідженнях або як терапевтичні засоби після подальшого їх випробування та доопрацювання. Отримані результати щодо ефекторної дії специфічних пептидів та сполук каліксаренового ряду можуть стати відправною точкою для розроблення на їх основі нових антитромботичних препаратів.

**Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.** Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації в повній мірі відображені у 8 опублікованих статтях у наукових закордонних і фахових виданнях України та у 2 патентах. Публікації як за кількістю, так і за якістю відповідають нормативним вимогам. Основні положення і висновки роботи пройшли апробацію на міжнародних науково-практичних конференціях, а також через опублікування тез доповідей, які висвітлюють дисертаційні результати на численних загальноукраїнських і міжнародних конференціях з питань проблемного поля тематики дослідження.

**Структура дисертації.** Структура дисертаційного дослідження відзначається логічною побудовою викладення матеріалу; узагальнення за розділами є достатньо обґрунтованими та репрезентованими в загальних висновках дисертації. Робота складається із двох анотацій (українською та англійською мовами), огляду літератури, матеріалів і методів дослідження,

результатів досліджень з їх обговоренням, викладених у 5 розділах, заключення, висновків, списку використаних літературних джерел (134 позицій). Загальний обсяг дисертації становить 168 сторінок, із них 128 – основного тексту. Дисертація містить 65 рисунки та 4 таблиці.

В *анотації* автор стисло виклав основні положення та результати досліджень дисертаційної роботи.

*Вступ* дисертації розкриває актуальність обраного наукового напрямку та обґрунтовує доцільність проведення досліджень. Мета і завдання досліджень сформульовані чітко, логічно та послідовно.

В *огляді літератури* узагальнені та систематизовані наукові дані, що стосуються системи гемостазу в цілому (Розділ 1), описано основні аспекти процесу полімеризації фібрину (Розділ 2), окремий акцент зроблено на висвітленні сучасної інформації, щодо механізмів інгібування окремих факторів системи гемостазу, зокрема фактора Ха та урокіназного активатора плазміногену (Розділ 3). Дисертантом досить ретельно опрацьовано велику кількість наукових літературних джерел вітчизняних та закордонних авторів за останні 10 років. Усі використані дані мають посилання на відповідне джерело. В цілому, огляд літератури написаний гарною науковою мовою і є теоретичною підставою для подальших досліджень. Огляд літератури викладений на 22 сторінках друкованого тексту. *Зауважень до розділу немає.*

У *розділі 4* «Матеріали та методи дослідження», викладеному на 14 сторінках, автор детально описує всі методи та методологічні підходи, які використовувались у дисертаційній роботі, із посиланням на джерело методу. Слід зазначити, що всі застосовані методи дослідження підібрані раціонально, підпорядковані загальній меті та завданням дослідження, є інформативними та сучасними. Розділ написаний чітко та логічно.

*Зауваження до розділу:*

У підрозділі 4.2.20 «Статистичний аналіз», автор не розкрив деталей щодо алгоритму проведення статистичного аналізу, не конкретизував методи, які були використані для порівняння одержаних результатів та встановлення значущих різниць між дослідними групами.

Наступні п'ять розділів висвітлюють одержані автором результати.

У **розділі 5** «Дослідження міжмолекулярних взаємодій у DDE-тріаді з використанням D-димеру та D-фрагменту фібрин(оген)у» наведені результати дослідження міжмолекулярних взаємодій у DDE-тріаді з використанням D-димеру та D-фрагменту фібрин(оген)у. Показано залучення центрів полімеризації b:V для комплексоутворення, побудовано модель галуження. Розділ структурований на 5 підрозділів, викладений на 16 сторінках, ілюстрований 11 рисунками.

*Зауваження до розділу:*

На основі результатів хроматографії, що поділяє за розміром, автор стверджує про формування потрійного комплексу, що містить фібрин desAB, D-димер та D-фрагмент, при цьому об'єм виходу комплексу становив 5,5-6 мл (рис. 5.1 А). Тоді як, навпаки, автор заперечує формування потрійного комплексу у суміші D-димер, D-фрагмент та desA фібрин або desAB-desB $\beta$ 15-42. Однак, залишається не до кінця зрозумілим на основі чого автор робить такі висновки, пік виходу на об'ємі 5,5 мл можна чітко прослідкувати на всіх представлених хроматограмах, результати SDS-PAGE (наприклад, рис. 5.1 В) взагалі не доводять факту розділення. Також не вказано об'єм виходу відповідної форми фібрину, що полегшило б розуміння наведених результатів. Цікавим також залишається природа піку на 2,5-3 мл.

**Розділ 6** «Роль шарнірної області фібрин(оген)у в процесах формування та латеральної асоціації протофібрил фібрину» викладений на 11 сторінках, складається із двох підрозділів, ілюстрований 7 рисунками. У першому підрозділі наведені дані щодо результатів вивчення дії синтетичних пептидів, що імітують амінокислотну послідовність окремих ділянок фібрин(оген)у на процеси формування фібрину та латеральну асоціацію його протофібрил. Другий підрозділ стосується результатів молекулярного моделювання, встановлено сайти взаємодії між досліджуваними пептидами та молекулою фібрину, проаналізовано контакти в межах комплексу.

*Зауваження до розділу:*

Автор не аргументує вибір концентрації синтетичних пептидів – 0,33 мМ під час проведення досліджень. З кривої залежності тривалості lag-періоду від концентрації пептидів в середовищі (рис. 6.1) є очевидним, що обрана автором концентрація є мінімальною, яка чинить ефект на процес полімеризації, якщо чинить взагалі. Автор також не навів кінцевої концентрації пептидів, при використанні їх суміші, у дослідженні впливу на процес полімеризації, тому залишається не до кінця зрозумілим чим обумовлений ефект подовження lag-періоду полімеризації: збільшенням концентрації пептидів (при використанні суміші), чи, як стверджує автор, синергічною дією пептидів.

**Розділ 7** «Встановлення механізму інгібіторної дії сполук калікс[4]аренового ряду на процес полімеризації фібрину» складається з п'яти підрозділів, представлений на 22 сторінках, ілюстрований 19 рисунками та містить 2 таблиці. Розділ присвячений результатам комплексної оцінки інгібіторної дії сполук калікс[4]аренового ряду, які відрізняються за кількістю залишків бісфосфонової кислоти, на полімеризацію фібрину, а також висвітлює результати молекулярного докінгу, проведеного з метою встановлення ключових сайтів взаємодії між фібрином та калікс[4]аренами C-145, C-193, C937 та C-935. У експериментах *in vitro* було показано різницю в дії сполук в залежності від кількості бісфосфонових залишків, доведено необхідність наявності 3 залишків для міцного зв'язування, тоді як за допомогою методів *in silico* вдалося визначити функціональні групи, які є необхідними для формування комплексу та надати рекомендації щодо створення нових перспективних варіантів молекули калікс[4]арену. *Зауважень до розділу немає.*

**Розділ 8** «Інгібітори фактора Ха» складається з двох підрозділів, представлений на 10 сторінках, ілюстрований 8 рисунками. Розділ висвітлює результати власних досліджень щодо скринінгу низькомолекулярних сполук як потенційних інгібіторів фактора Ха.

*Зауваження до розділу:*

1) У розділі відсутня інформація щодо природи та походження препаратів, які були використані під час скринінгу. На мій погляд, доцільно було б вказати структури або фармакологічну приналежність досліджених агентів.

2) Не доречним в підписах осі У представлених агрегатограм (рис. 8.3-8.6) використовувати позначення – «Агреговані тромбоцити, %», оскільки це не відповідає дійсності. Мова йде про зміну світлорозсіювання, а дана вісь відображає ступінь агрегації.

3) Не вказана кінцева концентрація ДМСО у експериментах як *in vitro*, так і *in vivo*, тоді як для дослідження процесу агрегації тромбоцитів даний показник є принциповим.

4) Доречним би було доповнити одержані дані результатами дослідження дії сполук-інгібіторів на час формування згустку в плазмі у хронометричних тестах – АЧТЧ, ПЧ, ТЧ. Це б дало змогу зробити висновок про вплив сполук на процес формування фібрину, з іншого боку, якщо об'єктом дослідження була саме агрегація тромбоцитів, то варто було б індукувати процес агрегації такими фізіологічними індукторами як АДФ або колаген. Це значно полегшило б інтерпретацію результатів агрегації.

**Розділ 9** «Пошук нових інгібіторів урокінази» представлений на 23 сторінках, ілюстрований 20 рисунками та містить 2 таблиці. Розділ висвітлює результати власних досліджень щодо пошуку ефективних інгібіторів активатора плазміногену урокіназного типу.

*Зауваження до розділу:*

Автор не описує метод визначення активності урокінази за дії сполук-інгібіторів, тому не до кінця зрозумілим залишається походження даних щодо інгібуючої активності сполук (табл. 9.2) та значень  $K_i$ , наведених в тексті роботи.

Розділ «**Заключення**» є підсумком всієї проведеної роботи, як теоретичної інформації, наведеної у підрозділах літературного огляду, так і власних напрацювань автора та систематизації отриманих результатів. Розділ побудований логічно та послідовно, містить обговорення отриманих автором результатів та їхнє порівняння з існуючими напрацюваннями інших вітчизняних



та світових шкіл. Цей розділ підтверджує наукові положення, одержані дисертантом, та свідчить про високу наукову ерудицію автора.

У 5 **висновках**, які базуються на отриманому фактичному матеріалі роботи і є теоретичним і практичним узагальненням проведених досліджень, представлені її найважливіші результати, у повній відповідності до головної мети та завдань дослідження.

**Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення.** В загальному, дисертаційна робота складає дуже приємне враження, написана цікаво, має чіткий логічний методологічний підхід до викладення матеріалу, багато і якісно ілюстрована. Зміст дисертації повною мірою розкриває суть проведеної роботи, її положень, результатів та визначеного наукового напрямку. Попри відсутність принципових недоліків, є незначні зауваження, що стосуються наступного. У тексті дисертації зустрічаються описки, неточності, у розділі 8 порушена нумерація підрозділів, у розділі 9 порушена нумерація таблиць, підписи осей на наведених рисунках часто виконані англійською мовою (наприклад, рис. 5.1-5.6, 9.20) або відсутні (наприклад, рис. 6.2). В кінці кожного розділу, що стосуються одержаних автором результатів, не вистачає короткого підсумку, що відображав би принципові висновки виконаної роботи та вказував на можливі перспективи подальших досліджень.

Вказані зауваження в жодній мірі не применшують вагомості теоретичного значення та науково-практичної цінності дисертаційної роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку викладеного матеріалу.

При ознайомленні із дисертаційною роботою до автора виникли деякі запитання, на які хотілося б отримати відповіді під час офіційного захисту:

1. Чи перевіряли Ви стабільність потрібного комплексу в часі? Які ще додаткові методи можна було б застосувати для підтвердження факту комплексоутворення фібрин-мономеру з фрагментами фібриногену/фібрину?

2. Чому у своєму дослідженні Ви зупинилися на проведенні віртуального скринінгу інгібіторів каталітичної активності саме урокінази, а не сполук, які б блокували взаємодію урокінази з її рецептором?

3. Що відомо про селективність каліксаренів, які Ви досліджували? Чи можлива їх взаємодія з іншими протеїнами крові?

### ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Олексія Грабовського «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу» є завершеним самостійним науковим дослідженням, в якому наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання сучасної медичної біохімії – регуляції функціонування системи гемостазу.

За своєю актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем і теоретичним та практичним значенням, дисертація повністю відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 “Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії”, а здобувач Олексій Грабовський заслуговує присудження йому ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія в галузі знань 09 – Біологія.

Канд. біол. наук,  
старший дослідник,  
асистент кафедри біохімії  
ННЦ "Інститут біології та медицини"  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка

 Тетяна ГАЛЕНОВА

