

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Грабовського Олексія Олеговича "СТРУКТУРА, ФУНКЦІЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ІНГІБУВАННЯ АКТИВНИХ САЙТІВ КЛЮЧОВИХ ПРОТЕЇНІВ ГЕМОСТАЗУ", яка подається на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія (03.00.04 – Біохімія)

Мені дуже приємно, що я маю можливість ознайомитися та надати оцінку дисертаційній роботі Олексія Грабовського. Справа в тому, що достатньо давно, на запрошення академіка В.О.Беліцера, я, у співпраці з ним та д.б.н. Т.В.Варецькою, займався проблемою з'ясування механізму гальмування полімеризації фібрину фібриногеном та його активними фрагментами. При цьому було розроблено кінетичну модель реакції в системі «фібрин - інгібітор», яка добре описувала експериментальні результати, розраховано деякі важливі константи. Відповідні результати були опубліковані. Тому мій інтерес до вивчення структурно-функціональних властивостей та молекулярних механізмів інгібування активних сайтів протеїнів гемостазу є цілком логічним та обґрунтованим, мені здається.

Актуальність дисертаційної роботи.

Безперечно, проблема гемостазу є найважливішою проблемою сучасної медичної біохімії, вона є дуже цікавою як у фундаментальному, так і в практичному відношенні. Як добре відомо, гемостаз є динамічною рівноважною системою, належне оборотне функціонування якої забезпечує циркуляцію крові в рідкому стані, а при ушкодженні судини ефективну зупинку кровотечі. Будь-яке порушення рівноваги у системі гемостазу потребує негайної компенсації для підтримки балансу, який забезпечує нормальне функціонування організму. При відсутності такої компенсації маємо тромбози і, відповідно, виникнення небезпечних патологічних станів (ішемічний інсульт, інфаркт міокарду, тромбоемболія легеневої артерії, тощо) та геморагій (геморагічний інсульт, внутрішні крововиливи, тощо).

Тому вкрай актуальним є пошук оборотних та достатньо афінних ефекторів, які б ефективно та специфічно змінювали активність окремих компонентів системи гемостазу. Саме такий підхід може бути підґрунтям для створення біомедичних технологій, спрямованих на запобігання розвитку вищезазначених патологічних станів. До таких ефекторів ми можемо віднести, перш за все, сполуки з антитромботичною дією: інгібітори факторів каскаду зсідання крові, фібринолітики, інгібітори активації тромбоцитів, тощо.

В роботі Олексія Грабовського як раз, у поєднанні експериментальних підходів *in vitro* з технологіями *in silico*, досліджено молекулярні механізми функціонування окремих сайтів молекули фібрин(оген)у та запропоновані інгібітори, які здатні взаємодіяти з ними та пригнічувати полімеризацію фібрину. Також запропоновано та апробовано вискоєфективні інгібітори урокінази та фактора Ха.

Перед тим, як підготувати цей Відгук, я як рецензент:

1. Прочитав текст дисертації;
2. Ознайомився з вибраними друкми дисертанта;
3. Мав з ним особисту зустріч, під час якої він надав мені додаткові роз'яснення щодо результатів своєї роботи;
4. Заслухав доповідь дисертанта на внутрішній апробації роботи.

На підставі вищезазначеного формую своє враження від дисертаційної роботи О.О. Грабовського.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з «Вступу», «Огляду літератури», і тут маємо розділ 1 – «Система гемостазу»; розділ 2 – «Полімеризація фібрину»; розділ 3 – «Ензими гемостазу та їх інгібування». Далі йде розділ 4 – «Матеріали та методи дослідження»; потім маємо суто експериментальну частину: розділ 5 – «Дослідження міжмолекулярних взаємодій у DDE-тріаді з використанням D-димеру та D-фрагменту фібрин(оген)у»; розділ 6 – «Роль шарнірної області фібрин(оген)у в процесах формування та латеральної асоціації протофібрил фібрину»; розділ 7 – «Встановлення механізму інгібіторної дії сполук калікс[4]аренового ряду на процес полімеризації фібрину»; розділ 8 «Інгібітори фактора Ха»; розділ 9 – «Пошук нових інгібіторів урокінази». Текст дисертаційної роботи завершується «Заключним розділом», «Висновками» та «Списком використаних джерел» (147 посилань). Дисертаційна робота викладена на 165 сторінках (з них 128 сторінок основної частини), вона містить 65 рисунків та 4 таблиці.

Ступінь обґрунтованості, достовірності наукових положень, висновків, рекомендацій. Достовірність одержаних у роботі результатів забезпечена, перш за все, використанням адекватних експериментальних підходів та методів.

Втім, вважаю, що за методи варто наголосити особливо. Відзначаю, що при виконанні роботи був задіяний широкий спектр різноманітних експериментальних методів. Мова йде за класичні біохімічні (зокрема, препаративні), фізико-хімічні та біофізичні методи. Я маю на увазі електрофорез протеїнів, хроматографію, ензимологічні підходи (зокрема із застосуванням хромогенних субстратів для визначення активності ензимів). Широко застосовувалися методи спектрофотометрії, електронної мікроскопії та турбідиметрії. Були задіяні й методи клітинної біології та підходи до культивування клітин, а також агрегатометрія тромбоцитів. і, нарешті, слушно були задіяні методи комп'ютерного моделювання, докінгу та молекулярної динаміки.

Повнота викладення результатів роботи в опублікованих працях. Основні результати дисертації достатньо повно відображено у фахових наукових виданнях, апробовано на спеціалізованих наукових форумах, а також запатентовано. В цілому ж мова йде за 10 статей, 2 патенти, а також за 4 тез доповідей на наукових конференціях.

Наукова новизна отриманих результатів. Я б, в першу чергу, відзначив наступні авторські пріоритетні фундаментальні експериментальні результати:

- продемонстровано, шляхом вивчення комплексоутворення фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту фібрин(оген), у залучення «В»-центрів полімеризації фібрину (B β 15-18) молекул однієї протофібрили до зв'язування D-регіонів молекул сусідніх протофібрил;
- доведено, з використанням молекулярної динаміки, що фрагменти γ 69-77, B β 125-135 та A α 91-103 забезпечують взаємодії суперспіральних регіонів окремих молекул фібрину, які можуть бути реалізовані в ході латеральної асоціації протофібрил. Завдяки цьому пептиди-міметики вищезазначених фрагментів фібрину ефективно та синергічно інгібують полімеризацію;
- встановлено, що інгібіторну дію сполук калікс[4]аренового ряду на полімеризацію фібрину обумовлено взаємодіями «А»-центрів полімеризації

- (А α 17-20) з залишками бісфосфонових кислот калікс[4]аренів, відповідно, критичною для стабільного зв'язування інгібітора є кількість цих залишків;
- запропоновано, з використанням докінгу та молекулярної динаміки, низку інгібіторів урокінази, доведено їхню ефективність *in vitro* та показано їхню здатність ефективно пригнічувати проліферацію пухлинних клітин у культурі;
 - створено фокусну бібліотеку сполук - потенційних інгібіторів фактора Ха. Проведено скринінг *in vitro* та обрано ті з них, які здатні інгібувати активність фактора Ха у розчині та в плазмі крові.

Втім, не можна не звернути увагу на наступне. Хоча ця робота захищається за спеціальністю 091 Біологія (03.00.04 – Біохімія), втім, вона по-суті, є міждисциплінарною. Дійсно, її як в методичному, так і в методологічному аспекті виконано «на перехресті» *Біологія (біохімія) + Органічна хімія + Комп'ютерна біологія + Біомедицина + Фармакологія*. І таку «суперпозицію» слід вважати дуже доброю, бо вона цілком віддзеркалює тенденцію розвитку сучасних Наук про Життя в XXI сторіччі.

Суттєво, що значну частину роботи зроблено із використанням крові донорів, яку отримували в Головному військовому госпіталі Міністерства Оборони України м. Києва.

Чудово, що у роботі використані технології *in silico* (докінг, молекулярна динаміка).

Дуже важливо, що текст роботи містить велику кількість ілюстративного графічного матеріалу (65 рисунків), я це відверто вітаю. До речі, текст роботи містить багато наочних кольорових рисунків, зокрема таких, що стосуються докінгу та молекулярної механіки.

В цілому ж хочу відзначити, що експериментальні дослідження О.О.Грабовського виконано на високому науково-методичному рівні, а експериментальні методи (зокрема біохімічні, фізико-хімічні та біофізичні, а також методи комп'ютерного моделювання), що були ним застосовані, є адекватними науковим завданням. Одержані дані кваліфіковано проаналізовані. Наукові положення та висновки, сформульовані на підставі аналізу одержаного фактичного матеріалу, базуються на достатній кількості експериментів, вони є цілком обґрунтованими та достовірними, та, безперечно, відображують основний зміст дисертаційної роботи.

Практична цінність дисертації. Очевидно, що результати, які були одержані, реально забезпечили створення та характеристику низькомолекулярних сполук, які є ефективними інгібіторами фактора Ха та урокінази. Отже, мова йде за розбудову потенційних неімуногенних та ефективних засобів з антитромботичною та антиметастатичною дією відповідно.

Водночас, до представленої дисертаційної роботи є **такі запитання та зауваження:**

1. Мені не зрозуміло, чому при проведенні експериментальних досліджень у середовищі інкубації були відсутні іони Mg (як відомо, їх концентрація у плазмі крові становить одиниці мМ). Невже автор дійсно впевнений, що результати, що були одержані, не залежать від того, чи був Mg у середовищі інкубації у зазначеній концентрації, чи ні? Отже, хотів би почути аргументи: чому ігнорували присутність іонів Mg в інкубаційному середовищі? Адже Mg²⁺ є антагоністом Ca²⁺, і його відсутність/присутність у середовищах інкубації, та ще й у мілімолярних концентраціях, не може не впливати, я думаю, на закономірності інгібування

активних сайтів ключових протеїнів гемостазу. Наприклад, чи впевнений дисертант, що дія низькомолекулярних ефektorів, зокрема, калікс[4]аренів, на процеси полімеризації фібрину, не буде чутливою до відсутності/присутності іонів Mg у середовищі інкубації?

2. У дисертації відзначено, що при проведенні турбидиметричних досліджень «... до досліджуваного розчину фібриногену в кінцевій концентрації 0,1 мг/мл додавали 0,05 М трис-HCl буфер, рН 7,4». І все? А як же створювали фізіологічне значення іонної сили $\mu = 0,15$, що притаманне плазмі крові ($[NaCl] + [KCl] = 150$ мМ)? І знов таки, чому у середовищах були відсутні іони Mg?

3. У випадку пошуку нових інгібіторів урокінази обчислювали ΔG енергію зв'язування ΔG та інгібіторну активність сполук, що була визначена *in vitro*. А чи можна було розрахувати величину константи зв'язування інгібіторів K? Як вважає автор, наскільки коректним було б використання «зворотнього» рівняння Вант-Гоффа: $K = \exp(-\Delta G/RT)$?

4. Окремі результати надаються без статистичної обробки (наприклад, рис. 6.1, рис. 6.2, рис. 7.2 – 7.6). Втім, в таких випадках варто вказувати у підписах до рисунків: «наведені результати типових досліджень».

5. У тексті роботи є некоректності з точки зору граматики, зокрема, стилістики.

Безперечно, вищенаведені зауваження, що були зроблені, не стосуються основних результатів дисертаційної роботи, вони переважно мають рекомендаційний та профілактичний характер для подальших наукових досліджень і абсолютно не впливають на мою загальну позитивну оцінку одержаних наукових здобутків дисертанта та відповідних висновків.

В цілому Дисертація написана зрозумілою науковою мовою, добре оформлена.

На останок хочу підкреслити наступне. Біохіміки, фізіологи та медики України завжди тримали у фокусі уваги питання, що стосувалися вивчення механізмів (зокрема, молекулярних) тромбоутворення. Відповідними науковими пошуками активно займалися такий видатний вчений, як академік НАН України В.О.Беліцер, а також член-кор. НАН України Е.В.Луговський, д.б.н. Т.В.Варецька, д.б.н. Т.М.Платонова та інші. І мені дуже приємно відзначити, що в нашому Інституті увага до вивчення проблем гемостазу у відділі структури і функції білка, яким наразі керує д.б.н. В.О.Чернишенко, традиційно зберігається й на теперішній час, зокрема, і з боку наукової молоді. Свідченням цього як раз і є дисертаційна робота О.О.Грабовського.

Висновок. Вважаю, що дисертація Грабовського Олексія Олеговича «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу» є завершеною науково-дослідною роботою, яка робить суттєвий внесок у розбудову сучасних уявлень про біохімічні та фізико-хімічні аспекти інгібування активних сайтів протеїнів системи гемостазу, пошук оборотних та афінних ефektorів, які б ефективно та специфічно змінювали активність окремих компонентів цієї системи. Очевидно, що у цьому контексті можна вести мову за важливе практичне значення роботи – мова йде за розбудову потенційних неімуногенних та ефективних засобів з антитромботичною та антиметастатичною дією. Дисертація добре методично забезпечена. Наукові положення та висновки, що були сформульовані на підставі аналізу одержаного фактичного матеріалу, є цілком обґрунтованими та достовірними, та, безперечно, відображують основний зміст дисертаційної роботи. Для дисертації є властивими ознаки міждисциплінарного дослідження її виконано «на стику» «Біологія»

(«біохімія») + «Органічна хімія» + «Комп'ютерна біологія» + «Біомедицина» + «Фармакологія».

Щодо особистості самого дисертанта. О.О.Грабовський є здібним та перспективною молодим дослідником у галузі біохімії, для нього є властивим широкий науковий світогляд, добрий творчий та методичний потенціал. Безперечно, йому притаманна здатність до проведення самостійного активного наукового пошуку, що акцентований на вирішення нагальних проблем сучасної біохімії та медичної біохімії.

За актуальністю та обсягом, новизною та науково-практичною значимістю ця робота цілком відповідає усім вимогам, які стосуються присудження ступеня доктора наук, затвердженого Постановою КМУ від 12 січня 2022 року №44, а автор роботи - Грабовський Олексій Олегович, заслуговує на присудження йому ступеня доктора наук за спеціальністю 091 Біологія (03.00.04 – Біохімія).

Рецензент:

академік НАН України,

доктор біологічних наук, професор,

заступник директора з наукової роботи,

завідувач відділу біохімії м'язів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,

Лауреат Державної премії України

в галузі науки і техніки,


Заслужений діяч науки і техніки України,

Лауреат премії ім. О.В.Палладіна НАН України,

Лауреат премії ім. П.Г.Костюка НАН України

 Сергій КОСТЕРІН

15 вересня 2023 р.

Підпис 
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"15" 09 2023 р.

