

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

Олексія ГРАБОВСЬКОГО

«СТРУКТУРА, ФУНКЦІЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ
ІНГІБУВАННЯ АКТИВНИХ САЙТІВ КЛЮЧОВИХ
ПРОТЕЇНІВ ГЕМОСТАЗУ»,

яка подається на здобуття наукового ступеня

доктора філософії

у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми. Серцево-судинні захворювання, переважно ішемічна хвороба серця та інсульт, є основними причинами смертності й одними з основних факторів інвалідності в усьому світі. Тягар серцево-судинних захворювань продовжує невпинно зростати протягом десятиліть особливо у країнах із середнім і низьким рівнем доходу. Виявлення випадків серцево-судинних захворювань майже подвоїлося з 271 мільйона в 1990 році до 523 мільйонів у 2022 році, а кількість смертей від серцево-судинних захворювань неухильно збільшується з 12,1 мільйона в 1990 році до 18,6 мільйона у 2022 році. В Україні серцево-судинні захворювання є також головною причиною смертності населення, за цим показником наша країна лишається одним зі світових лідерів (за дев'ять місяців 2021 року від серцево-судинних захворювань в Україні померло 488 тисячі громадян, щорічно рівень смертності зростає у середньому на 6%). Як відомо, основною причиною розвитку серцево-судинних захворювань є дисбаланс між системою зсідання крові та тромболізису. До патогенезу внутрішньосудинного згортання робить внесок як молекулярна, так і клітинна ланка гемостазу. Тому вкрай важливим є розкриття молекулярних механізмів формування згустку: від утворення тромбіну до формування фібринового каркасу тромбу й залучення тромбоцитів до цього процесу. Певні успіхи у боротьбі із серцево-судинними захворюваннями, перш за все, пов'язані із застосуванням фібринолітичної терапії, заснованої на використанні ензимів-фібринолітиків, що руйнують вже

сформований згусток. Однак, наразі у світі не існує жодного препарату, який би інгібував власно стадію полімеризації фібрину. Також відсутні препарати, які б чинили інгібувальну дію одночасно на утворення полімерного фібрину та активацію тромбоцитів. Крім участі у руйнуванні тромбів, протеїни системи активації плазміногену, зокрема, урокіназа, беруть участь у регулюванні сигнальних мереж клітин, у тому числі трансформованих, залучаючись до процесів неопластичного росту, інвазії і метастазування злоякісних пухлин. З цих позицій скринінг та тестування високоефективних селективних інгібіторів протеаз фібринолітичної системи, що залучені до пухлинного росту та дисемінації ракових клітин, є надзвичайно важливою задачею. Саме вирішенню цих проблем присвячено дисертаційну роботу Олексія Грабовського, *актуальність теми якої не викликає сумнівів*, а її потенційне науково-практичне значення важко переоцінити. Отже, **метою роботи** було дослідити структуру, функції та способи інгібування сайтів міжмолекулярних взаємодій таких ключових сайтів мішеней, як центри полімеризації фібриногену, активного центру фактора Ха та урокінази.

Дисертаційна робота відповідає пріоритетному напрямку розвитку науки в галузі біохімії людини та тварин і виконувалась згідно плану науково-дослідних робіт відділу структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Дисертантом особисто проведено усі експериментальні дослідження, виконано статистичну обробку результатів, підбір та опрацювання літератури. Планування роботи та аналіз результатів досліджень проводились спільно з науковим керівником.

Основні результати дисертаційної роботи, їхня новизна та практичне значення. Відповідно до мети було сформульовано п'ять основних завдань, які вирішували за допомогою сучасних біохімічних, фізико-хімічних та фізичних методів (ензиматичні, хроматографічні, електрофоретичні, турбодиметричні, спектроскопічні методи, електронна мікроскопія, культивування клітин). Слід особливо зазначити, що автором широко використовувався цілий арсенал методів комп'ютерного моделювання

(молекулярний докінг, молекулярна динаміка), за допомогою яких було проведено *in silico* скринінг потенційних ефекторів та інгібіторів ключових протейнів системи гомостазу, оцінювання динаміки взаємодій цих сполук із активними центрами та сайтами взаємодій молекул-мішеней.

Зокрема, значну увагу дослідника було прикуто до з'ясування молекулярних механізмів полімеризації фібрину, а також механізмів галуження протофібрил. Завдяки комплексному методичному підходу й поєднанню біоінформативних підходів з методами класичної біохімії дисертанту вдалося отримати низку надзвичайно важливих результатів. Зокрема, показано новий механізм галуження протофібрил, який реалізується за рахунок залучення центрів полімеризації «В» ($B\beta 15-18$) молекул однієї протофібрили до зв'язування D-регіонів молекул сусідніх протофібрил. Розкритий молекулярний механізм формування комплексу $desAB:D:DD$, як припускається, містить глибокий фізіологічний сенс, який полягає у реалізації раніше неопisanого способу галуження протофібрил. З використанням методів турбідиметрії та електронної мікроскопії було встановлено, що D-фрагмент може гальмувати взаємодію DED у комплексі $desAB$ -фібрину та D-димеру, посилюючи інгібувальний ефект останнього по відношенню до полімеризації фібрину.

За допомогою методів молекулярної динаміки було запропоновано модель взаємодії суперспіральных регіонів окремих молекул фібрину із залученням фрагментів $\gamma 69-77$, $B\beta 125-135$ та $A\alpha 91-103$, що значно розширює уявлення про механізми латеральної асоціації протофібрил. Отримані результати моделювання *in silico* знайшли підтвердження в ході виконання експериментів *in vitro* із використанням пептидів-міметиків, що імітують структуру вищезазначених ділянок молекули фібрину, які ефективно гальмували полімеризацію фібрину. З'ясування ролі шарнірних ділянок молекули фібрину в його полімеризації, які раніше вважалися функціонально інертними в контексті фібрилогенезу, та дослідження речовин, які селективно

інгібують вказані сайти, відкривають перспективи створення принципово нових антитромботичних препаратів.

Автором було застосовано технології *in silico* та проведено серію скринінгових випробувань *in vitro* сполук каліксаренового ряду як селективних інгібіторів полімеризації фібрину. Було значно розширено уявлення про механізм інгібувальної дії каліксарену C-145 по відношенню до полімеризації фібрину і доведено, що наявність трьох залишків бісфосфонової кислоти у складі каліксарену C-145 та його аналогів є критичною кількістю для стабільного зв'язування інгібітора з ділянкою-мішенню у молекулі фібрину, яка знаходиться у складі «А»-центрів полімеризації ($A\alpha 17-20$).

Було виконано серію дослідів *in vitro* та *in vivo* щодо тестування інгібувальної дії лінійки низькомолекулярних сполук на активність фактора згортання крові Ха та активацію тромбоцитів. Застосування комп'ютерного моделювання дозволило авторові відібрати найбільш ефективні агенти-інгібітори фактора Ха, який є важливою мішенню дії антикоагулянтів, оскільки дозволяє безпосередньо блокувати утворення тромбіну. Показано, що у збагаченій тромбоцитами плазмі людини низькомолекулярні інгібітори фактора Ха ефективно пригнічували як фібриноутворення, так і агрегацію тромбоцитів. Важливо зазначити, що результати експериментів *in vitro* підтверджуються у дослідях на лабораторних тваринах. Встановлено, що введені щурам досліджувані сполуки (0,25 – 0,75 мг/кг маси тіла) інгібували агрегацію тромбоцитів та пригнічували формування фібринових згустків. Отримані результати свідчать про наявність унікальних властивостей препаратів, що тестуються, які полягають в одночасному гальмуванні молекулярної та клітинної ланки системи зсідання крові. Ця обставина робить їх потенційно більш ефективними антикоагулянтами, ніж деякі з відомих агентів, наприклад, рівароксабан, який чинить прямий інгібувальний вплив на фактор Ха, але не впливає на активність тромбоцитів.

Дані, отримані у роботі, є обнадійливими з точки зору створення нових ефективних ліків, які б відкрили широкі можливості у лікування складної

категорії пацієнтів з венозною тромбоемболією, що включає тромбоз глибоких вен та тромбоемболію легеневої артерії.

В останньому розділі дисертаційної роботи здобувачем проведено молекулярний докінг низки сполук – потенційних інгібіторів урокінази. Побудовано фармакофорну модель інгібітора, що взаємодіє з урокіназою в субстрат-зв'язувальному каналі та мімікрує взаємодію нативного субстрату. Було проведено дослідження впливу інгібітору «С1» на проліферацію трансформованих клітин (лінія епітелійних клітин грудної залози людини MDA-MB-231), які характеризуються надекспресією uPA. Встановлено, що інгібітор, який мав найвищу афінність до активного центру ензиму, ефективно пригнічував проліферацію пухлинних клітин *in vitro*. За результатами МТТ-тесту було визначено величину $IC_{50} = 24,5 \pm 0,5$ мкМ. Подальше дослідження та тестування нових сполук – селективних інгібіторів урокінази, може відкрити перспективи у розробці препаратів з протипухлинною активністю.

Рисунки та таблиці, представлені у дисертації, є чіткими та ілюстративними. Висновки, наведені наприкінці рукопису дисертації, є лаконічними й адекватно відображають отримані результати.

Структура дисертації та апробація результатів. За формальними ознаками дисертаційна робота Грабовського О. О. відповідає усім вимогам: вона містить анотацію українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, методичну частину, опис власних результатів та їхнє обговорення (5 розділів), узагальнення, висновків та переліку використаної літератури (139 першоджерел). Робота викладена на 165 сторінках машинописного тексту, з них 128 сторінок припадає на основну частину. Літературний огляд містить сучасні відомості щодо структури та функції протеїнів системи гемостазу, окреслює коло сучасних проблем, пов'язаних з порушеннями функціонування процесів зсідання крові та фібринолізу, описано роль методів молекулярного моделювання у структурі сучасної біологічної науки. Текст супроводжується 65 рисунками і 4 таблицями.

Результати дисертаційного дослідження достатньо повно висвітлено у 9 статтях у фахових вітчизняних та міжнародних наукових виданнях, у тому числі, журналах з високим індексом цитування у наукометричних базах Scopus і Web of Science (Q1 – Q2), що відповідають вимогам Постанови №44 Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р «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 також апробовані на 4 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях та симпозіумах. Олексій Грабовський є співавтором двох патентів, у тому числі, міжнародної патентної заявки.

Зауваження та питання. Після ознайомлення з дисертаційною роботою Олексія Грабовського виникає певна кількість питань та зауважень, які автор має прийняти до уваги при підготовці остаточного варіанту дисертації:

1. Відсутній протокол рішення біоетичного комітету на проведення дослідів з використанням лабораторних тварин (щурів). Необхідно додати до дисертації відомості, чи було отримано письмову згоду від донорів на використання біологічного матеріалу для експериментальних досліджень.

2. Рекомендовано розширити відомості щодо новизни та практичного значення отриманих результатів в анотації роботи.

3. Природа низькомолекулярних інгібіторів фактора Ха не зрозуміла, а оскільки вони не описані у роботі, то важко зробити припущення стосовно механізму їхньої інгібувальної дії. На які ланки системи активації фактора X можуть впливати сполуки, що тестуються, або це є прямі інгібітори фактора Ха? Яким, на думку автора, може бути механізм їхньої антитромботичної дії?

4. Чи проводили порівняння ефективності антикоагуляційної дії низькомолекулярних інгібіторів фактора Ха та референтного препарату, наприклад, рівароксабану?

5. В одному з положень дисертації автор зазначає, що інгібітори урокінази, які тестували на клітинах раку грудної залози, є ефективними

засобами, що володіють антиметастатичною активністю, хоча досліджень, які б підтверджували це, проведено не було.

6. Оскільки uPA у комплексі з рецептором uPAR відповідають за міграційну активність клітин та їхній інвазійний потенціал, то вплив інгібіторів урокінази на клітини пухлини грудної залози більш доцільно було б досліджувати саме в контексті пригнічення міграційної/інвазійної активності, а не у тесті на виживання/проліферативну активність.

7. Як Ви оцінюєте можливі побічні ефекти від застосування препаратів-інгібіторів урокінази?

8. Текст дисертації потребує доопрацювання (зустрічаються слова-кальки з інших мов, неоковирні вирази та сленг). Зокрема, що таке «сигнальна мережа системи гемостазу», «структурована молекула розчиннику»? Пункт змісту 4.2.12 містить опис протоколу дослідження, зокрема, складу реактивів, які використовувалися, що є недоречним. До тексту дисертаційної роботи слід включити перелік умовних скорочень.

Втім, наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність представленого дисертаційного дослідження. Отже, результати проведеної роботи істотно розширюють існуючі уявлення про біохімічні механізми формування каркасу фібринового згустку, що є важливим для пошуку таргетних препаратів – інгібіторів тромбоутворення. Розроблений комплексний підхід із застосуванням методів комп'ютерного моделювання та подальшого біологічного тестування «бібліотеки» відібраних низькомолекулярних сполук дозволяє підвищити ефективність та ергономічність такого скринінгу. Цінність представленої дисертації полягає у вдалому поєднанні класичної біохімії з методами комп'ютерної біології та молекулярного докінгу, що свідчить про високий фаховий рівень підготовки здобувача та його багатосторонній хист. Наукове і прикладне значення результатів дисертаційної роботи не викликає сумнівів.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Олексія ГРАБОВСЬКОГО «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гомеостазу» за актуальністю, методичним рівнем, об'ємом та новизною отриманих експериментальних результатів, особистим внеском здобувача, високим науково-практичним значенням 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) та може бути представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник,
завідувач відділу хімії та біохімії ферментів

Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна

Національної академії наук України



Артем ТИХОМИРОВ

