

Рецензія

на дисертаційну роботу Євгенія КУЧЕРЯВОГО
“ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ α C-РЕГІОНІВ ТА В β N-
ДОМЕНІВ ФІБРИН(ОГЕН)У ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ
ЕФЕКТОРІВ”, 091 – Біологія та біохімія, 09 – Біологія, що подається на
здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертаційна робота присвячена дослідженню структурної і функціональної ролі, яку відіграють екстра-корпоральні В β N-домени та α C – регіони молекули фібрин(оген)у в процесі формування фібринового згустку та пов'язаної з ним агрегації тромбоцитів.

Автор використав оригінальний підхід до вивчення ролі В β N-доменів та α C-регіонів молекули фібрин(оген)у в процесах формування згустку, який полягав у тому, що об'єктами дослідження були різні форми фібриногену без В β N-доменів та без доменів α C-регіонів та дослідив їх роль у формуванні нових структур полімерного фібрину. Усі фрагменти були виділені з можливою обережністю і можна погодитися з автором в тому, що дослідження процесів міжмолекулярної взаємодії здійснювалося на рівні «нативних» структур фібрину.

В якості молекулярних модулаторів були використані високо специфічні протеази із отрути змій, моноклональні антитіла до В β N-домену та α C-регіону фібрин(оген)у та згадані незвичні форми фібриногену, наприклад дезВ β N1-42фібриноген, дезА α 505-610 і дезА α 404-610 фібриноген. Подібні форми фібриногену отримували і раніше, але головну увагу зосереджували на вивченні їх структури і в меншій мірі функціональних властивостей.

Слід зазначити, що останнім часом значна увага приділяється вивченню ролі В β N-домену і його складових структурних елементів у трансендотеліальному переносі і трансміграції лейкоцитів, як одному із важливих факторів виникнення і розвитку процесу запалення.

В той же час залишаються не вирішеними до кінця важливі питання участі В β N-домену та α C-регіону у формуванні протофібрил і їх латеральній асоціації, що в свою чергу важливо для розробки методів регуляції тромбоутворення («розробки стратегії селективної модуляції тромбоутворення») і пов'язаних з ним процесів ініціації та розвитку запалення. Тому використання молекулярних ефекторів для дослідження нових аспектів функцій В β N-доменів і α C-регіонів у побудові основних

структур полімерного фібрину (DDE триад, протофібрил, фібрил) залишається актуальним і відкриває нові напрямки досліджень.

Дисертаційна робота побудована по класичній схемі: вступ, розділ 1 і розділ 2 – огляд літератури, розділ 3 – матеріали і методи досліджень, розділи 3, 4 і розділ 5 - результати і їх обговорення, розділ 6 – заключний розділ, висновки, та цитована література. Дисертація викладена на 112 сторінках, з численними мікрофотографіями, турбідиметричними і агрегаційними кривими, процитовано 155 джерел.

Важливо підкреслити, що у вступі в короткій характеристиці роботи, метою автора було дослідити роль В β N-доменів та α C-регіонів і розташованих на сайтів полімеризації у формуванні нових структур полімерного фібрину, а саме протофібрил і фібрил, з новими функціями у процесі формування згустку.

Із наукового значення привертає увагу результат, що стосується наших уявлень про роль С сайтів полімеризації, які локалізовані в В β N-доменах. На початковій фазі формування протофібрил коли взаємодія А – а сайтів перших молекул фібрину з'єднує їх Е і Д регіони, С – с сайти підтримують формування протофібрил, надають їм міцності і незворотнього характеру. Більш того, формування протофібрил не потребує на цьому етапі участі В – в, які залишаються неактивними сайтами полімеризації, а для завершення побудови протофібрил достатньо участі С –с сайтів полімеризації. Взаємодія активованих В-в сайтів лише фіксує структуру протофібрил.

В практичному плані дисертація є початковим посібником по отриманню змійної отрути, її фракціонуванню і виділенню специфічних протеїназ, отриманню унікальних форм фібрин(оген)у, електронної мікроскопії з денситометрією у програмі ImageJ, моделювання *in silico* для дослідження системи гемостазу крові.

Розділ огляд літератури має 2 підрозділи, перший присвячений структурі молекули фібриногену і процесу полімеризації фібрину. У другому розглянуто молекулярні ефектори, до яких автор відносить моноклональні антитіла, пептиди-міметики та високо специфічні протеїнази. Особливу увагу автор приділяє тим видам ефекторів, представників яких він використовує у своїх дослідженнях. Кожен розділ супроводжується таблицею, в якій представлені основні характеристики кожного типу ефекторів.

Розділ матеріали і методи свідчить про різнобічну методичну озброєність автора. В ході роботи він очистив з використанням широкого

Як відомо тромбін першим активує А сайти полімеризації. На цій стадії формування протофібрил В сайт не активований. Тому автор приходить до висновку, що взаємодія С-с сайтів, а не В-в сайтів, забезпечує формування міцного контакту між Е та D регіонами, що підтримує подальший процес формування протофібрил.

Цей висновок підтверджує і інгібування процесу формування протофібрил моноклональним АТ 2d2a, епітоп якого заходиться на ділянці 12--23 В β N-домену. Моноклональне АТ взаємодією з В β N-доменом поблизу С сайтів створює стеричні перепони для зміцнення контакту між Е та D регіонами і в такий спосіб інгібує формування протофібрил. Автор відмічає, що взаємодія С-с сайтів полімеризації починається після відщеплення фібринопептидів А і раніше активації В-в сайтів полімеризації.

Висновок про участь С-с сайтів полімеризації у формуванні протофібрил піднімає таке важливе питання як механіка формування основної структури фібринового згустку – D:E:D тріади.

Цей напрямок досліджень на мою думку на часі і вирішення цього важливого питання під силу ґрунтовно підготовленому автору дисертації.

Важливим висновком є те, що на відміну від В β N-доменів α С-регіони самостійно не беруть участі в процесах формування протофібрил на ранніх стадіях утворення згустку, а лише у комплексі з В β N-доменами.

Цікаво також з'ясувати, чому В β N(1-42) фрагмент В β N-домену не впливає на полімеризацію контрольного фібриногену. Можливо, після вичленення В β N(1-42) фрагменту із структури В β N-термінального 1-65 фрагменту і втрати зв'язку з α С-регіоном він змінює конформацію, завдяки взаємодії В β 21-23 та В β 41-42 позитивно заряджених кластерів з негативно зарядженим фібринопептидом В ?

Важливим питанням у дослідженнях є симетрія молекули фібриногену і фібрину. Чи є у Вас докази того, що ефектори в першу чергу протеїназні і пептиди в однаковій однаковій мірі діють на обидві половини молекул фібриногена і фібрину?

ДезВ β N(1-42) фібриноген, В β N(1-42) і монАТ 2d2a не впливали суттєво на агрегацію тромбоцитів, викликали незначну їх дезагрегацію.

Для дослідження ролі С-термінального субдомену α С-регіону з допомогою високо специфічної протеїнази, виділеної з культурального середовища *Bacillus thuringiensis var israeliensis*, був очищений desA α 505-610 пептид, desA α 505-610 фібриноген і монАТ 1-5А з епітопом у А α 535-595.

спектру хроматографічних методів і охарактеризував і використав в якості об'єкту дослідження і в якості ефекторів 12 білків і пептидів. Серед них 3 фіброгенази, 3 форми фібриногену, 3 пептиди та 3 моноклональних антитіла та фібриноген, а також плазму крові збагачену тромбоцитами, відмиті тромбоцити. Серед методів, окрім звичних електрофорезу і вестерн-блоту, молекулярну масу B β N-домену визначав за допомогою мас-спектрометрії, взаємодії молекулярних компонентів досліджували з використанням турбідиметрії та агрегометрії, структуру згустку досліджував за допомогою трансмісійної мікроскопії з денситометрією у програмі ImageJ, моделювання *in silico*.

Наведені методи вказують на високий рівень експериментальної роботи автора в першу чергу по виділенню, очистці, характеристиці білків, як самих нових форм фібриногену, так і високо специфічних протеїназ, що дозволяє йому небезпідставно називати білки «нативними». Так, наприклад, препарат фібриноген не містив домішок плазміногену і мав 98% зсідання.

Слід відмітити як позитивний момент лаконічний стиль подачі матеріалу автором.

Викладення результатів дослідження та їх обговорення починається розділом про B β N-домен. Для дослідження його структурної і функціональної ролі автор використав дезB β N(1-42) фібриноген, B β N(1-42) пептид, та моноклональне антитіло 2d2a в якості ефекторів.

Було показано, що дезB β N(1-42) фібриноген не здатен полімеризуватися під дією тромбіну, незважаючи на наявність А-а взаємодії між Е та D регіонами молекул фібрину та присутності α C-регіонів. (Питання – чи відщеплені А фібринопептиди?). Ізольований B β N-пептид не впливав на полімеризацію контрольного фібриногену (а дезB β N(1-42) фібриногену?).

Це свідчило, що B β N-домен абсолютно необхідний для полімеризації фібрин(оген)у.

Звертає на себе увагу структура B β N-домену. Він розташований в 1-65 ділянці N-термінальної частини B β -ланцюга. В цій невеликій за розміром ділянці розташовані такі структури: ділянка 1-14 належить фібринопептиду В, ділянка 15-17 належить В сайту полімеризації, ділянка 21-46 належить С сайту полімеризації, ділянка 47-65 вважається конектором, який сполучає B β N-домен з дисульфідним кільцем Е-регіону. Однак на цьому конекторі розташований сайт зв'язування B β N-домену фібрину з VLDL рецептором мембрани ендотеліальних клітин судини.

Було знайдено, що у desA α 505-610 фібриногену подовжений лаг період, пептид A α 505-610 не впливав на лаг-період, але зменшував швидкість латеральної асоціації протофібрил. МонАТ 1-5а гальмувало не тільки швидкість латеральної асоціації протофібрил, а і зменшувало ефективну концентрацію. Ці дані вказують на те, що С-термінальні домени α С-регіону залучені у регуляцію швидкості формування фібрил фібринового згустку. Роль В β N-доменив у цих процесах не показана. Електронна мікроскопія виявила зменшення діаметра фібрил за присутності монАТ 1-5А і в згустках із desA α 505-610 фібриногену.

Одним із важливих дискусійних питань є таке.

Центр полімеризації «С», розташований в межах В β N-домену, працює лише у комплексі з α С-регіоном. З цим категоричним твердженням не можна погодитися в повній мірі, оскільки, по-перше тому, що Х-фрагмент фібриногену, отриманий за допомогою плазміну, який не має α С-регіонів, але містить неущкоджені два В β N-домени з «С» сайтами, здатен полімеризуватися,

По-друге, здатність дезA α 404-610 фібриногену, який не має α С-регіонів, полімеризуватися під дією тромбіну може вказувати на інший шлях залучення В β N-домену у взаємодію С – с сайтів полімеризації. Після відщеплення фібринопептидів А і взаємодії А- а сайтів полімеризації Е і D регіони зближаються, що є першим кроком до формування DDE тріади. Рухливість В β N-домену в просторі між Е і DD регіонами обмежується і відбувається зв'язування С сайту В β N-домена з с сайтом полімеризації D-регіону з формуванням DDE тріади. За участі α С-регіонів швидкість встановлення контакту С-с збільшується.

Останні висновки підтримуються експериментом, представлені схемами і з ними я цілком погоджуюся.

Результати дослідження полімеризації фібриногену з використанням високоспецифічних протеаз, пептидів та моноклональних антитіл в якості ефекторів дозволили автору отримати нові і важливі дані про роль В β N-домену і α С-регіонів у побудові основних структур полімерного фібрину - протофібрил і фібрил - та підійти до встановлення механізму формування основної структури полімерного фібрину - DDE тріади.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Євгенія КУЧЕРЯВОГО «ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ α С-РЕГІОНІВ ТА В β N-ДОМЕНІВ ФІБРИН(ОГЕН)У ЗА ДОПОМОГОЮ

МОЛЕКУЛЯРНИХ ЕФЕКТОРІВ» 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), а Є.П. Кучерявий заслуговує на присудження йому наукового ступеня доктора філософії з біології, за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія, 09 – Біологія.

Головний науковий співробітник
відділу структури і функції білка
доктор біологічних наук, проф.



Є. М. Макогоненко

