

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

## ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, наукового співробітника відділу молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України Василя ГУРМАЧА на дисертаційну роботу Олексія ГРАБОВСЬКОГО «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гомеостазу», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

**1. Актуальність обраної теми.** Дисертаційна робота Олексія ГРАБОВСЬКОГО присвячена дослідженню структури, функцій та способів інгібування сайтів міжмолекулярних взаємодій таких протеїнів як фібрин, фактора Ха та урокіназного активатора плазміногену. Дані протеїни відіграють значну роль в системі гомеостазу і залучені як в процеси зсідання крові, так і фібринолізу. Урокіназа додатково залучена в патофізіологічні процеси, такі як канцерогенез.

Понад 60 років процес полімеризації фібрину досліджується у різних лабораторіях світу, однак його молекулярні механізми повністю ще не з'ясовані. Залишається невідомою точна кількість і локалізація сайтів полімеризації фібрину та не з'ясовані механізми внутрішньомолекулярних перетворень і міжмолекулярних взаємодій, які лежать в основі формування фібринової сітки.

Одним з головних методів боротьби з тромбозами є інгібування коагуляційного каскаду на різних його стадіях. Отже, пошук нових класів речовин, здатних інгібувати процес активації системи зсідання крові, є вимогою

сьогодення. Встановлення локалізації невідомих сайтів полімеризації, окрім отримання нової фундаментальної інформації, має і практичне значення, оскільки знання їх структури та локалізації відкриває можливість для пошуку або синтезу відповідних пептидів і дизайну органічних сполук з метою їх можливого використання як інгібіторів процесу полімеризації фібрину та тромбоутворення.

Крім того, не можна не зазначити, що інгібування процесу патологічної активації системи гемостазу може стати новою перспективною стратегією в антитромботичній терапії. Адже основним недоліком існуючих антитромботичних препаратів, більшість з яких є інгібіторами тромбіну та коагуляційного фактору Ха і пригнічують тромбоутворення - є підвищений ризик кровотеч. Створення нових лікарських препаратів на основі селективних інгібіторів дозволить виключити цей ризик при їх застосуванні.

Використання підходів молекулярного (комп'ютерного) моделювання разом з методами класичної біохімії можуть відкрити нові можливості розширити знання про механізми полімеризації фібрину та інгібування активності протеїнів системи гемостазу. Таке поєднання віртуального скринінга з класичними методами розробки препаратів має ряд переваг. Як було зазначено автором, віртуальний скринінг дозволяє проаналізувати мільйонні бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук і відібрати сотню потенційно активних речовин для перевірки *in vitro*. Цей підхід є значно швидшим і економнішим порівняно з високопродуктивним скринінгом та традиційним раціональним дизайном.

Таким чином, зважаючи на зазначене вище, актуальність теми роботи не викликає сумніву.

**2. 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.).

**3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Дослідження було проведено дисертантом самостійно, і його результати є оригінальним науковим внеском, виконаним на високому методичному та теоретичному рівнях. Робота має логічну структуру і представляє собою комплексне наукове дослідження. Важливим є поєднання методів *in silico* та класичної біохімії, які вдало підтверджують отримані результати з обох сторін. Необхідно відзначити аргументований аналіз отриманих даних, що свідчить про високий рівень наукової компетентності автора.

**4. Достовірність основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.** Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає ніяких сумнівів, оскільки Олексій ГРАБОВСЬКИЙ вдало поєднав методи комп'ютерного моделювання, молекулярного докінгу і динаміки з базовими біохімічними та біофізичними методами сучасної біохімії. У випадку з молекулярним докінгом було протестовано ряд програм, з метою відбору кращої для тої чи іншої системи, тим самим зменшуючи вірогідність помилок. Для молекулярної динаміки було застосовано коректні параметри на кожному з етапів. Для результатів *in vitro* було проведено статистичний аналіз.

**5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів.** Наукова новизна проведених наукових досліджень, одержаних

результатів, а також основних наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, зроблених Олексієм ГРАБОВСЬКИМ, полягає у розробці нової моделі галуження протофібрил, які складаються з молекул фібрину. Дана модель базується на факті отримання сформованого потрійного комплексу фібрину desAB, D-димеру та D-фрагменту. Подальші дослідження дозволили стверджувати, що D-фрагмент приєднується до комплексу фібрину desAB з D-димером за рахунок центру полімеризації «В»:«b», і таким чином вперше показано залучення взаємодій центрів полімеризації «В:b» у новому механізмі галуження протофібрил; обґрунтовано інгібіторний ефект сполук калікс[4]аренового ряду на полімеризацію фібрину взаємодіями залишків бісфосфонових кислот з N-кінцевою частиною А $\alpha$ -ланцюга молекули фібрину; встановлено молекулярний механізм участі суперспіральних ділянок молекули фібрину в полімеризації.

**6. Практичне значення одержаних результатів.** Спрогнозовано методами комп'ютерного моделювання, створено та охарактеризовано низькомолекулярні сполуки – інгібітори урокіназного активатора плазміногену та фактора Ха, які є потенційними неімуногенними та ефективними засобами з антитромботичною та антиметастатичною дією відповідно. Встановлення механізмів дії сполук каліксаренового ряду і пептидів, що імітують послідовність шарнірного регіону суперспіральної ділянки фібрину, на полімеризацію фібрину дозволить в подальшому оптимізувати дані сполуки (як у випадку з каліксаренами), так і створити на їх основі низькомолекулярні органічні інгібітори (у випадку з пептидами).

**7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.** За результатами дослідження опубліковано 8 статей у фахових наукових виданнях України та міжнародних журналах і 4 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових Всеукраїнських та Міжнародних конференцій. Отримано 2 патенти. Основні наукові положення дисертаційного дослідження повністю, на професійному рівні викладені у представлених публікаціях та обговорені на наукових зібраннях.

**8. Структура дисертації.** Дисертаційна робота містить вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати досліджень з їх обговоренням, викладених в 4 розділах, заключення, висновки, список використаних літературних джерел (139 посилань). Дисертаційна робота викладена на 163 сторінках (з них 59 (128) сторінок основної частини), містить 68 рисунків та 6 таблиць. Співвідношення між обсягом складових дисертаційної роботи відповідає рекомендованим.

У вступі дисертантом обґрунтовано актуальність дослідження, сформульовано мету, завдання, вказані методи дослідження. Відображено наукову новизну, теоретичне та практичне значення роботи. Наведені дані про особистий внесок здобувача, апробацію. Огляд літератури стосується аналізу наявних даних за темою дослідження. Проаналізовано сучасний стан проблеми, обґрунтовано актуальність та необхідність проведення досліджень.

У розділі «Матеріали та методи дослідження» детально описано великий набір сучасних методів досліджень, а саме базові біохімічні та біофізичні методи, зокрема спектрофотометрія, електронна мікроскопія, турбідиметрія, електрофорез протеїнів, хроматографія, тощо; методи клітинної біології та підходи до культивування клітин, агрегатометрія тромбоцитів; методи ензимології, зокрема застосування хромогенних субстратів для визначення дії інгібіторів на активність ензимів; методи комп'ютерного моделювання, докінгу та повноатомної і крупнозернистої молекулярної динаміки.

Результати та їх обговорення викладено у 4 розділах. Представлено експериментальні дані, отримані поєднанням комп'ютерного моделювання з методами класичної біохімії. Отримані результати підтверджують, що такий підхід є необхідним як для глибшого розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі біохімічних процесів, так і для забезпечення віртуальних висновків міцним практичним підґрунтям. Завдяки поєднанню технологій *in silico* з експериментальними підходами отримано важливі прикладні та фундаментальні результати.

На основі проведених досліджень дисертантом сформульовано п'ять висновків, які відповідають поставленим завданням та повною мірою

відображають результати роботи. Рівень викладення та аналізу матеріалу вказує на належний рівень фахової підготовки дисертанта та системне мислення. Особливої уваги заслуговує низка ілюстративного матеріалу щодо пошуку низькомолекулярних інгібіторів ензимів системи гемостазу з залученням біоінформатичних підходів, що візуалізує описані в тексті етапи дослідження та полегшує їх сприйняття.

**9. Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення.** Дисертаційна робота Олексія ГРАБОВСЬКОГО містить всю необхідну для дисертації інформацію, написана зрозуміло, гарно проілюстрована. Принципових недоліків у цій роботі не виявлено, проте є низка орфографічних помилок, що ніяк не впливає на якість самої роботи. Є декілька питань дискусійного характеру:

1. Бажано було дослідити вплив сполук-інгібіторів урокіназного активатора плазміногену на інші ензими такі як, наприклад, тромбін, фактор Ха, тканинний активатор плазміногену з метою перевірки їх селективності.
2. Цікавим було б застосувати молекулярну динаміку структур пептид-фібрин з метою оцінки стабільності комплексоутворення і додаткової перевірки моделі.
3. Чому було використано метод “umbrella sampling” для визначення енергії зв’язування каліксаренів з фібрином? І чи тестували Ви інші підходи?
4. Чому Ви рахували абсолютну енергію зв’язування каліксаренів з фібрином, а не розраховували відносну енергію зв’язування?

**10. Висновок** Дисертаційна робота Олексія ГРАБОВСЬКОГО «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу» за своєю актуальністю, науково-теоретичним рівнем, науковою новизною і практичним значенням повністю 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, а здобувач

заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

Канд. біол. наук, н. с.  
відділу молекулярної та квантової біофізики  
Інституту молекулярної біології і генетики  
НАН України

Василь ГУРМАЧ