

## АНОТАЦІЯ

*Грабовський О.О.* Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2023.

Гемостатична система - це комплекс судинних, тромбоцитарних і гуморальних компонентів плазми крові, які забезпечують швидке припинення кровотечі при ушкодженні судин. В разі порушення регуляторних механізмів гемостазу виникає надмірна продукція тромбіну, що може призвести до утворення внутрішньосудинних тромбів і спричинити тромботичні ускладнення.

Тому вивчення молекулярних механізмів тромбоутворення є важливим завданням біохімії, а пошук шляхів ефективного запобігання утворенню тромбу в судині – важливе питання сучасної медицини та біохімії. Зважаючи на це, створення нових лікарських препаратів, направлених на попередження тромбоутворення, є доволі актуальним на сьогоднішній день. Існує кілька стратегій пошуку таких препаратів.

Найперспективнішим та унікальним напрямком, започаткованим у Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, є інгібування полімеризації фібрину як на стадії формування протофібрил, так і на стадії їхньої латеральної асоціації. Розуміння механізмів міжмолекулярних взаємодій молекул фібрину та пошук нових сайтів полімеризації може стати запорукою створення нових активних і селективних низькомолекулярних інгібіторів та синтетичних пептидів. Застосування методів молекулярного моделювання, таких як: моделювання структур протеїнів та молекулярна динаміка, разом з методами

класичної біохімії можуть розширити знання про механізми полімеризації фібрину.

Друга стратегія – класична – полягає в розробці інгібіторів активованих факторів зсідання крові, основною функцією яких є участь в ензиматичних реакціях коагуляційного каскаду. В фармацевтичній галузі пошук інгібіторів проводять за допомогою як високопродуктивного, так і віртуального скринінгу. Швидкість, дешевизна, можливість пояснити механізм дії сполук робить останню технологію все більш популярною. Основними і найбільш точними методами віртуального скринінгу є молекулярний докінг та пошук за подібністю. Їхнє застосування дозволяє проаналізувати мільйонні бібліотеки органічних сполук і відібрати декілька сотень для перевірки їх активності *in vitro*. Ключовою мішенню застосування таких інгібіторів є фактор Ха, який у активній формі безпосередньо активує протромбін.

Попри те, що головною функцією протеїнів системи гемостазу є зупинка кровотечі та підтримка крові в рідкому стані, все більше даних ілюструє факт їхнього залучення в інші як фізіологічні, так і патологічні процеси. До таких поліфункціональних протеїнів належить, зокрема, активатор плазміногену урокіназного типу, який залучений не тільки в процес фібринолізу, а й бере участь в імунній відповіді (вродженій і набутій), сперматогенезі, ангиогенезі та рості пухлин. Відповідно, розробка молекул, здатних інгібувати активність урокінази, становить значний інтерес.

Отже, представлену дисертаційну роботу було присвячено дослідженню структури, функцій та способів інгібування сайтів міжмолекулярних взаємодій таких ключових сайтів мішеней: центрів полімеризації фібриногену, активного центру фактора Ха та урокінази. Робота включала в себе комплекс заходів, спрямованих на ідентифікацію сайтів міжмолекулярних взаємодій, молекулярний докінг та динаміку, перевірку *in vitro* та *in vivo*.

Для досягнення поставлених цілей методами хроматографії, що розділяє за розміром, турбідиметрії та електронної мікроскопії вивчено комплексоутворення фібрину з продуктами гідролізу фібрин(оген)у, ефекти поліпептидів (структурних аналогів суперспірального регіону молекули фібрину), а також низькомолекулярних сполук калікс[4]аренового ряду на процес полімеризації фібрину. З використанням підходів *in silico* створено просторові моделі таких взаємодій, спрогнозовано оптимальні конформації молекул та структури ефекторів, верифіковано експериментальні дані.

Методами ензиматичного аналізу, коагулометрії та агрегатометрії вивчено інгібіторну дію низькомолекулярних сполук з бібліотеки, створеної *in silico*, на активність фактора Ха *in vitro*. Крім того, апробовано обрані сполуки-інгібітори *in vivo* за умов внутрішньовенного введення щурам.

Методами ензиматичного аналізу та з використанням підходів клітинної біології досліджували дію низькомолекулярних сполук з бібліотеки, створеної *in silico*, на активність урокінази. Перевіряли обрані сполуки на моделі проліферації клітин у культурі.

Проведено дослідження формування потрійного комплексу методом гель-проникної хроматографії у різних системах: у системі “фібрин desAB, D-димер, D-регіон”, у системі “фібрин desAB, D-димер, D-регіон у присутності пептиду GHRP”, а також у системі “фібрин desAB, D-димер, D-регіон у системі за присутності фрагменту B $\beta$ 1-42”. Показано, що за присутності пептиду GHRP, що конкурує з центром полімеризації «B» за центри полімеризації «b», які розташовано у D-регіонах, потрійний комплекс не формується. В той самий час у суміші desAB, D-димеру та D-фрагменту за присутності фрагменту B $\beta$ 1-42 потрійний комплекс формується, що вказує на необхідність залучення лише «B»-«b» центрів полімеризації фібрину. Результати турбідиметричних досліджень узгоджуються з даними по комплексоутворенню і доводять, що D-фрагмент посилює інгібіторний ефект D-димеру, і, таким чином, разом ці

фрагменти проявляють адитивний ефект, що, у свою чергу, підтверджує включення третього D-регіону в DD-E-тріаду. За допомогою електронної мікроскопії було показано, що фібрили полімерного фібрину не зазнають помітних змін за умов формування у присутності D-димеру, оскільки спорідненість останнього до мономерного фібрину менша, ніж між молекулами самого мономерного фібрину. В результаті, попри меншу швидкість фібриноутворення, згусток формується все ж із протофібрил та фібрил фібрину без включення D-димеру – тобто після того, як D-димер витісняється зі структури молекулами фібрину. Проте, за присутності D-димеру та D-фрагменту формуються «дефектні» протофібрили, а з них – фібрили, які є загалом тоншими; спостерігається інтенсивне галуження тонких фібринових ниток. Вочевидь, така порушена структура і призводить до зростання кінцевої мутності згустку фібрину за присутності еквімолярної суміші D-димера та D-фрагмента. Методами комп'ютерного моделювання було побудовані теоретичні моделі потрійного комплексу і галуження протофібрил за рахунок включення третього D-регіону в DD-E-тріаду.

Для дослідження міжмолекулярної взаємодії ряду сполук калікс[4]аренового ряду з молекулою фібрину було побудовано відсутні ділянки кристалографічної структури фібриногену (PDB ID:3GHG), а власне ділянку  $\alpha$ -ланцюга 17-26, до якої входить центр полімеризації «А», що є сайтом зв'язування калікс[4]аренів. Побудовано 3D-структури калікс[4]аренів з різною кількістю залишків бісфосфонові кислоти та проведено послідовно молекулярний докінг і молекулярну динаміку. Показано формування водневих зв'язків і сольових містків між позитивнозарядженими амінокислотними залишками  $\alpha$ -ланцюга фібрину та бісфосфоновими залишками калікс[4]аренів, причому при зменшенні кількості з трьох до двох залишків міцність комплексу значно зменшується. Це було підтверджено в експериментах з розрахунку абсолютної вільної енергії зв'язування.

Для дослідження взаємодії пептидів, що імітують послідовності суперспіральної ділянки молекули фібрину, з молекулою фібрину використано турбідиметричний метод і показано інгібуючий вплив пептидів на полімеризацію фібрину. Для встановлення міжмолекулярних взаємодій між ними отримано ряд конформацій пептидів. Структури пептидів A $\alpha$ 91-103 MEILRGDFSSANN, B $\beta$ 125-135 QKRQKQVKDN та  $\gamma$ 69-77 NPDESSKPN отримано за допомогою молекулярної динаміки і кластеризації з використанням Dihedral Principal Component Analysis. Встановлено два потенційні сайти взаємодії, що розміщені в суперспіральній ділянці молекули фібрину, і проведено докінг пептидів в один з сайтів.

Створено фінальну фокусну бібліотеку низькомолекулярних сполук – інгібіторів фактора Ха. Проведено *in vitro* біологічний скринінг низькомолекулярних сполук потенційних інгібіторів фактора Ха. Показано, що у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини інгібітори фактора Ха концентраційно залежно ефективно інгібують агрегацію тромбоцитів та затримують фібриноутворення. Виявлені закономірності свідчать про ефективне гальмування генерації тромбіну внаслідок прямого інгібування фактора Ха. Вибрано сполуки з вираженою інгібіторною активністю щодо фактора Ха для перевірки їх дії *in vivo*. На моделях *in vivo* продемонстровано інгібіторний ефект досліджуваних низькомолекулярних сполук, про що свідчить відсутність процесу агрегації тромбоцитів та процесу фібриноутворення.

З використанням молекулярного докінгу та молекулярної динаміки проведено пошук низькомолекулярних сполук, які є ефективними інгібіторами урокіназного активатора плазміногену. Інгібітор, що мав найвищу афінність до активного центру ензиму (IC<sub>50</sub> = 2,5  $\mu$ M), також ефективно пригнічував проліферацію пухлинних клітин у культурі (IC<sub>50</sub> = 24.5  $\mu$ M). Дана сполука може бути використана як основа для подальшого раціонального дизайну з метою підвищення її специфічності та селективності. Отже, запропоновані

сполуки є потенційними неімуногенними та ефективними засобами з антитромботичною та антиметастатичною дією відповідно. Подальше дослідження створених сполук є перспективним для розробки терапевтичних препаратів.

Проведені дослідження є вагомим кроком на шляху до розуміння тонких молекулярних механізмів формування протофібрил фібрину, фібрил та формування тривимірної сітки фібрину – основи тромбу. Створені у рамках виконання роботи молекулярні ефектори (пептиди, калікс[4]арени, низькомолекулярні інгібітори ензимів) можуть розглядатися як основа для створення антитромботичних та антиметастатичних препаратів.

**Ключові слова:** протеїни, фібрин(оген), калікс[4]арен, ензими, урокіназа, гемостаз, тромбоцити, молекулярна динаміка, молекулярний докінг, комп'ютерне моделювання, молекулярна структура, віртуальний скринінг, інгібітор, серинові протеїнази, пухлини.

### Список публікацій здобувача

#### Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

#### СТАТТІ

1. **Hrabovskyi, O.**; Syrko, M. Detection of ternary complex of fibrin desAB with D-dimer and D-fragment of fibrin. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 21-23. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.021>.
2. Kucheriavyi, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Rebriev, A. V.; Stohnii, Y. Limited proteolysis of fibrinogen  $\alpha$ C-region reveals its structure. *Biotechnologia Acta* 2022, 15 (2), 60. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>.
3. Ahishev, D.; **Hrabovskyi, O.** Synthesis of calix[4]arenes with fixed conformation as potential inhibitors of fibrin polymerization. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 7-10. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.007>.

4. Pyrogoва, L.; Makogonenko, Y.; **Hrabovskiy, O.**; Marunych, R.; Bereznytskyj, G.; Gogolinskaya, G. Chlorine-binding structures: role and organization in different proteins. Ukr. Biochem. J. 2021. <https://doi.org/10.15407/ubj93.04.005>.
5. Marunych, R.; Gornytska, O.; Gudzenko, A.; Salnyk, O.; **Hrabovskiy, O.**; Bereznytskyj, G.; Makogonenko, Y. The role of endothelium in the regulation of the aggregate state of blood under normal conditions, in atherosclerosis and arterial hypertension. Fiziol. Zh. 2021, 67(3), 87-99. <https://doi.org/10.15407/fz67.03.087>.
6. Horak, I.; Prylutska, S.; Krysiuk, I.; Luhovskyi, S.; **Hrabovsky, O.**; Tverdokhleб, N.; Franskevych, D.; Rumiantsev, D.; Senenko, A.; Evstigneev, M. et al. Nanocomplex of Berberine with C60 Fullerene Is a Potent Suppressor of Lewis Lung Carcinoma Cells Invasion In Vitro and Metastatic Activity In Vivo. Materials 2021, 14, 6114. <https://doi.org/10.3390/ma14206114>.
7. Vidovic, T.; Dakhovnik, A.; **Hrabovskiy, O.**; MacArthur, M.R.; Ewald, C.Y. AI-Predicted mTOR Inhibitor Reduces Cancer Cell Proliferation and Extends the Lifespan of *C. elegans*. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 7850. <https://doi.org/10.3390/ijms24097850>.

#### ПАТЕНТИ

1. Патент на винахід. Комісаренко С.В., Чернишенко В.О., Макогоненко Є.М., Пирогова Л.В., Луговська Н.Е., Горницька О.В., **Грабовський О.О.** Спосіб інгібування полімеризації фібрину синтетичними пептидами, які імітують фрагменти суперспіральної ділянки фібрин(оген)у. №143853. Заявка u202002124. від 30.03.2020. Опубл. 29.12.2020.
2. Міжнародна патентна заявка – WO2021201813 – Komisarenko S., Chernyshenko V., Makogonenko Y., Pyrogoва L., Lugovska N., Hornytska O., **Hrabovskiy O.** The method of inhibiting of the fibrin polymerization [https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021201813&\\_cid=P22-L4D7V6-70729-1](https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021201813&_cid=P22-L4D7V6-70729-1)

## ТЕЗИ

1. Bekala, M. I.; Markhaychuk, V. J.; Horak, I. R.; Krysiuk, I. P.; Skaterna, T. D.; Grebinyk, A. G.; Gudkova, O. O.; Latyshko, N. V.; Kishko, T. O.; **Hrabovskyi, O. O.**; Prylutska, S. V. Nanocomplex of berberine with C60 fullerene effectively decreases proliferation, motility, and metastasis of lung cancer cell. Матеріали конференції-конкурсу “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології” – Київ, 2021, 24.
2. Didkivskyi, V. A.; **Hrabovskyi, O. O.**; Humenyuk, A. S.; Selikhova, A. I.; Banya, M. O.; Cherenok, S. O.; Chernyshenko, V. O. Binding of calix[4]arene to the  $\alpha$ -knob of fibrin: in silico proves in vitro. Clusters and Nanostructured Materials (CNM-6). – Uzhhorod, 2020, 48-49.
3. **Hrabovskyi, O.**; Platonov, M. Development of the pharmacophore models for the identification of novel inhibitors of the urokinase plasminogen activator. XVII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances” - Kyiv, 2019.
4. **Hrabovskyi, O.O.**; Lugovska, N.E.; Kurchenko, T.O.; Chernishov, V.I. Coiled-coil region of fibrin(ogen) as the target of antithrombotic therapy. Students Symposium "Medicine and Science 2022", 2022.



## SUMMARY

*Hrabovskiy O.O.* Structure, functions, and molecular mechanisms of inhibition of the hemostasis' key proteins' active sites. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for applying for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, 2023.

The hemostasis system is a complex of vascular, platelet and humoral components of blood plasma that ensure rapid termination of bleeding in case of vascular damage. In the case of disruption of the regulatory mechanisms of hemostasis, excessive production of thrombin occurs, which can lead to the formation of intravascular clots and cause thrombotic complications.

For this reason, molecular mechanics of thrombus formation is an important biochemical issue; finding ways to efficiently prevent intravascular thrombus formation is a pressing problem of medical science. Creating new drugs to stave off thrombus formation is a fairly urgent task, and the search for them follows several strategies.

An unequalled, and currently the most promising, avenue to tackle this problem which was initiated in Palladin Institute of biochemistry of the NAS of Ukraine is to inhibit fibrin polymerization during the protofibril formation or during their lateral association. Understanding the mechanisms of intermolecular interactions of the fibrin molecules and discovering new polymerization sites can become a basis for developing novel active and selective low-molecular weight inhibitors and synthetic peptides. Such techniques as molecular modeling and molecular dynamics combined with the classical biochemical approaches can significantly enlarge our knowledge of fibrin polymerization.

Another possible strategy (the classical one) is to develop inhibitors of the activated blood clotting factors involved mostly in the enzymatic reactions of the coagulation cascade. In the pharmaceutical industry, inhibitors are sought using either the high-throughput or the virtual screening. The latter one is growing more popular

because it is fast and cheap and allows explaining the substances' action mechanisms. Virtual screening's main and most precise methods are molecular docking and similarity search. They allow analyzing databases containing millions of organic compounds and narrowing down the pool to be tested *in vitro* to a few hundreds. Factor Xa, which in its active form directly activates prothrombin, is a promising target for the search for inhibitors.

There are ever more findings to the effect that besides mostly being employed in stopping hemorrhages and keeping the blood liquid, the hemostasis proteins are also involved in other processes both physiological and pathological. One such multifunctional protein is the urokinase-type plasminogen activator. It is involved in the immunity (innate and adaptive), spermatogenesis, angiogenesis, and tumor growth. This is why, the development of molecules capable of inhibiting urokinase activity is of considerable interest.

The present thesis was dedicated to the structure, functions, and ways to inhibit sites of intermolecular interactions of the following protein targets: fibrinogen polymerization sites, active centers of the factor Xa and urokinase. The work included a number of approaches aimed at identifying sites of intermolecular interactions, molecular docking and dynamics, and testing *in vitro* and *in vivo*.

Size-exclusion chromatography, turbidity study, and electron microscopy were used to estimate formation of fibrin's complexes with fibrin(ogen) hydrolysis products and effects of polypeptides (structural analogues of the fibrin's hinge region) and low-molecular calix[4]arenes on the fibrin polymerization. Using *in silico* methods, spatial models of such interactions were created, optimal conformations of molecules and structures of effectors were predicted, and experimental data were verified.

Methods of enzymatic analysis, coagulometry, and aggregatometry were used to study the inhibitory effects of the low-molecular compounds from the *in silico* library on the activity of factor Xa *in vitro*. We also tested selected inhibitory compounds in rats by intravenous injection.

Methods of enzymatic analysis and methods of cell biology were used to study how the low-molecular compounds from the *in silico* library influenced the urokinase activity. Selected compounds were tested using a model of cell proliferation in culture.

We studied the formation of the ternary complex using the size-exclusion chromatography in different systems: 1) fibrin desAB, D dimer, D-fragment 2) fibrin desAB, D dimer, D-fragment in the presence of GHRP peptide; 3) fibrin desAB, D dimer, D-fragment in the system in the presence of the B $\beta$ 1-42 fragment.

In the presence of the GHRP peptide which competes with the “B”-knobs for the “b”-holes in D-regions, the ternary complex is not formed. However, it is formed in a mixture of fibrin desAB, D dimer, and D fragment in the presence of B $\beta$ 1-42 fragment; this implies that only the “B”-“b” knob-hole interactions need to be involved. Data of turbidity study agree with the data on complex formation and prove that the D fragment enhances the inhibitory effect of the DD fragment and that the two fragments have an additive effect; this finding supports the inclusion of the third D region in the DDE complex. Electron microscopy was employed to show that fibrils of polymeric fibrin do not undergo noticeable change if formed in the presence of D dimer as D dimer’s affinity to monomeric fibrin is lesser than the affinity between the monomeric fibrin molecules. As a result, despite a lesser rate of fibrin production, the clot is still made up from protofibrils and fibrils of fibrin without including D dimer (that is, after D dimer is forced out of the structure by the fibrin molecules). However, in the presence of DD and D fragments the protofibrils are “defective”, and the fibrils they form are generally thinner; the thin fibrin threads are frequently branched. Obviously, such a disrupted structure is the reason for the increasing final opacity of the fibrin clot in the presence of the equimolar mixture of DD and D-fragments. Moreover, theoretical models of the ternary complex and branching of protofibrils due to the inclusion of the third D-region in the DD-E-triad were constructed by computer modelling.

To study the interaction of a number of calix[4]arene derivatives with fibrin, we modelled the crystallographic structure of fibrinogen with the absent parts (PDB

ID:3GHG): the 17-26 fragment of the  $\alpha$  chain which includes the “A-knob”, a calix[4]arene-binding site. We built 3D-structures of calix[4]arenes with different numbers of bisphosphonic residues and performed the docking and the molecular dynamics. The formation of hydrogen bonds and salt bridges between the positively charged amino acid residues of the A $\alpha$ -chain of fibrin and the bisphosphonate residues of calix[4]arenes was shown, and the strength of the complex decreases significantly when the number of functional groups decreases from three to two. This was confirmed in experiments of calculating the absolute free binding energy.

The turbidimetry was used to study the interaction of peptides that mimick the sequences of the fibrin’s coiled-coil region with the fibrin molecule and it was shown the inhibitory effect of peptides on fibrin polymerisation. A number of peptide conformations were obtained to determine the intermolecular interactions between them. The structures of the peptides A $\alpha$ 91-103 MEILRGDFSSANN, B $\beta$ 125-135 QKRQKQVKDN and  $\gamma$ 69-77 NPDESSKPN were obtained by molecular dynamics with subsequent clustering using Dihedral Principal Component Analysis. Two potential interaction sites located in the coiled-coil region of the fibrin molecule were identified, and peptides were docked into one of those sites.

There was created a final target library of low-molecular compounds inhibiting factor Xa. Potential inhibitors of factor Xa were screened *in vitro*. In the platelet-rich human plasma, factor Xa inhibitors inhibit platelet aggregation and slow down fibrin formation in a dose-dependent manner. The patterns suggest efficient slowing down of thrombin generation due to direct inhibition of factor Xa. Compounds with pronounced inhibitory activity towards factor Xa were selected to test *in vivo*. In the *in vivo* models, the inhibitory effect of the studied low-molecular compounds was confirmed, as there was observed neither platelet aggregation nor fibrin formation.

Using molecular docking and molecular dynamics, we performed virtual screening of small molecule compounds that could be effective inhibitors of urokinase plasminogen activator. The inhibitor with the highest affinity for the active site of the enzyme ( $IC_{50} = 2.5 \mu M$ ) also effectively inhibited the proliferation of tumor cells in culture ( $IC_{50} = 24.5 \mu M$ ). This compound can be used as a basis for

further rational design to improve its specificity and selectivity. Thus, the proposed compounds are potential non-immunogenic and effective agents with antithrombotic and antimetastatic effects, respectively. Further study of the compounds is promising for the development of therapeutic drugs.

The research is a solid contribution towards understanding molecular mechanisms of the formation of fibrin protofibrils, fibrils, and three-dimensional network which is the basis of a clot. The created molecular effectors (peptides, calix[4]arenes, low-molecular inhibitors of enzymes) can be viewed as a platform to create antithrombotic and anti-tumour drugs.

**Keywords:** proteins, fibrin(ogen), calix[4]arene, enzymes, urokinase, hemostasis, platelets, molecular dynamics, molecular docking, computer simulation, molecular structure, virtual screening, inhibitor, serine proteinases, cancer.

### **List of the candidate's publications**

#### **Works publishing the main scientific results of the dissertation:**

##### ARTICLES

1. **Hrabovskyi, O.**; Syrko, M. Detection of ternary complex of fibrin desAB with D-dimer and D-fragment of fibrin. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 21-23. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.021>.
2. Kucheriavyi, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Rebriev, A. V.; Stohnii, Y. Limited proteolysis of fibrinogen  $\alpha$ C-region reveals its structure. *Biotechnologia Acta* 2022, 15 (2), 60. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>.
3. Ahishev, D.; **Hrabovskyi, O.** Synthesis of calix[4]arenes with fixed conformation as potential inhibitors of fibrin polymerization. *Biotechnologia Acta* 2023, 16 (2), 7-10. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.007>.
4. Pyrogorova, L.; Makogonenko, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Marunych, R.; Bereznytskyj, G.; Gogolinskaya, G. Chlorine-binding structures: role and organization in different proteins. *Ukr. Biochem. J.* 2021. <https://doi.org/10.15407/ubj93.04.005>.

5. Marunych, R.; Gornytska, O.; Gudzenko, A.; Salnyk, O.; **Hrabovskyi, O.**; Bereznyskyj, G.; Makogonenko, Y. The role of endothelium in the regulation of the aggregate state of blood under normal conditions, in atherosclerosis and arterial hypertension. *Fiziol. Zh.* 2021, 67(3), 87-99. <https://doi.org/10.15407/fz67.03.087>.
6. Horak, I.; Prylutska, S.; Krysiuk, I.; Luhovskyi, S.; **Hrabovsky, O.**; Tverdokhlebl, N.; Franskevych, D.; Rumiantsev, D.; Senenko, A.; Evstigneev, M. et al. Nanocomplex of Berberine with C60 Fullerene Is a Potent Suppressor of Lewis Lung Carcinoma Cells Invasion In Vitro and Metastatic Activity In Vivo. *Materials* 2021, 14, 6114. <https://doi.org/10.3390/ma14206114>.
7. Vidovic, T.; Dakhovnik, A.; **Hrabovskyi, O.**; MacArthur, M.R.; Ewald, C.Y. AI-Predicted mTOR Inhibitor Reduces Cancer Cell Proliferation and Extends the Lifespan of *C. elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 7850. <https://doi.org/10.3390/ijms24097850>.

#### PATENTS

1. Patent of the invention. Komisarenko S., Chernyshenko V., Makogonenko Y., Pyrogoва L., Lugovska N., Hornytska O., **Hrabovskyi O.** Спосіб інгібування полімеризації фібрину синтетичними пептидами, які імітують фрагменти суперспіральної ділянки фібрин(оген)у. №143853. Заявка u202002124. від 30.03.2020. Опубл. 29.12.2020.
2. International PCT-application – WO2021201813 – Komisarenko S., Chernyshenko V., Makogonenko Y., Pyrogoва L., Lugovska N., Hornytska O., **Hrabovskyi O.** The method of inhibiting of the fibrin polymerization [https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021201813&\\_cid=P22-L4D7V6-70729-1](https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021201813&_cid=P22-L4D7V6-70729-1)

#### CONFERENCE PAPERS

1. Bekala, M. I.; Markhaychuk, V. J.; Horak, I. R.; Krysiuk, I. P.; Skaterna, T. D.; Grebinyk, A. G.; Gudkova, O. O.; Latyshko, N. V.; Kishko, T. O.; **Hrabovskyi, O. O.**; Prylutska, S. V. Nanocomplex of berberine with C60 fullerene effectively decreases proliferation, motility, and metastasis of lung cancer cell. *Матеріали*

конференції-конкурсу “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології” – Київ, 2021, 24.

2. Didkivskiy, V. A.; **Hrabovskiy, O. O.**; Humenyuk, A. S.; Selikhova, A. I.; Banya, M. O.; Cherenok, S. O.; Chernyshenko, V. O. Binding of calix[4]arene to the  $\alpha$ -knob of fibrin: in silico proves in vitro. Clusters and Nanostructured Materials (CNM-6). – Uzhhorod, 2020, 48-49.

3. **Hrabovskiy, O.**; Platonov, M. Development of the pharmacophore models for the identification of novel inhibitors of the urokinase plasminogen activator. XVII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances” - Kyiv, 2019.

4. **Hrabovskiy, O.O.**; Lugovska, N.E.; Kurchenko, T.O.; Chernishov, V.I. Coiled-coil region of fibrin(ogen) as the target of antithrombotic therapy. Students Symposium "Medicine and Science 2022", 2022.