

Висновок наукового керівника

Володимира ЧЕРНИШЕНКА, д.б.н, завідувача відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна на дисертаційну роботу Олексія ГРАБОВСЬКОГО

«Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу», що подається на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 «Біологія»

1. Особливості проходження підготовки в аспірантурі/прикріплення до Аспірантури.

Олексій ГРАБОВСЬКИЙ відповідно до рішення комісії по прийому в аспірантуру від 8 жовтня 2019 р. (прот № 1) був зарахований в аспірантуру з відривом від виробництва по спеціальності 091 - біологія (Наказ № 6-а від 10.10.2019). Науковим керівником була з 01.10.2019 по 30.09.2023 д.б.н., проф. Платонова Тетяна Миколаївна, а з 01.10.2023 - д.б.н. Чернишенко Володимир Олександрович (наказ 6-а від 12.09.2023 р.). Індивідуальний план виконання ОНП підготовки доктора філософії складено вчасно згідно строку, встановленого Наказом №18 по Інституту, та затверджено на засіданні Вченої ради Інституту 18.12.2019 р. (протокол № 12). Темою дисертаційної роботи затверджено: ««Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу». Всі блоки ОНП, обов'язкові дисципліни, дисципліни за вибором здобувача та вибором Інституту, ГРАБОВСЬКИМ О. освоєні успішно та в повному обсязі. Протягом 2019-2023 рр ним повністю завершено експериментальну роботу, рукопис дисертації та опубліковано статті в фахових наукових журналах з висвітленням матеріалів дисертації.

Всю документацію для звітування та таку, що вимагається процедурою підготовки дисертації, здобувач оформлював та надавав вчасно.

2. Особливості формування індивідуальної освітньої траєкторії та виконання індивідуального плану здобувача

За час роботи в Інституті та проходження ОНП ГРАБОВСЬКИЙ Олександр набув рівня компетентності, що відповідає вимогам підготовки доктора філософії та складається з трьох основних блоків. Загально-науковий блок охоплює наступні дисципліни: філософію культури та науки, іноземну мову, організацію написання дисертаційної роботи, педагогіку вищої школи, асистентську педагогічну практику. В межах навчання за цим блоком здобувач Олександр ГРАБОВСЬКИЙ прослухав повний курс лекцій, успішно виконав передбачені програмою завдання, та з високими оцінками здав заліки та іспити (85-97 балів за шкалою ЄТКС). Зокрема, слід відмітити надзвичайно високий рівень володіння професійною англійською мовою, що був підтверджений додатково міжнародним іспитом TOEFL. За рахунок цього здобувач ефективно і якісно опрацьовував літературні джерела для написання дисертаційної роботи та комунікував на конференціях. Основні вимоги до написання дисертаційної роботи здобувач вивчав за відповідними державними нормативними документами, що забезпечило високу професійність, креативність й ефективність в реалізації підготовки рукопису дисертації. Необхідність для наукового працівника мати відповідні навички у сфері педагогіки є обов'язковою умовою для його професійного зростання. ГРАБОВСЬКИЙ О. успішно впорався з цією вимогою, завершивши курс "Педагогіка вищої школи" та застосовуючи отримані знання під час асистентської педагогічної практики зі студентами-біологами. Під час цієї практики він самостійно провів 4 семінари та 5 практичних занять, а також обговорення актуальних

наукових публікацій, що стосуються роботи студентів на базі відділу структури і функцій білка Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна. До ключових навичок дослідника належить вміння публікувати результати своєї роботи у наукових виданнях та презентувати наукові результати на відповідних форумах. ГРАБОВСЬКИЙ О. володіє цими навичками на високому рівні, беручи участь у написанні статей, оформленні патентів, а також активно беручи участь у вітчизняних та міжнародних конференціях, де представляв результати своєї експериментальної роботи через тези, презентації та доповіді.

3. Успіхи у набутті компетентностей наукового пошуку

Один із ключових аспектів, який варто відзначити і який є першочерговим, це вміння Олексія ГРАБОВСЬКОГО ефективно формулювати гіпотези та наукові запитання. Це стає можливим за рахунок вміння працювати з різноманітними джерелами даних, критично аналізувати інформацію. Він вміло відбирав та оцінював наукові дані, проводив порівняльний аналіз різних підходів та тлумачив результати, що вказує на його аналітичні здібності. Також важливим є те, що дисертант виявив гнучкість у використанні різних методологій дослідження, адаптуючи їх до конкретних вимог своєї роботи. Самостійно опанував надзвичайно складні методи комп'ютерної хімії, такі як молекулярний докінг та молекулярна динаміка, при чому розуміючи і беручи до уваги певні можливі недоліки, пов'язані з цими методами. Дисертант демонстрував вміння чітко структурувати свою наукову роботу, планувати етапи дослідження та виконувати їх у відведених часових рамках, що вказує на його організаційні здібності та самодисципліну. Додатково, завдяки глибокому розумінню та використанню методів обробки даних та статистичних інструментів, дисертант ефективно використовував ці знання для підтвердження своїх гіпотез і формулювання обґрунтованих висновків.

Наприкінці, варто підкреслити його здатність до самокритики та постійного підвищення кваліфікації. Дисертант прагне до постійного вдосконалення своїх навичок, активно вивчає нові наукові напрями, бере участь у додаткових навчальних програмах та курсах для розширення своїх знань. В цілому, успіхи дисертанта в набутті компетентностей наукового пошуку є вражаючими та обіцяють плідну кар'єру в науковій сфері, враховуючи його здібності, активну участь у науковому співтоваристві та бажанні постійного розвитку.

4. Актуальність теми дисертаційної роботи.

Система гемостазу - біологічна система, яка забезпечує, з одного боку, збереження рідкого стану крові, а з іншого - запобігання кровотечі. Від цієї системи значною мірою залежить ефективність кровопостачання тканин. Здійснюється гемостаз трьома функціонально-структурними компонентами, що взаємодіють між собою: стінками судин, клітинами крові (у т.ч. тромбоцитами) та плазменними факторами крові (системою зсідання крові, фібринолізу та ін.). Порушення функціонування системи гемостазу призводять до серцево-судинних захворювань, які посідають перше місце серед причин інвалідизації та смертності у світі. Основними причинами смертності є внутрішньосудинне тромбоутворення, яке є результатом порушення регуляції процесів формування та деградації полімерного фібрину. 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. Саме тому 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.

5. Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках НДР за темами: «Ідентифікація сайтів міжмолекулярних взаємодій фібрин(оген)у» (2022-2023 рр., № державної реєстрації 0122U002132), «Взаємодії компонентів системи гемостазу на клітинному та молекулярному рівні в процесі формування та елімінації тромбу» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U002512), «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих антифібринолітичних та антитромботичних агентів» (2015-2019 рр., № державної реєстрації 0115U003650), «Вивчення нового механізму галуження протофібрил, що відбувається у процесі формування тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу» (2020 р., № державної реєстрації 0120U102682).

6. Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше показано:

1. 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, що можна розглядати як основу нового механізму галуження протофібрил. Методами *in silico* побудовано теоретичну модель галуження двох протофібрил фібрину.
2. Показано з використанням молекулярного докінгу, 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.

3. Доведено, що інгібіторна дія сполук калікс[4]аренового ряду на полімеризацію фібрину обумовлена взаємодіями N-кінцевої частини α A-ланцюга фібрину з залишками бісфосфонових кислот калікс[4]аренів, тому критичною для стабільного зв'язування інгібітора є кількість цих залишків. Додатково вперше розраховано абсолютну енергію зв'язування калікс[4]аренів з фібрином.
4. Запропоновано з використанням докінгу та молекулярної динаміки нові інгібітори урокінази, доведено їхню ефективність *in vitro* та показано здатність найактивнішої сполуки ефективно пригнічувати проліферацію пухлинних клітин у культурі.
5. 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, проведено успішну апробацію за умов внутрішньовенного введення.

7. Наукове та практичне значення дослідження

Отримані дані свідчать про новий механізм галуження протофібрил, що відбувається за рахунок включення D-регіону кінцевої молекули фібрину однієї протофібрили в DDE-тріаду другої протофібрили. Розроблені і охарактеризовані інгібітори полімеризації фібрину, що мають різний механізм дії: калікс[4]арени екранують сайт полімеризації "A", пригнічуючи формування протофібрили, пептиди - структурні аналоги шарнірної ділянки фібрину інгібують стадію латеральної асоціації. Ці результати можна в подальшому використати для розробки нових ще більш ефективних та селективних сполук. Отримано ефективну сполуку, що інгібує ензиматичну активність урокіназного активатора плазміногену,

перевірено її активність на культурі пухлинних клітин раку грудної залози. Отримано нові інгібітори фактора X, які ефективно інгібували агрегацію тромбоцитів *in vitro* та *in vivo*.

8. Повнота викладення матеріалу дисертації в наукових публікаціях.

Результати, представлені в дисертації, висвітлені в 4 наукових публікаціях в фахових виданнях, 1 патенті, 1 міжнародній патентній заявці, а також в матеріалах 4 вітчизняних та міжнародних наукових конференцій.

9. Структура та зміст дисертації, її завершеність та відповідність установленим вимогам щодо оформлення.

Структура та зміст дисертації відповідають вимогам щодо оформлення цих рукописів згідно Наказу МОН №40 від 12.01.2017 р. Дисертація складається з вступу, з розділів «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», 5 розділів «Результатів», висновків, переліку використаних джерел. Рукопис викладений на на 168 сторінках (з них 128 сторінок основної частини), містить 65 рисунків та 4 таблиці.

10. Дотримання принципів академічної доброчесності.

Дисертаційна робота здобувана ГРАБОВСЬКОГО Олексія повністю відповідає п.12 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 щодо вимог академічної доброчесності, оскільки не містить плагіату, самоплагіату, фальсифікацій та фабрикації, містить результати, отримані особисто, у всіх інших випадках наводяться посилання на співавторів наукових публікацій та відповідні джерела.

11. Дискусійні положення та зауваження до дисертації.

Більшість зауважень носять технічний характер та не впливають на

науковий рівень представлено рукопису.

12. Загальний висновок.

Дисертаційна робота Олексія ГРАБОВСЬКОГО «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу» за актуальністю, науково-теоретичним рівнем, новизною постановки та розв'язанням проблем, 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, а здобувач заслуговує на присудження ступеня ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія, за спеціальністю 091 - Біологія.

Науковий керівник:

д.б.н,
завідувач відділу
структури та функції білка
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна

10.10.2023

Володимир ЧЕРНИШЕНКО

Підпис В. Чернишенка
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"10" 10 2023 р.

