



“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Директор Інституту біохімії

О.В. Палладіна НАН України,
доктор біологічних наук, професор
С.В. Комісаренко

протокол № ___ від _____ 202_р.

ВИСНОВОК

Про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації Грабовського Олексія Олеговича “Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протейнів гемостазу”, поданої на здобуття освітньо-наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

1. Актуальність теми дисертаційної роботи. Гемостаз є динамічною рівноважною системою, належне функціонування якої забезпечує циркуляцію крові в рідкому стані, а за умов ушкодження судини – ефективну зупинку кровотечі. Будь-яке порушення рівноваги у системі гемостазу потребує негайної компенсації для підтримки балансу, який забезпечує нормальне функціонування організму. Неможливість відновлення цього балансу призводить до патологічних станів, у основі яких лежать тромбози (ішемічний інсульт, інфаркт міокарду, тромбоемболія легеневої артерії, тощо) або геморагії (геморагічний інсульт, внутрішні крововиливи, тощо).

Таким чином, актуальним питанням сучасної біохімії та біотехнології є пошук ефекторів, які б ефективно та специфічно змінювали активність окремих компонентів системи гемостазу, запобігаючи розвитку патологічних процесів. До таких ефекторів насамперед належать сполуки з антитромботичною дією: інгібітори факторів каскаду зсідання крові, фібринолітики, інгібітори активації тромбоцитів, тощо. Тому метою роботи було дослідження структури, функцій та способів інгібування центрів міжмолекулярних взаємодій таких ключових сайтів/мішеней: центрів полімеризації фібрину, активного центру фактора Ха та урокіназного активатора плазміногену.

2. У дисертації вирішено такі завдання:

1. Досліджено потенційну участь пари центрів полімеризації фібрину «В:b» у формуванні та галуженні протофібрил.
2. Побудовано нову теоретичну модель галуження протофібрил.
3. Вивчено структурно-функціональні особливості суперспіральних ділянок молекули фібрину, які забезпечують їхню участь у побудові протофібрил та створено модель взаємодії цих ділянок з пептидами-міметиками, що імітують послідовності шарнірної області суперспіральної ділянки молекули фібрину.
4. З'ясовано молекулярний механізм інгібування «А»-центрів полімеризації фібрину сполуками калікс[4]аренового ряду.

5. Проведено віртуальний скринінг інгібіторів урокіназного активатора плазміногену, обрано і апробовано найбільш ефективні речовини у системі *in vitro* та на культурі пухлинних клітин.

6. Апробовано найбільш ефективні інгібітори фактора Ха *in vitro* та *in vivo*.

3. Наукова новизна одержаних результатів. Основні наукові результати, висунуті на захист, полягають у тому, що: Вперше побудовано нову теоретичну модель галуження протофібрил, що відбувається за рахунок включення D-регіону молекули фібрину однієї протофібрили в DDE-тріаду другої протофібрили. Доведено важливу роль суперспіральних ділянок молекул фібрину в латеральній асоціації протофібрил. Вперше доведено важливість бісфосфонових залишків калікс[4]аренів для зв'язування з N-кінцевою частиною A α -ланцюга, що призводить до інгібування першої стадії полімеризації фібрину. Отримано новий інгібітор урокіназного активатора плазміногену, що має антипроліферативний ефект на пухлинні клітини. Апробовано інгібітори Ха фактора, які інгібують агрегацію тромбоцитів *in vitro* та *in vivo*.

4. Теоретичне значення одержаних результатів. Дисертація Олексія Олеговича є самостійним та завершеним дослідженням, виконаним на високому науковому та методичному рівні. Результати досліджень Грабовського О.О., що відображені у дисертації, є вагомим внеском у питання розробки та створення ефекторів, що впливають на систему гемостазу. Крім того, робота має і теоретичне значення, оскільки дозволяє наблизитися до розкриття механізмів, за якими відбувається полімеризація фібрину і галуження протофібрил. Теоретична модель галуження протофібрил фібрину, запропонована та науково обґрунтована Грабовським О.О., так само як і встановлена роль суперспіральної ділянки фібрину в латеральній асоціації протофібрил, розширює наші знання про менш досліджену стадію полімеризації фібрину.

5. Практичне значення одержаних результатів. У ході роботи визначено залежність кількості залишків бісфосфосфонової кислоти в калікс[4]аренах на антиполімеризаційний ефект сполук та досліджено взаємодію цих сполук за допомогою молекулярного докінгу та динаміки. Додатково розраховано енергію зв'язування речовин з N-кінцевою частиною A α -ланцюга. Показано сайти взаємодій на суперспіральній ділянці молекули фібрину, досліджено антиполімеризаційний ефект пептидів, що імітують структуру шарнірної ділянки. Зокрема проведено молекулярний докінг цих пептидів і з'ясовано ключові взаємодії, що є необхідним для створення нових інгібіторів другої стадії полімеризації фібрину. За допомогою віртуального скринінгу знайдено інгібітор урокіназного активатора плазміногену, що проявляє антипроліферативну дію на пухлинні клітини. Дану речовину можна в подальшому використати для раціонального дизайну з метою покращення її селективності та специфічності. В роботі було досліджено ряд інгібіторів фактора Ха і показано їх ефект на агрегацію тромбоцитів *in vitro* та *in vivo*.

6. Особистий внесок здобувача. Представлена дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, яке було здійснене автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2019-2023 р.р. Дисертантом було самостійно проведено аналіз даних літератури

за темою роботи та виконано експериментальні дослідження по отриманню потрійного комплексу, вивченню антиполімеризаційного ефекту калікс[4]аренів та пептидів, дослідженню інгібіторів *in vitro* та *in vivo*. Грабовським О.О. було проведено всі комп'ютерні розрахунки, що включають в себе молекулярний докінг та молекулярну динаміку. Окремі дослідження, зокрема вплив інгібітора урокіназного активатора плазміногену на проліферацію пухлинних клітин проводилися за участі наукових співробітників відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна.

Планування роботи, розробка методології, аналіз та обговорення результатів проведено за участі наукових керівників – (у різний час) проф. Тетяни Миколаївни Платонової та д.б.н. Володимира Олександровича Чернишенка.

7. Публікації результатів роботи, їх обговорення. За матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus:

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>. (особистий внесок: аналіз даних літератури, проведення гель-проникної хроматографії та протеїн-протеїнового докінгу, підготовка матеріалу до публікації).
2. Kucheriavyi, Y.; **Hrabovskyi, O.**; Rebriev, A. V.; Stohnii, Y. Limited proteolysis of fibrinogen α C-region reveals its structure. *Biotechnologia Acta* 2022, 15 (2), 60. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.060>. (особистий внесок: аналіз даних літератури, статистична обробка результатів, підготовка матеріалу до публікації).
3. Pyrogoва, 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>. (особистий внесок: аналіз даних літератури, *in silico* моделювання, підготовка матеріалу до публікації).
4. 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>. (особистий внесок: аналіз даних літератури, *in silico* моделювання, підготовка матеріалу до публікації).
5. 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. (особистий внесок: аналіз даних літератури, участь у проведенні експерименту, підготовка матеріалу до публікації).
6. 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>. (особистий внесок: аналіз даних літератури, *in silico* моделювання, підготовка матеріалу до публікації).

8. Апробація результатів дисертації.

1. Binding of calix[4]arene to the A-knob of fibrin: in silico proves in vitro. Didkivskiy V.A., **Hrabovskyi O.O.**, Humenyuk A.S., Selikhova A.I., Banya M.O., Cherenok S.O., Chernyshenko V.O. Clusters and nanostructured materials (CNM-6). – Uzhhorod, 5-9 Oct. 2020. P. 48-49.
2. Development of the pharmacophore models for the identification of novel inhibitors of the urokinase plasminogen activator. **Hrabovskyi O.**, Platonov M XVII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances” - Kyiv, 23-25 April 2019.
3. Coiled-coil region of fibrin(ogen) as the target of antithrombotic therapy. **Hrabovskyi O.O.**, Lugovska N.E., Kurchenko T.O., Chernishov V.I. Students Symposium "Medicine and Science 2022", 7 December 2022.

9. Інформація щодо проведення біоетичної експертизи дисертаційних досліджень.

Дослідження на тваринних моделях відбувались в рамках вказівок і рекомендацій Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) та «Біоетичної експертизи доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (Київ, 2006). Усі процедури, що описують експерименти з лабораторними тваринами та будь-які роботи з використанням матеріалів, проводилися з дотриманням норм біоетики.

Робота проводилась з дотриманням принципів біоетики та норм біологічної безпеки, що підтверджено висновком Комісії з біоетики і біобезпеки Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (протокол №3 від 02/10-2023).

Таким чином, за результатами публічної презентації Грабовського Олексія Олеговича наукових результатів дисертації “Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу” та її обговорення на розширеному засіданні професорсько-викладацького складу Випускової кафедри ЗВО Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України та наукового семінару «Актуальні проблеми сучасної біохімії» Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України ухвалили:

1. Вважати, що дисертація Грабовського Олексія Олеговича на тему “Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу” є завершеною науковою працею та відповідає спеціальності 091 «Біологія».
2. Вважати, що дисертація Грабовського Олексія Олеговича відповідає «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженого Кабінетом Міністрів України 23 березня 2016 року, постановою № 261, (п. 25 та 29), та рекомендувати її до захисту на засідання разової спеціалізованої вченої ради за спеціальністю 091 Біологія.

Головуючий, заступник директора
з наукової роботи

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
академік НАН України,
д.б.н., професор



[Handwritten signature]

С.О. Костерін

Завідувач Випускової кафедри
ЗВО Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
д.б.н.

[Handwritten signature]

Л.Г. Бабіч

Секретар
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України
к.б.н.

[Handwritten signature]

Д.С. Корольова