

РІШЕННЯ
разової спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії

Разова спеціалізована вчена рада Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України, м. Київ (наказ №10-а від 20.12.2023 р.) прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії в галузі знань 09 Біологія на підставі прилюдного захисту дисертації «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу» за спеціальністю 091 – «Біологія»

«29» лютого 2024 року

ГРАБОВСЬКИЙ Олексій Олегович, 1996 року народження, громадянин України.

Освіта вища: закінчив у 2019 році Київський національний університет імені Тараса Шевченка за спеціальністю «Біотехнології та біоінженерія».

Працює з 2020 р. до цього часу у відділі структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України, м. Київ. За цей період обіймав посади: провідного інженера (2020-2023 рр.), молодшого наукового співробітника (2024 - по теперішній час).

Дисертацію виконано у відділі структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України, м. Київ, у період з 2019 по 2023 рр.

Науковий керівник – Володимир Чернишенко, д.б.н., завідувач відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Здобувач має 5 наукових праць за темою дисертації у періодичних фахових виданнях іноземних держав; 1 патент та 1 міжнародну заявку на патент.

1. **Hrabovskyi O.**; Syrko M. Detection of ternary complex of fibrin desAB with D-dimer and D-fragment of fibrin // *Biotechnologia Acta* T. 16, No. 2, 2023 P. 21-23,

<https://doi.org/10.15407/biotech16.02.021>

2. Kucheriavyi Y.; **Hrabovskyi O.**; Rebriev A. V.; Stohnii Y. Limited proteolysis of fibrinogen α C-region reveals its structure // *Biotechnologia Acta*, V. 15, N 2, 2022. DOI: 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* T. 16, No. 2 , 2023 P 7-10., <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.007>.
4. Pyrogoва L.; Makogonenko Y.; **Hrabovskyi O.**; Marunych R.; Bereznytskyj G. and Gogolinskaya G. Chlorine-binding structures: role and organization in different proteins // *Ukrainian Biochemical Journal* 2021. DOI: 10.15407/ubj93.04.005 (Q4).
5. 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> (Q1).

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., **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

У дискусії взяли участь голова і члени спеціалізованої вченої ради та присутні на захисті фахівці.

Тетяна БОРИСОВА, доктор біологічних наук, професор, завідувач відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Оцінка позитивна без зауважень.

Перший рецензент - Сергій КОСТЕРІН, доктор біологічних наук, академік НАН України, професор, завідувач відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Оцінка позитивна із зауваженнями:

1. Мені не зрозуміло, чому при проведенні експериментальних досліджень у середовищі інкубації були відсутні іони Mg (як відомо, їх концентрація у плазмі крові становить одиниці mM). Невже автор дійсно впевнений, що результати, що були одержані, не залежать від того, чи був Mg у середовищі інкубації у зазначеній концентрації, чи ні? Отже, хотів би почути аргументи: чому ігнорували присутність іонів Mg в інкубаційному середовищі? Адже Mg^{2+} є антагоністом Ca^{2+} , і його відсутність/присутність у середовищах інкубації, та ще й у мілімолярних концентраціях, не може не впливати, я думаю, на закономірності інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу. Наприклад, чи впевнений дисертант, що дія низькомолекулярних ефекторів, зокрема, калікс[4]аренів, на процеси полімеризації фібрину, не буде чутливою до відсутності/присутності іонів Mg у середовищі інкубації?
2. У дисертації відзначено, що при проведенні турбідиметричних досліджень «... до досліджуваного розчину фібриногену в кінцевій концентрації 0,1 мг/мл додавали 0.05 М трис-НСІ буфер, рН 7,4». І все? А як же створювали фізіологічне значення іонної сили $\mu=0,15$, що притаманне плазмі крові $[NaCl] + [KCl] = 150 \text{ mM}$? І знов таки, чому у середовищах були відсутні іони Mg?
3. У випадку пошуку нових інгібіторів урокінази обчислювали ΔG енергію зв'язування ΔG та інгібіторну активність сполук, що була визначена *in vitro*. А чи можна було розрахувати величину константи зв'язування інгібіторів K? Як вважає автор, наскільки коректним було б використання «зворотнього» рівняння Вант-Гоффа: $K = \exp(-\Delta G/RT)$?

4. Окремі результати надаються без статистичної обробки (наприклад, рис.6.1, рис. 6.2, рис. 7.2 - 7.6). Втім, в таких випадках варто вказувати у підписах до рисунків: «наведені результати типових досліджень».
5. У тексті роботи є некоректності з точки зору граматики, зокрема, стилістики.

Здобувач Олексій ГРАБОВСЬКИЙ надав відповіді на зауваження, які задовольнили **Сергія КОСТЕРІНА**.

Другий рецензент - Артем ТИХОМИРОВ, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Оцінка позитивна із зауваженнями:

1. Відсутній протокол рішення біоетичного комітету на проведення дослідів з використанням лабораторних тварин (щурів). Необхідно додати до дисертації відомості, чи було отримано письмову згоду від донорів на використання біологічного матеріалу для експериментальних досліджень.
2. Рекомендовано розширити відомості щодо новизни та практичного значення отриманих результатів в анотації роботи.
3. Природа низькомолекулярних інгібіторів фактора Ха не зрозуміла, а оскільки вони не описані у роботі, то важко зробити припущення стосовно механізму їхньої інгібувальної дії. На які ланки системи активації фактора X можуть впливати сполуки, що тестуються, або це є прямі інгібітори фактора Ха? Яким, на думку автора, може бути механізм їхньої антитромботичної дії?
4. Чи проводили порівняння ефективності антикоагуляційної дії низькомолекулярних інгібіторів фактора Ха та референтного препарату, наприклад, рівароксабану?
5. В одному з положень дисертації автор зазначає, що інгібітори урокінази, які тестували на клітинах раку грудної залози, є ефективними засобами, що володіють антиметастатичною активністю, хоча досліджень, які б підтверджували це, проведено не було.

6. Оскільки uPA у комплексі з рецептором uPAR відповідають за міграційну активність клітин та їхній інвазійний потенціал, то вплив інгібіторів урокінази на клітини пухлини грудної залози більш доцільно було б досліджувати саме в контексті пригнічення міграційної/інвазійної активності, а не у тесті на виживання/проліферативну активність.
7. Як Ви оцінюєте можливі побічні ефекти від застосування препаратів-інгібіторів урокінази?
8. Текст дисертації потребує доопрацювання (зустрічаються слова-кальки з інших мов, нековирні вирази та сленг). Зокрема, що таке «сигнальна мережа системи гемостазу», «структурована молекула розчиннику»? Пункт змісту 4.2.12 містить опис протоколу дослідження, зокрема, складу реактивів, які використовувалися, що є недоречним. До тексту дисертаційної роботи слід включити перелік умовних скорочень.

Здобувач Олексій ГРАБОВСЬКИЙ надав відповіді на зауваження, які задовольнили Артема ТИХОМИРОВА.

Перший опонент - Тетяна ГАЛЕНОВА, кандидат біологічних наук, старший дослідник, асистент кафедри біохімії ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Оцінка позитивна із зауваженнями:

1. На основі результатів хроматографії, що поділяє за розміром, автор стверджує про формування потрійного комплексу, що містить фібрин desAB, D-димер та D-фрагмент, при цьому об'єм виходу комплексу становив 5,5-6 мл (рис. 5.1 А). Тоді як, навпаки, автор заперечує формування потрійного комплексу у суміші D-димер, D-фрагмент та desA фібрин або desAB-desB β 15-42. Однак, залишається не до кінця зрозумілим на основі чого автор робить такі висновки, пік виходу на об'ємі 5,5 мл можна чітко прослідкувати на всіх представлених хроматограмах, результати SDS-PAGE (наприклад, рис. 5.1 В) взагалі не доводять факту розділення. Також не вказано об'єм виходу відповідної

форми фібрину, що полегшило б розуміння наведених результатів. Цікавим також залишається природа піку на 2,5-3 мл.

2. Автор не аргументує вибір концентрації синтетичних пептидів – 0,33 мМ під час проведення досліджень. З кривої залежності тривалості lag-періоду від концентрації пептидів в середовищі (рис. 6.1) є очевидним, що обрана автором концентрація є мінімальною, яка чинить ефект на процес полімеризації, якщо чинить взагалі. Автор також не навів кінцевої концентрації пептидів, при використанні їх суміші, у дослідженні впливу на процес полімеризації, тому залишається не до кінця зрозумілим чим обумовлений ефект подовження lag-періоду полімеризації: збільшенням концентрації пептидів (при використанні суміші), чи, як стверджує автор, синергічною дією пептидів.
3. У розділі відсутня інформація щодо природи та походження препаратів, які були використані під час скринінгу. На мій погляд, доцільно було б вказати структури або фармакологічну приналежність досліджених агентів. Не доречним в підписах осі У представлених агрегатограм (рис. 8.3-8.6) використовувати позначення – «Агреговані тромбоцити, %», оскільки це не відповідає дійсності. Мова йде про зміну світлорозсіювання, а дана вісь відображає ступінь агрегації. Не вказана кінцева концентрація ДМСО у експериментах як *in vitro*, так і *in vivo*, тоді як для дослідження процесу агрегації тромбоцитів даний показник є принциповим. Доречним би було доповнити одержані дані результатами дослідження дії сполук-інгібіторів на час формування згустку в плазмі у хронометричних тестах – АЧТЧ, ПЧ, ТЧ. Це б дало змогу зробити висновок про вплив сполук на процес формування фібрину, з іншого боку, якщо об'єктом дослідження була саме агрегація тромбоцитів, то варто було б індукувати процес агрегації такими фізіологічними індукторами як АДФ або колаген. Це значно полегшило б інтерпретацію результатів агрегації.
4. Автор не описує метод визначення активності урокінази за дії сполук-інгібіторів, тому не до кінця зрозумілим залишається походження

даних щодо інгібуючої активності сполук (табл. 9.2) та значень K_i , наведених в тексті роботи.

5. Чи перевіряли Ви стабільність потрійного комплексу в часі?
6. Чому було проведено віртуальний скринінг для пошуку інгібіторів каталітичної активності саме урокінази, а не інгібіторів, які блокують взаємодію урокінази з її рецептором?
7. Чи плануєте Ви використання додаткових методів, які підтверджують процес комплексоутворення фібрин-мономеру з фрагментами фібриногену/фібрину?
8. Що Ви можете сказати про селективність каліксаренів, які Ви досліджували? Чи можлива їх взаємодія з іншими протеїнами крові?

Здобувач Олексій ГРАБОВСЬКИЙ надав відповіді на зауваження, які задовольнили Тетяну ГАЛЕНОВУ.

Другий опонент - Василь ГУРМАЧ, кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу молекулярної та квантової біофізики Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Оцінка позитивна із зауваженнями:

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?

Здобувач Олексій Грабовський надав відповіді на зауваження, які задовольнили **Василя ГУРМАЧА**.

Голова разової спецради **Тетяна БОРИСОВА** зазначила, що висловлені членами разової спецради зауваження не применшують науково-практичного значення отриманих результатів, а можуть бути використані для подальшого покращення роботи.

У обговоренні взяли участь присутні на захисті фахівці.

Володимир ЧЕРНИШЕНКО, д.б.н., завідувач відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Коротко охарактеризував здобувача як високопрофесійного науковця.

Людмила ДРОБОТ, д.б.н., проф., завідувач відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Оцінка позитивна без зауважень.

Денис КОЛИБО, д.б.н., гол. н.с. відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Оцінка позитивна без зауважень.

Володимир ГРИЩУК, к.б.н., н.с. відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Оцінка позитивна без зауважень.

Голова разової спецради **Тетяна БОРИСОВА** підсумувала загальний висновок членів спецради про відповідність дисертації Грабовського Олексія Олеговича на тему «Структура, функції та молекулярні механізми інгібування активних сайтів ключових протеїнів гемостазу» вимогам «Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)» затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 р. №261 та «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.

Результати відкритого голосування:

«За» 5 членів ради,

«Проти» 0 членів ради

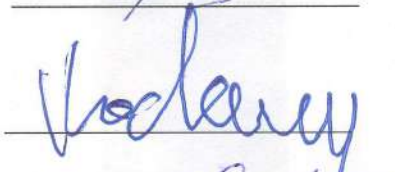
На підставі результатів відкритого голосування спеціалізована вчена рада присуджує / відмовляє у присудженні Олексію Грабовському ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Голова спеціалізованої
разової вченої ради
д.б.н.



Тетяна БОРИСОВА

Рецензент



Сергій КОСТЕРІН

Рецензент



Артем ТИХОМИРОВ

Опонент



Василь ГУРМАЧ

Опонент



Тетяна ГАЛЕНОВА

Підпис *Тетяна Борисова*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"29" 02 2022р.

