

## АНОТАЦІЯ

*Дідківський В.А.* Дослідження сполук калікс[4]аренового ряду як антитромботичних та проангіогенних агентів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія». – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2024.

Внутрішньосудинне тромбоутворення є одною з головних причин смертності осіб працездатного віку у світі. Воно полягає у формуванні фібриново-тромбоцитарного тромбу, який перекриває просвіт судини, перешкоджаючи кровопостачанню тканин та органів, та викликає такі тяжкі патології як інфаркт міокарда, тромботичний інсульт головного мозку, тромбоемболія легеневої артерії тощо.

Отже, пошук шляхів ефективного запобігання утворенню тромбу в судині є важливим питанням сучасної медицини та біохімії. Для швидкого та керованого інгібування активації системи зсідання крові застосовують антитромботичні препарати. За напрямком їхньої дії розрізняють антикоагулянти, які інгібують зсідання крові на різних етапах, та фібринолітики, спрямовані на прискорення руйнування фібринового тромбу (t-РА, стрептокіназа, урокіназа). Найпоширенішими серед антикоагулянтів є такі, що діють безпосередньо на тромбін (дабігатран), фактор Ха (рivarаксабан), фактори VIIIa та V (дротрекогін), блокуючи каскад зсідання крові на етапі активації фактора X, на етапі активації протромбіну або на етапі перетворення фібриногену на фібрин. Окремим класом сполук, які блокують формування фібриново-тромбоцитарного тромбу, є інгібітори агрегації тромбоцитів.

На сьогодні відсутні антитромботичні препарати, які діяли б спрямовано на заключний етап тромбоутворення – полімеризацію фібрину. Як прямий інгібітор полімеризації фібрину пропонують використовувати наночастинки срібла або ж

пептиди-інгібітори (зокрема GPRP), кон'юговані з альбуміном. Жоден такий засіб не пройшов доклінічні випробування.

У відділі структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було охарактеризовано нову сполуку калікс[4]аренового ряду, створену в Інституті органічної хімії НАН України, – калікс[4]арен С-145, що безпосередньо взаємодіє з центром полімеризації фібрину «А» завдяки своїй гідрофобній чаші. Тому калікс[4]арен С-145 безпосередньо інгібує формування протофібрил фібрину ( $IC_{50} = 2,5 \times 10^{-6}$ ), запобігаючи утворенню полімерного фібрину. Було показано його ефективність як *in vitro*, так і *in vivo*.

Відповідно, представлену дисертаційну роботу було присвячено дослідженню сполук калікс[4]аренового ряду як антитромботичних агентів, підбору умов для їх застосування *in vivo*, а також їхнім доклінічним дослідженням.

Для цього з використанням тесту АЧТЧ (активованій частковий тромбопластиновий час) було проведено скринінг сполук калікс[4]аренового ряду *in vitro* з метою виявлення серед них інгібіторів полімеризації фібрину. Було показано, що натрієва сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145) та натрієва сіль калікс[тіа-4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (калікс[4]арен С-145S) ефективно подовжують час зсідання плазми крові, що може бути пов'язано з інгібуванням самоскладання фібрину.

Турбідиметричні дослідження обраних сполук показали, що С-145S є ефективнішим інгібітором полімеризації фібрину порівняно з С-145, який раніше було запропоновано для створення антитромботичного агента. Однак, С-145S також стимулював проліферацію ендотелійних клітин свині (РАЕ) та інгібував агрегацію тромбоцитів та гідроліз фібринового згустку. Ці додаткові ефекти, які у випадку С-145 були значно менш виражені, можна розглядати як побічну дію, яка ускладнює застосування препарату *in vivo*.

Тому надалі ми розглядали саме С-145 як прототип антитромботичного препарату. Насамперед, було необхідно підібрати дозування С-145 для введення *in vivo*. Було визначено напівлетальну дозу ( $LD_{50}$ ), яка складала 1420 мг/кг.

Відповідно до проведених досліджень, С-145 належить до малотоксичних сполук за умови перорального введення. Для терапевтичного застосування було використано дозування у 100 разів менше за напівлетальну дозу та показано, що введення такої кількості С-145 (12 мг/кг) призводило до інгібування полімеризації фібрину в лабораторних тварин.

Було досліджено час настання та тривалість антитромботичного ефекту лікарської сполуки калікс[4]арену С-145 після внутрішньовенного або перорального введення щурам (12 мг/кг). Показано, що максимальна антитромботична дія С-145 спостерігається одразу після внутрішньовенного та через 4 години після перорального введення субстанції. Відновлення показників спостерігали через 24 години після введення.

Аналогічний експеримент було проведено на лабораторних кролях, що дозволило оцінювати динаміку зміни стану системи гемостазу окремих тварин у ході експерименту. Показано загальну тенденцію до досягнення максимального антитромботичного ефекту за 4-6 годин після введення препарату.

Підібрані умови для застосування С-145 як антитромботичного агенту *in vivo* дозволили провести дослідження за умов експериментального передтромботичного стану. Для цього використовували спонтанно гіпертензивних щурів лінії SHR. Тварин утримували на холестерольній дієті (корм з 3 % холестеролу) протягом 2 місяців, щоденно вводячи 12 мг/кг С-145 *per os*, або на дієті з високим вмістом вісцерального жиру (30 %) протягом 6 місяців, вводячи щоденно 12 мг/кг С-145 *per os* останні два місяці. Показано підвищення прокоагулянтного потенціалу плазми крові у щурів обох експериментальних груп та достовірну нормалізацію показників системи зсідання крові при застосуванні С-145. Зокрема, введення С-145 нормалізувало вміст протеїну С, фібриногену та час зсідання плазми крові в коагуляційних тестах. Відмічено також достовірне зменшення товщини стінки аорти та зменшення відсотку переродженої тканини в стінці аорти у експериментальних щурів.

У щурів лінії SHR, які отримували дієту з високим вмістом жиру (30 %), було виявлено гіалінову дистрофію та загибель кардіоміоцитів, порушення структури міокарда, розвиток набряку, лімфоцитарної інфільтрації, витоншення чи набряк судин. Застосування С-145 дозволило уникнути гіалінової дистрофії так само, як і розшарування інтими судин серця. Виявлена протекторна дія С-145 на тканини серця може бути додатковим важливим ефектом лікарської субстанції.

Ефект С-145 на тканину серцевого м'язу досліджували за умов експериментального ізопротренол-індукованого інфаркту міокарда. Для цього щурам лінії Wistar одноразово вводили ізопротренол у дозі 100 мг/кг та вводили їм С-145 щоденно *per os* до виведення з експерименту протягом 14 діб. Показано, що С-145 не впливає на обсяг фібробластного переродження тканини серця, однак чинить судинопротекторну дію. З використанням тесту на розчинні фібрин-мономерні комплекси показано відсутність генералізованої активації системи зсідання крові у щурів.

Таким чином, в результаті виконання дисертаційної роботи було вперше запропоновано низькомолекулярну антитромботичну сполуку – натрієву сіль калікс[4]арен-тетра-метилен бісфосфонової кислоти (С-145) як лікарську субстанцію для створення антитромботичного препарату з безпосередньою дією на полімеризацію фібрину. Було доведено її ефективність в умовах *in vitro* та *in vivo*, а також здатність знижувати прокоагулянтний потенціал плазми крові лабораторних тварин з передтромботичним станом. Виявлений протекторний ефект С-145 на тканини серцевого м'язу є вагомим додатковою характеристикою сполуки.

Розпочато доклінічну фазу досліджень лікарської субстанції С-145 відповідно до вимог GLP: в тесті на гостру токсичність показано, що С-145 належить до низькотоксичних сполук; проведено сенсibilізаційний тест (OECD 406); на штамах бактерій *Salmonella typhimurium* TA-98 і TA-100 в умовах з метаболічною активацією і без неї в широкому діапазоні концентрацій (тест Еймса) показано низьку мутагенну активність С-145.

Проведені дослідження є вагомим кроком на шляху до впровадження нового препарату «Антитромботичний засіб Калікс[4]арен С-145», що дозволить перейти до клінічної фази випробувань.

**Ключові слова:** гемостаз, фібриноген, фібрин/фібриноген, коагуляція і антикоагуляція, наноконплекс, *in vitro*, плазміноген/плазмін, калікс[4]арени, кальцій, антикоагулянти прямої дії, токсичність, щури, тромбоцити, плазма крові.

## ANNOTATION

*Didkivskiy V.A.* The study of calix[4]arene series compounds as antithrombotic and proangiogenic agents. – Qualification scientific work as a manuscript.

Dissertation for a doctor of philosophy (Ph.D.) scientific degree, in specialty 091 “Biology” – Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

Intravascular thrombosis is one of the main causes of mortality in the working-age population worldwide. It consists in the formation of a fibrin-platelet thrombus which blocks the lumen of the vessel, preventing blood supply to tissues and organs and causing severe pathologies such as myocardial infarction, thrombotic brain stroke, pulmonary embolism, etc.

Therefore, efficient prevention of thrombus formation in the vessel is an important issue of modern medicine and biochemistry. Antithrombotic drugs are used for rapid and controlled inhibition of activation of the blood coagulation system. According to the direction of action, they can be either anticoagulants which inhibit blood clotting at different stages or fibrinolytics which accelerate the fibrin clot's destruction (t-PA, streptokinase, urokinase). The most common anticoagulants act directly on thrombin (dabigatran), factor Xa (rivaroxaban), factors VIIIa and V (drotrekogin), blocking the blood coagulation cascade at activation of factor X, activation of prothrombin or conversion of fibrinogen to fibrin. A separate class of compounds that block the formation of fibrin-platelet thrombus is platelet aggregation inhibitors.

As of today, there are no antithrombotic drugs that act on the final stage of thrombosis, i.e. on fibrin polymerization. To directly inhibit fibrin polymerization, silver nanoparticles or inhibitor peptides (such as GPRP) conjugated with albumin have been proposed. No such agents have passed preclinical trials.

Calix[4]arene C-145, a new compound of the calix[4]arene series, was created in the Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine. It

directly interacts with the fibrin polymerization site 'A-knob' due to its hydrophobic cup. The compound was characterized in the Department of protein structure and function of the Palladin Institute of biochemistry of the NAS of Ukraine. Calix[4]arene C-145 directly inhibits the formation of fibrin protofibrils ( $IS_{50} = 2.5 \times 10^{-6}$ ), preventing the formation of polymeric fibrin. It was shown to work efficiently *in vitro* and *in vivo*.

Therefore, the thesis was devoted to the study of compounds of the calix[4]arene series as antithrombotic agents, selection of conditions for their use *in vivo*, and preclinical studies.

For this purpose, calix[4]arene compounds were screened *in vitro* using the APTT (activated partial thromboplastin time) test to identify inhibitors of fibrin polymerization. The sodium salt of calyx[4]aren-tetramethylene bisphosphonic acid (calix[4]aren C-145) and the sodium salt of calyx[thia-4]aren-tetramethylene bisphosphonic acid (calix[4]aren C-145S) effectively prolonged the plasma clotting time, perhaps in relation to the inhibition of fibrin polymerization.

Turbidimetric studies of the selected compounds showed that C-145S was a more effective inhibitor of fibrin polymerization compared to C-145 that was previously proposed as a basis for an antithrombotic agent. However, C-145S also stimulated porcine aortic endothelial cell (PAE) proliferation, inhibited platelet aggregation and fibrin clot hydrolysis. These additional effects, much less pronounced in the case of C-145, can be considered a side effect that complicates *in vivo* application.

Therefore, we considered C-145 as a prototype for antithrombotic drug. First of all, it was necessary to select the dosage of C-145 for *in vivo* administration. The semi-lethal dose (LD<sub>50</sub>) was determined to be 1420 mg/kg. According to the research, C-145 belongs to low-toxic compounds under oral administration. For therapeutic use, a dosage of 100 times less than the semi-lethal dose was used (12 mg/kg); it inhibited fibrin polymerization in laboratory animals.

The time of onset and duration of the antithrombotic effect of calix[4]arene C-145 under intravenous or oral administration (12 mg/kg) was studied in rats. The maximum antithrombotic effect of C-145 was observed immediately after intravenous and 4 h after

oral administration. Recovery of the parameters was observed 24 hours after administration.

A similar experiment was performed on laboratory rabbits, making it possible to evaluate the dynamics of hemostasis in individual animals during the experiment. The maximum antithrombotic effect tended to be observed 4-6 hours after administration.

The C-145 was tested as an antithrombotic agent *in vivo* under experimental pre-thrombotic conditions using spontaneously hypertensive SHR rats. Animals were kept on a cholesterol diet (3% cholesterol) for 2 months with 12 mg/kg C-145 daily, or on a high visceral fat diet (30%) for 6 months, with 12 mg/kg C-145 fed daily for the last two months. We found an increase in the procoagulating potential of blood plasma in rats of both experimental groups and reliable normalization of the coagulation system indices under these conditions. In particular, administration of C-145 normalized the content of protein C, fibrinogen and plasma clotting time in coagulation tests. There was also noted a significant reduction in the thickness of the aortic wall and a decrease in the percentage of congested tissue in the aortic wall.

In spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet (30%), hyaline dystrophy and cardiomyocyte death, myocardial structure disorders, development of edema, lymphocytic infiltration, and thinning or edema of vessels were detected. Application of C-145 allowed to avoid hyaline dystrophy as well as intimal splitting of cardiac vessels. The protective action of C-145 on cardiac tissue may be an additional important effect.

The effect of C-145 on cardiac muscle tissue was studied in experimental isoprotrenol-induced myocardial infarction. For this purpose, Wistar rats were injected once with isoprotrenol at 100 mg/kg and fed C-145 daily until withdrawal from the experiment for 14 days. C-145 had no effect on the amount of fibroblast remodeling of cardiac tissue in isoprotrenol-induced myocardial infarction, but it normalized cardiac vascular function and prevented perivascular edema. The test for soluble fibrin monomer complexes showed the absence of generalized activation of the blood coagulation system.

Thus, a low molecular weight antithrombotic compound (sodium salt of calix[4]arene-tetramethylene bisphosphonic acid (C-145) was proposed as a drug substance for creating an antithrombotic drug with a direct effect on fibrin polymerization. It was proved effective *in vitro* and *in vivo* and able to reduce the procoagulant potential of the plasma of laboratory animals in a pre-thrombotic state. The protective effect of C-145 on cardiac muscle tissue is a weighty additional characteristic.

The preclinical phase of research in accordance with GLP requirements was started: C-145 was shown to be a low-toxic compound in the acute toxicity test; sensitization test (OECD 406) was conducted; low mutagenic activity of C-145 was shown on strains of *Salmonella typhimurium* TA-98 and TA-100 with and without metabolic activation in a wide concentration range (Ames test).

The studies are a significant step towards introducing the new drug ‘Antithrombotic drug Calix[4]arene C-145’ which will allow us to proceed to the clinical phase of trials.

**Keywords:** hemostasis, fibrinogen, fibrin/fibrinogen, coagulation and anticoagulation, nanocomplex, *in vitro*, plasminogen/plasmin, calix[4]arenes, calcium, direct-acting anticoagulants, toxicity, rats, platelets, blood plasma.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Chernyshenko V., Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., **Didkivskiy V.**, Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E., Komisarenko S. Haemostasis modulation by calix[4]arene methylenebisphosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analogue. Ukr. Biochem. J. 2018. 90(6): 21-30. <https://doi.org/10.15407/ubj90.06.021> – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Chernyshenko V. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Savchuk O. – проектування та виконання дослідження;

Cherenok S. – проектування та виконання дослідження;

Silenko O. – збір даних, інтерпретація результатів;

Negelia A. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Kasatkina L. – методологія, ресурси;

Pirogova L. – концептуалізація, рецензування та редагування;

**Didkivskiy V.** – проведення агрегатометрії, проведення клотингових тестів, визначення динаміки росту клітин у культурі;

Yusova O. – візуалізація, ресурси, вичитка рукопису;

Kalchenko V. – методологія, ресурси;

Garmanchuk L. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Grinenko T. – методологія, ресурси;

Lugovskoy E. – адміністрування проєкту, дослідження, концептуалізація, підготовка чернетки рукопису, написання огляду та редагування;

Komisarenko S. – методологія, ресурси, інтерпретація результатів.

2. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., **Didkivskiy V.**, Chernyshenko T.M., Platonova T.M. Protective action of N-stearoylethanolamine on blood coagulation and arterial changes in spontaneously hypertensive rats fed cholesterol-rich diet. Ukr. Biochem. J. 2020. 92(2): 60-70. <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.060> – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Tkachenko O.– адміністрування проєкту, написання оригінальної чернетки;

Hudz Ie.– проєктування та виконання дослідження;

Kosiakova H.– виконання дослідження, візуалізація;

Klymenko P. –інтерпретація результатів;

Stohnii Y.– концептуалізація, рецензування та редагування;

**Didkivskiy V.**– створення моделі атеросклерозу;

Chernyshenko T.M.– ресурси, методологія;

Platonova T.M – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

3. **Didkivskiy V.**, Pavlenko A. Approbation of calix[4]arene C-145 as antithrombotic agent in vivo. *Biotechnologia acta*. 2022. 15(5): 41-46.

<https://doi.org/10.15407/biotech15.05.041>

**Didkivskiy V.**– проведення експерименту на тваринах і написання тексту статті;

Pavlenko A. – проєктування та виконання дослідження, концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису, візуалізація, вчитка рукопису.

4. **Didkivskiy V.A.**, Pavlenko A.O., Marunych R. Y., Selikhova A.O., Cherenok S. O., Todosiuk T.P., Shevchenko S.M. HPLC detection of antithrombotic calix[4]arene in blood plasma of animals. *Biotechnologia Acta*. 2022. 15(2): 51-52.

<https://doi.org/10.15407/biotech15.02.051>

**Didkivskiy V.A.** – проведення in vivo досліджень, введення каліксарену щурам, забір крові, визначення активованого часткового тромбoplastинового часу та протромбінового часу;

Pavlenko A.O. – проєктування та виконання дослідження;

Marunych R. Y.– проєктування та виконання дослідження;

Selikhova A.O. – збір даних, інтерпретація результатів;

Cherenok S. O. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Todosiuk T.P. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Shevchenko S.M. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

5. Chernyshenko V., Pirogova L., **Didkivskiy V.**, Cherenok S., Dosenko V., Pashevin D., Kalchenko V., Makogonenko E., Lugovskoy E. Effects of calix[4]arene C-145 on overall haemostatic potential of blood plasma in vitro and in vivo. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 2016. 10(3): 146-151.

Chernyshenko V. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Pirogova L. – проектування та виконання дослідження;

**Didkivskiy V.** – введення каліксарену щурам, забір крові, визначення загального гемостатичного потенціалу у плазмі крові щурів за умов введення каліксарену in vivo та in vitro;

Cherenok S. – збір даних, інтерпретація результатів;

Dosenko V. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Pashevin D. – методологія, ресурси;

Kalchenko V. – концептуалізація, рецензування та редагування;

Makogonenko E. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису;

Lugovskoy E. – концепція та дизайн дослідження, підготовка чернетки рукопису.

6. Chernyshenko V., **Didkivskiy V.**, Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E. Head-to-head comparison of calix[4]arene bis-phosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analog as hemostasis effectors. *FEBS3+ Meeting - XIth Parnas Conference - Young Scientists Forum “Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine”*. *Ukr. Biochem. J. Volume 90, Special Issue*, 2018.37.

7. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., **Didkivskiy V.**, Platonova T. The impact of anti-inflammatory action of N-stearolyethanolamine on the development of atherosclerosis in spontaneously hypertensive rats taking cholesterol rich diet. *10th RECOOP Annual Project Review Meeting, Wroclaw, October 11-12, 2019:77*.

8. **Didkivskiy V.**, Chernyshenko V., Pirogova L., Kalchenko V., Cherenok S., Dosenko V., Pashevin D., Nikolaenko T., Harmanchuk L. Calix[4]arene-based

antithrombotic medication: from *in silico* to *in vivo*. XII Український біохімічний конгрес (м. Тернопіль, 30 вересня - 4 жовтня 2019 р.), Тернопіль: Медична та клінічна хімія. 2019 Т. 21 №3 (додаток): 27.

9. **Didkivskiy V.**, Hrabovskiy O., Humenyuk A., Selikhova A., Banya M., Cherenok S., Chernyshenko V. Binding of calix[4]arene to the A-knob of fibrin: *in silico* proves *in vitro*. Clusters and nanostructured materials (CNM-6). Uzhhorod, October 5-9, 2020. 48-49.

10. Kucheriavyy Y., **Didkivskiy V.**, Selikhova A., Tokmakova Y., Cherenok S., Zhminko P., Chernyshenko V. Antithrombotic action of sodium salt of 5,11,17,23-bis (dihydroxyphosphoryl) methylcalix[4]arene *in vivo*. RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Video Conference. April 16, 2021, P 53.

11. Комісаренко С., Чернишенко В., **Дідківський В.** Створення прототипу лікарського препарату “Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145” та його доклінічні дослідження. Національна академія наук України у 2021 році / Видавець та виготовлювач Видавничий дім «Академперіодика» НАН України Київ : с 19.