

АНОТАЦІЯ

Платонов О.М. Антитромботична та антипроліферативна дія антагоністів інтегринових рецепторів. – 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, 2025.

Регуляція процесів, пов'язаних з інтегриновими рецепторами, або інтегринами, є актуальним і перспективним напрямом у розробці засобів, спрямованих на зниження прокоагулянтного потенціалу тромбоцитів та пригнічення онкогенезу. Антагоністи інтегринових рецепторів (дезінтегрини) здатні взаємодіяти з інтегринами, блокуючи їхню взаємодію з лігандами.

Зокрема, дезінтегрини пригнічують зв'язування активованих тромбоцитів з фібрин(оген)ом, внаслідок чого знижують здатність тромбоцитів до агрегації. Завдяки цьому дезінтегрини можуть бути використані з метою створення високоспецифічних антиагрегантних препаратів для профілактики тромботичних ускладнень.

Оскільки інтегрини тісно залучені до виживання ракових клітин, рухливості, інвазії, ангіогенезу та інших процесів, які впливають на форму, проліферацію, транскрипцію, та міграція пухлинних клітин, дезінтегрини є корисною основою для розробки терапевтичних засобів лікування раку. Більш того, їх може бути використано не лише як модель для розробки нових терапевтичних антиракових агентів, але і як компоненти для терапевтичного моніторингу. Дезінтегрини можуть допомогти зменшити інвазивність пухлинних клітин, що дає змогу зробити пухлину менш агресивною і обмежити здатність до метастазування.

Дисертаційну роботу присвячено отриманню та характеристиці дезінтегринів з отрути змій з метою аналізу їхньої дії на інтегрин-опосередковані взаємодії тромбоцитів та пухлинних клітин, а також їх

апробації *in vivo* як засобів для зниження прокоагулянтного потенціалу тромбоцитів та інвазивного потенціалу пухлинних клітин.

Шляхом моделювання патологічних станів, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення, на тваринах, було виявлено зниження агрегаційної здатності тромбоцитів за моделей гепатозу (- 20 %), інфікування COVID-19 (- 50 %), гострого запалення (- 54 %) та гострої променевої хвороби (- 35 %). Показано збільшення прокоагулянтного потенціалу тромбоцитарної ланки гемостазу за діабету (+ 40 %), атеросклерозу (+ 40 %) та гепатиту (+ 15 %), що потребує корекції інгібіторами агрегації тромбоцитів, джерелом яких є отрута змій.

Отримано електрофоретично чисті препарати інгібіторів агрегації тромбоцитів з отрути *Echis multisquamatus*, *Calloselasma rhodostoma* та *Bitis arietans* (молекулярні маси, визначені за допомогою мас-спектрометрії, складають 14,9 kDa, 13,1 kDa, 13,7(9) kDa відповідно). Охарактеризовано їх дію на агрегацію тромбоцитів, та доведено, що вони здатні прямо взаємодіяти з GPIIb/IIIa-рецепторами тромбоцитів, а отже належать до дезінтегринів. З поєднанням методів мас-спектрометрії та комп'ютерного моделювання ідентифіковано дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* та запропоновано модель його просторової структури.

Доведено ефективне зниження агрегації тромбоцитів за присутності дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus in vitro* ($IC_{50} = 1,5$ мкМ) та за умов внутрішньосудинного введення щурам *in vivo*. У дослідженні *ex vivo* показано ефективне інгібування агрегації тромбоцитів дезінтегрином з отрути *Echis multisquamatus* у збагаченій тромбоцитами плазмі крові осіб з аспіринорезистентністю, під час терапії гепарином та аспірином.

Показано пригнічення проліферативної активності клітин лінії карциноми легень Льюїс, клітин мікроглії миші (BV-2), МАЕС та HeLa під дією дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* (IC_{50} становило 0,48 мкМ, 0,40 мкМ, 0,47 мкМ, 0,20 мкМ відповідно). Показано гальмування пухлинного росту (до 55 %) та пригнічення метастазування (99 % за об'ємом) за умов

перевивання щурам та мишам клітин LLC у випадку застосування дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* як протипухлинного агента.

У ході виконання роботи доведено, що застосування антагоністів інтегринових рецепторів ефективно пригнічує інтегрин-опосередковані функції клітин: у випадку тромбоцитів – інгібує їхню агрегацію *in vitro* та *in vivo*, а у випадку пухлинних клітин – зменшує виживаність та здатність до адгезії, запобігаючи прогресії пухлини та метастазуванню *in vivo*.

Таким чином, робота представляє собою завершений цикл пошукових робіт, який починається з вибору патологічних станів, за яких необхідне інгібування функції тромбоцитів, продовжується скринінгом отрут змій, як джерела потенційних антиагрегантних агентів, повною характеристикою та ідентифікацією поліпептидів – антагоністів інтегринових рецепторів; та завершується успішною апробацією найбільш ефективного дезінтегрину *in vivo*. Особливою важливою складовою роботи є формування уявлення про визначальну роль інтегрин-опосередкованих взаємодій у процесі прикріплення та метастазування пухлинних клітин, що не лише вносить вклад у розуміння онкогенезу, але і відкриває можливості для розробки нових протипухлинних препаратів.

Ключові слова: інтегрини, пухлинні клітини, канцерогенез, тромбоцити, культури клітин, гемостаз, запалення, лінії клітин карциноми, радіаційний синдром, діабет, атеросклероз, хроматографія, мас-спектрометрія, біоінформатика, дезінтегрини.

SUMMARY

Platonov O.M. Antithrombotic and antiproliferative effect of integrin receptor antagonists. – Qualification scientific work as a manuscript.

PhD thesis for the degree of Doctor of Philosophy in speciality 091 ‘Biology.’
– Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

Regulation of processes associated with integrin receptors is a relevant and promising area in the development of drugs aimed at reducing the procoagulant potential of platelets and inhibiting oncogenesis. Integrin receptor antagonists (disintegrins) are able to interact with integrin receptors, blocking their function.

In particular, disintegrins inhibit the binding of activated platelets to fibrin, which reduces the ability of platelets to aggregate. Therefore, disintegrins can be used to create highly specific antiplatelet therapeutic agents for the prevention of thrombotic complications.

Since integrins are involved in cancer cell survival, motility, invasion, angiogenesis and other processes necessary to block the occurrence, progression, invasion, differentiation and metastasis of tumour cells, disintegrins can help reduce the invasiveness of tumour cells, which makes the tumour less aggressive and less prone to metastasis.

This thesis is focused on the purification and characterisation of disintegrins from snake venoms to analyse their effect on integrin-mediated platelet-tumour cell interactions and to test them *in vivo* as a tool for decreasing the procoagulant potential of platelets and the invasive potential of tumour cells.

In the process of the research, it was proved that the use of integrin receptor antagonists effectively inhibits integrin-mediated cell functions: in the case of platelets, it inhibits their aggregation *in vitro* and *in vivo*, and in the case of tumour cells, it reduces survival and adhesion ability, preventing tumour progression and metastasis *in vivo*.

By modelling pathological conditions associated with the risk of intravascular thrombosis in animals, a decrease in platelet aggregation capacity was found in hepatosis (- 20%), COVID-19 (- 50%), acute inflammation (- 54%) and acute radiation sickness (- 35%). It was shown an increase in the procoagulant potential of the platelet link of haemostasis in diabetes (+ 40 %), atherosclerosis (+ 40 %) and hepatitis (+ 15 %), which requires correction with platelet aggregation inhibitors.

Electrophoretically pure samples of platelet aggregation inhibitors from the venoms of *Echis multisquamatus*, *Calloselasma rhodostoma* and *Bitis arietans* were obtained (molecular weights determined by mass spectrometry are 14.9 kDa, 13.1 kDa, 13.7(9) kDa, respectively). Their effect on platelet aggregation was characterised, and it was proved that they are able to interact directly with platelet GPIIbIIIa receptors, and thus belong to disintegrins. Using a combination of mass spectrometry and computer modelling, a disintegrin from the venom of *Echis multisquamatus* was identified and a model of its spatial structure was proposed.

It was proved that the administration of disintegrin from *Echis multisquamatus* venom *in vitro* (IC₅₀ = 1.5 μ M) and *in vivo* in rats with intravascular injection effectively reduces platelet aggregation. An *ex vivo* study showed effective inhibition of platelet aggregation by disintegrin from *Echis multisquamatus* venom in platelet-rich plasma of aspirin-resistant patients, under heparin and aspirin therapy.

It has been shown to inhibit the proliferative activity of Lewis lung carcinoma cells, mouse microglia cells (BV-2), MAECs and HeLa under the influence of disintegrin from *Echis multisquamatus* venom (IC₅₀ was 0.48 μ M, 0.40 μ M, 0.47 μ M, 0.20 μ M, respectively). The inhibition of tumour growth (up to 55 %) and metastasis inhibition (99 % by volume) in rats and mice LLC cells was shown when disintegrin from *Echis multisquamatus* venom was used as an antitumour agent.

Thus, the work represents a complete cycle of search studies, which begins with the selection of pathological conditions requiring platelet function inhibition, proceeds with the screening of snake venoms as a source of potential antiplatelet agents, complete characterisation and identification of integrin receptor antagonist

polypeptides; and concludes with the successful testing of the most effective disintegrin *in vivo*. A separate important component of the work is the development of an understanding of the crucial role of integrin-mediated interactions in the process of tumour cell attachment and metastasis, which not only provides a valuable insight into oncogenesis but also brings new possibilities for the development of anti-tumour drugs.

Keywords: integrins, tumour cells, carcinogenesis, platelets, cell cultures, haemostasis, inflammation, carcinoma cell lines, radiation syndrome, diabetes, atherosclerosis, chromatography, mass spectrometry, bioinformatics, disintegrins.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

1. Vinnichuk, Y. D., **Platonov, O. M.**, Gryshchuk, O. O., & Komisarenko, S. V. (2025). Experimental cancer rat models. *Ukrainian Biochemical Journal*, 97(1), 5–24. (Q4) <https://doi.org/10.15407/ubj97.01.005>

Вінничук Ю. Д. – концептуалізація, збір даних, візуалізація, написання оригінальної чернетки, написання огляду та редагування;

Платонов О. М. – дослідження, вичитка рукопису;

Гришук О. О. – редагування, вичитка рукопису;

Комісаренко С. В. – ресурси, концептуалізація.

2. Korolova, D., Gryshchenko, V., Chernyshenko, T., Hornytska, O., Chernyshenko, V., **Platonov, O.**, Klymenko, P., Reshetnik, Y., & Platonova, T. (2023). Blood coagulation factors and platelet response to drug-induced hepatitis and hepatosis in rats. *Animal Model and Experimental Medicine*, 6(1), 66–73. (Q1) <https://doi.org/10.1002/ame2.12301>

Корольова Д. С. – дослідження, візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Грищенко В. А. – ресурси, дослідження, методологія, інтерпретація результатів, редагування та вичитка рукопису;

Чернишенко Т. М. – дослідження, інтерпретація результатів, методологія;

Горницька О. В. – інтерпретація результатів, редагування та вичитка рукопису;

Чернишенко В. О. – ресурси, концептуалізація, візуалізація;

Платонов О. М. – дослідження, візуалізація, редагування рукопису;

Клименок П. П. – дослідження, методологія;

Решетнік Є. М. – дослідження, візуалізація;

Платонова Т. М. - інтерпретація результатів, редагування та вчитка рукопису.

3. Zhelavskiy, M. A., **Platonov, O. M.**, Kucheryavyi, Y. P., & Stohnii, Y. M. (2023). Aprobation of platelet aggregation inhibitor from *Echis multisquamatus* snake venom *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. *Biotechnologia Acta*, 16(5), 55–60. <https://doi.org/10.15407/biotech16.05.055>

Желавський М. А. – дослідження, написання оригінальної чернетки;

Платонов О. М. – дослідження, візуалізація, редагування рукопису;

Кучерявий Є. П. – дослідження, методологія, візуалізація;

Стогній Є. П. – дослідження, методологія, інтерпретація результатів, редагування та вчитка рукопису.

4. Baidakova, K.V., Stohnii, Y.M., **Platonov, O.M.** (2023). Fibrinogen-specific protease in the *Vipera renardi* snake venom. *Biotechnologia Acta*, 16(2), 11-12. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.011>

Байдакова К. В. – дослідження, написання оригінальної чернетки;

Стоній Є. П. – дослідження, методологія, інтерпретація результатів, редагування та вчитка рукопису;

Платонов О. М. – дослідження, візуалізація, методологія.

5. **Platonov, O. M.**, & Us, I. V. (2023). *Ex vivo* study of the action of integrin receptors antagonist from *Echis multisquamatus* snake venom on platelets of pregnant women with complications during gestation. *Biotechnologia Acta*, 16(2), 37–39. <https://doi.org/10.15407/biotech16.02.037>

Платонов О. М. - дослідження, інтерпретація результатів, візуалізація, написання оригінальної чернетки, редагування рукопису;

Ус І. В. – ресурси, методологія, редагування та вчитка рукопису;

6. Us, I. V., Zhuk, S. I., Korolova, D. S., **Platonov, O. M.**, & Tsaryk, Yu. O. (2022). Platelet hemostasis in the implementation of placental dysfunction. *Reproductive Health of Woman*, 6, 6–12. (Q4) <https://doi.org/10.30841/2708-8731.6.2022.267676>

Ус І. В. – ресурси, дослідження, методологія, написання оригінальної чернетки;

Жук С. І. – ресурси, інтерпретація результатів, концептуалізація, вичитка рукопису;

Корольова Д. С. – дослідження, візуалізація;

Платонов О. М. – дослідження, візуалізація; інтерпретація результатів;

Царик Ю. О. – дослідження, візуалізація.

7. Iskandarov, E., Zinenko, O., Tupikov, A., Pitishkina, A., **Platonov, O.**, Gryshchuk, V., Kucheriavyi, Y., & Stohnii, Y. (2022). Action of venom of Vipera snake of Ukraine on blood coagulation in vitro. *Biotechnologia Acta*, 15(2), 56–57. <https://doi.org/10.7124/bc.000AA1>

Іскандаров Е. Ш. – дослідження, написання оригінальної чернетки;

Зіненко О. І. – ресурси, методологія;

Тупіков А. І. – методологія, інтерпретація результатів;

Пітішкіна Г. О. – дослідження, візуалізація;

Платонов О. М. – дослідження, методологія, редагування;

Грищук В. І. – концептуалізація, написання огляду, редагування вичитка рукопису;

Кучерявий Є. П. – ресурси, методологія, дослідження;

Стогній Є. М. – дослідження, методологія, візуалізація.

8. Iskandarov, E., **Platonov, O. M.**, Gryshchuk, V., Kucheriavyi, Y., Slominskyi, O., Stohnii, Y., Vartanov, V., & Chernyshenko, V. (2022). Fractionation of *Vipera berus berus* snake venom and detection of bioactive

compounds targeted to blood coagulation system. *Southeastern European Medical Journal*, 6(2), 20–31. <https://doi.org/10.26332/seemedj.v6i2.256>

Искандаров Е. Ш. – дослідження, візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Платонов О. М. – дослідження, візуалізація;

Гришук В. І. – написання огляду, редагування та вчитка рукопису;

Кучерявий Є. П. – ресурси, методологія;

Сломінський О. Ю. – дослідження, методологія, інтерпретація результатів;

Стогній Є. П. – дослідження, методологія, інтерпретація результатів;

Вартанов В. Г. – методологія;

Чернишенко В. О. – ресурси, концептуалізація, вчитка рукопису.

9. Nikulina, V., Kucheryavyi, Y., **Platonov, O. M.**, Gryshchuk, V., Stohniy, Y., Chernyshenko, V., Slominskyi, O., Rebriev, A., Savchenko, K., & Garmanchuk, L. (2022). Purification and characterization of platelet aggregation inhibitor from the venom of *Bitis arietans*. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 94(5), 7–17. (Q4) <https://doi.org/10.15407/ubj94.05.007>

Нікуліна В. В. – методологія, підготовка чернетки;

Кучерявий Є. П. – електрофоретичні дослідження;

Платонов О. М. – написання рукопису, агрегатометрія;

Гришук В. І. – створення хроматографічних протоколів;

Стогній Є. М. – агрегатометрія;

Чернишенко В. О. – вчитка рукопису, візуалізація;

Сломінський О. Ю. – хроматографічні дослідження;

Ребрієв А. В. – мас-спектрометрія;

Савченко К. С. – робота з культурами клітин;

Гарманчук Л. В. – робота з культурами клітин.

10. Korolova, D. S., Stohnii, Y. M., Gryshchuk, V. I., Zhuk, S. I., Us, I. V., Chernyshenko, T. M., Kostyuchenko, O. P., Klymenko, K. P., **Platonov, O. M.**, Ivashchenko, O. I., & Chernyshenko, V. O. (2021). Thromboelastographic study of fibrin clot and molecular basis of maximum clot firmness. *Ukrainian Biochemical Journal*, 93(2), 56–63. (Q4) <https://doi.org/10.15407/ubj93.02.062>

Корольова Д. С. – візуалізація, написання оригінальної чернетки;

Стогній Є. П. – дослідження, методологія;

Гришук В. І. – написання огляду, редагування та вичитка рукопису

Ус І. В. – ресурси, дослідження, методологія, редагування рукопису;

Жук С. І. – ресурси, інтерпретація результатів, концептуалізація, вичитка рукопису;

Чернишенко Т. М. – дослідження, методологія;

Костюченко О. П. – дослідження, методологія;

Клименко К. П. – дослідження, методологія;

Платонов О. М. – дослідження, візуалізація;

Іващенко О. І. – дослідження;

Чернишенко В. О. – ресурси, інтерпретація результатів, концептуалізація, вичитка рукопису.

11. Pitishkina A.O., **Platonov O.M.**, Chernyshenko T.M., Gryshchuk V.I., Gornytska O.V. Purification of protein C activator from *Calloselasma rhodostoma* venom and it's approbation for the determination of protein C in blood plasma. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021. Київ. 20-21 травня 2021 р. С. 20.

12. Kucheriavyi Ye.P., Gryshchuk V.I., Rebriev A.V., **Platonov O.M.**, Savchenko K.S. The mechanism of anticoagulant action of the venom of *Brachypelma smithi*. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021. Київ. 20-21 травня 2021 р. Р. 29.

13. **Platonov, O. M.**, Marunych, R. Yu., Rebriev, A. V., Ryzhykova, M. V., Savchenko, K. S., Gryshchuk, V. I., Garmanchuk, L. V., Chernyshenko, V. O. (2021) Studying the effects of snake venom disintegrins on platelet aggregation and tumor cell viability. Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021. Київ. 20-21 травня 2021 р. – С. 31.

14. Stohnii, Y., Baidakova, K., **Platonov, O.**, Kucheryavii, Y., Rebriev, A., Iskandarov, E., Zinenko, O., Gryshchuk, V. Fibrinogenases from the animal venoms in the study of fibrinogen structure and functions. Conference: 26th congress of the ISFP&PA and Fibrinolysis workshop of the Hungarian Society of Thrombosis and Haemostasis At: Budapest. 11-14 October, 2023, P. 54.