

Голові спеціалізованої вченої ради
при Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
доктору біологічних наук, професору,
заввідділом нейрохімії Інституту
біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
Тетяні БОРИСОВІЙ

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора, завідувача лабораторії біохімії ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України» Сергія ВЕРЬОВКИ на дисертаційну роботу ПЛАТОНОВА Олега Максимовича «Антитромботична та антипроліферативна дія антагоністів інтегринових рецепторів», що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Актуальність дисертаційної роботи. Всебічне дослідження молекулярно-клітинної ланки регуляції фізіологічних та патофізіологічних процесів становить невід'ємну умову розуміння перебігу гомостазу за норми та патології, створення методичних підходів до цілеспрямованої корекції відповідних порушень. В цьому відношенні дослідження механізмів міжклітинних взаємодій, що опосередковані клітинними рецепторами – інтегринами, що задіяні в асоціативних взаємодіях клітин. Подібного роду взаємодіями опосередковані агрегація тромбоцитів, проліферація, міграція та адгезія пухлинних клітин, що визначає їх чільну роль в цілій низці патологічних станів – різноманітних видах внутрішньосудинного тромбоутворення, зокрема серцево-судинних ускладненнях, онкологічних захворюваннях, тощо. Незважаючи на багаторічні дослідження, існуючі антикоагулянтні препарати далекі від досконалості і мають істотні недоліки, що ускладнюють, якщо не унеможливають, їх

застосування. Те ж саме може бути сказано й про існуючі протипухлинні препарати, серед численних недоліків яких варто згадати неселективність дії, високу токсичність, тяжкі побічні ефекти та формування пухлинної резистентності. Також лишається відкритим питання про цілеспрямовану доставку препаратів до пухлинних клітин, що могло б сприяти ефективності лікування з мінімалізацією побічної дії. В подібному контексті стає очевидною актуальність пошуків засобів, здатних ефективно і цілеспрямовано впливати на міжклітинні взаємодії, що відіграють чільну роль в розвитку відповідних патологій. В цьому відношенні вельми перспективними сполуками видаються пептидні блокатори інтегринів – дезінтегрини, що високовибірково блокують взаємодію інтегринів з відповідними лігандами. Тим самим стає можливим пригнічення зв'язування проактивованих тромбоцитів з фібрин(оген)ом, що знижує здатність тромбоцитів до агрегації та може бути використано при профілактиці тромботичних ускладнень. Впливаючи на участь інтегринів у виживанні, рухливості, інвазії та ангіогенезі пухлинних клітин, дезінтегрини можуть стати основою для створення високоефективних антиметастатиків.

Одним з провідних джерел отримання дезінтегринів є отрута змій – еволюційно сформовані комплекси сполук, здатних високоселективно впливати на чільні процеси гемостазу. Тому робота, присвячена дослідженню дезінтегринів з отрути змій стосовно їх впливу на інтегрин-опосередковані взаємодії тромбоцитів та пухлинних клітин, може бути оцінена як високоактуальна як з пізнавально-теоретичної, так і з практичної точок зору.

Мета розглянутої роботи полягає в отриманні та характеристиці дезінтегринів з отрути змій з метою оцінки їх впливу на інтегрин-опосередковані взаємодії тромбоцитів та пухлинних клітин з подальшою їх апробацією *in vivo* в якості засобів для зниження прокоагулянтного потенціалу тромбоцитів та інвазивного потенціалу пухлинних клітин. Обрання подібної мети видається виправданою і заперечень не викликає. Відповідно до поставленої мети сформульовано низку практичних завдань, до яких належать:

- проведення аналізу стану тромбоцитарної ланки гемостазу на моделях патологій, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення *in vivo*;
- отримання та характеристика дезінтегринів з отрути змій;
- дослідження впливу досліджуваних дезінтегринів на агрегацію тромбоцитів людини та вибір найбільш підходящих з точки зору інгібування інтегрин-опосередкованих взаємодій;
- проведення комплексної ідентифікації обраного дезінтегрину біохімічними та біофізичними методами;
- оцінку здатності виявленого дезінтегрину до блокування агрегації тромбоцитів в плазмі крові умовно здорових донорів та жінок з ускладненою вагітністю;
- перевірку антиагрегантної дії цього дезінтегрину за умов *in vivo*.
- дослідження антипроліферативної дії обраного дезінтегрину на клітини ліній LLC, HeLa, MAEC та BV-2 в культурі;
- апробацію дії обраного дезінтегрину на прогресію перевитих пухлинних клітин та на їх метастазування на моделях *in vivo*.

Подібна деталізація завдань видається цілком виправданою та свідчить про глибоке занурення пошукувача в досліджувану проблему, що заслуговує на схвалення.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота побудована за традиційною схемою і містить вступ, огляд літератури, методичну частину, результати досліджень та їх обговорення, заключення, висновки та список використаних джерел літератури. Стосовно останнього варто відмітити, що серед 186 посилань переважають публікації останніх років.

Огляд літератури свідчить про належне ознайомлення автора з ключовими питаннями задуманого дослідження. Наведено дані про ключові механізми гемостазу, зокрема стосовно його тромбоцитарної ланки. Значної уваги приділено даним щодо природи інтегринів та опосередкованих ними взаємодіям, впливу на ці процеси дезінтегринів, зокрема – впливу на функціонування тромбоцитів та пухлинних клітин.

Наведено дані про експериментальні моделі канцерогенезу, що необхідно для проведення досліджень дії дезінтегринів за умов *in vivo*.

Говорячи про методичну частину роботи, варто підкреслити виключно високий рівень широкого набору застосованих препаративних та дослідницьких методів. В першу чергу треба відмітити створення моделей для дослідження агрегації тромбоцитів за низки патологій – діабету, атеросклерозу, канцерогенезу, токсичного гепатиту, жирового гепатозу, LPS-індукованого запалення, гострого радіаційного ураження та інфікування SARS-CoV-2. Подібний набір методів експериментальної біології дозволяє говорити про розглянуту роботу як про фундаментальне дослідження, виконане на найвищому методичному рівні. Не меншого схвалення заслуговує й набір препаративних та дослідницьких біохімічних та біофізичних методів. Застосовано іонообмінну хроматографію, хроматографію розділення за розміром та вискоефективну рідинну хроматографію. Контроль процесів очищення та оцінку отримуваних білків проводили електрофоретичним методом в поліакриламідному гелі. Застосовано ферментативну деградацію білків та визначення їх амінокислотного складу, імуноферментний аналіз, мас-спектрометричний аналіз та комп'ютерне моделювання структури білків. Третьою групою дослідницьких методів стали методи клітинної біології, що дали змогу оцінити процеси індукованої агрегації тромбоцитів, життєдіяльності клітин, інтенсивності їх фіксації клітин, клітинного циклу та антипроліферативного впливу на канцерогенез.

Внаслідок проведеної роботи отримано вагомі наукові та практичні результати. За групи експериментальних патологічних станів виявлено зміни агрегаційної здатності тромбоцитів, прокоагулянтного потенціалу тромбоцитарної ланки гемостазу та обґрунтовано доцільність їх корекції інгібіторами агрегації тромбоцитів зі зміїних отрут. Отримано електрофоретично чисті препарати інгібіторів агрегації тромбоцитів з отрут трьох видів змій та охарактеризовано їх вплив на агрегацію тромбоцитів. Показано, що отримані дезінтегрини безпосередньо взаємодіють з GPIIb/IIIa-рецепторами тромбоцитів. Завдяки комплексному застосуванню методів мас-

спектрометрії та комп'ютерного моделювання ідентифіковано дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* та створено модель його просторової структури. Експериментально доведено, що даний дезінтегрин забезпечує ефективне зниження агрегації тромбоцитів за умов *in vitro* та *in vivo*. Показано ефективне інгібування агрегації тромбоцитів з плазми крові осіб з аспіринорезистентністю, під час терапії гепарином та аспірином за умов *ex vivo*. Показано ефективне пригнічення цим дезінтегрином проліферативної активності клітин карциноми Льюїс, мікроглії миші (BV-2), МАЕС та HeLa. Показано, що застосування даного дезінтегрину забезпечує гальмування пухлинного росту та пригнічення метастазування за перевивання клітин карциноми Льюїс, що свідчить про його високу потенційну цінність в якості протипухлинного засобу.

Отримані при виконанні роботи експериментальні дані обчислено належним чином, а зроблені на їх підставі висновки принципових зауважень не викликають. Рівень опублікованості наукових здобутків повною мірою відповідає існуючим вимогам: опубліковано 14 робіт, серед яких 10 статей в іноземних фахових наукових виданнях, що представлені в базах Scopus, та 4 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Питання та зауваження. Принципових зауважень до роботи немає. Щоправда, хотілось би отримати відповіді здобувача на наступні питання:

- Чому не визначалися інші показники системи гемостазу, окрім агрегації тромбоцитів? Чи корелюють показники плазмового гемостазу з активністю тромбоцитів у досліджуваних моделях на тваринах?
- Чим ви пояснюєте виявлений ефект зниження здатності тромбоцитів до агрегації за гепатозу і навпаки - гіперагрегацію тромбоцитів за гепатиту?
- Наскільки реальним є клонування дезінтегрина, який було обрано як основу для створення антитромботичного засобу? Чи відомо, яку саме частину дезінтегрину треба для цього клонувати, або ж потрібна лише повнорозмірна молекула?

- Чи не перевіряли отрути українських змій на предмет наявності у їх складі дезінтегринів?

Висновок. Оцінюючи роботу вцілому, маю підкреслити її високий науковий та методичний рівень, актуальність поставлених завдань та обґрунтованість висновків. Робота являє собою завершений цикл пошукових робіт, що містить вибір патологічних станів, що потребують пригнічення асоціативної функції тромбоцитів, скринінг отрут змій як джерела потенційних антиагрегантних агентів, комплексну характеристику перспективних антагоністів інтегринових рецепторів апробацію найбільш ефективного дезінтегрину *in vivo*. Не менш важливим видається обґрунтування уявлень про провідну роль інтегрин-опосередкованих взаємодій в процесах фіксації та метастазування ракових клітин. Останнє є вагомим внеском до розуміння онкогенезу та створює вагомі перспективи для створення ефективних протипухлинних препаратів. Представлені результати є оригінальним дослідженням, виконаним самоїстійно.

З наведених міркувань вважаю, що дисертаційна робота Платонова Олега Максимовича «Антитромботична та антипроліферативна дія антагоністів інтегринових рецепторів» являє собою завершене цілісне наукове дослідження, що повною мірою 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 йому ступеня доктора філософії з галузі знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія.

доктор біологічних наук, професор

завідувач лабораторії біохімії

ДУ “Інститут отоларингології

ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України”

Верьовка С.В.

