

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

Олега ПЛАТОНОВА

«АНТИТРОМБОТИЧНА ТА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНА ДІЯ АНТАГОНІСТА
ІНТЕГРИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ»,

яка подається на здобуття наукового ступеня

доктора філософії

у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність дисертаційної роботи. Інтегринові рецептори, зокрема $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa) та $\alpha\nu\beta 3$, відіграють центральну роль у клітинній адгезії, міграції та сигналінгу. Так інтегриновий рецептор тромбоцитів $\alpha\text{IIb}\beta 3$ опосередковує їх агрегацію, що є критичним етапом у формуванні тромбу. Інтегринові рецептори $\alpha\nu\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ та $\alpha 6\beta 4$ підтримують виживання пухлинних клітин, ангиогенез, інвазію та метастазування. Тому, використання антагоністів інтегринових рецепторів може бути способом корекції та запобігання таких процесів як гіперагрегація тромбоцитів, за умов серцево-судинних захворювань або уникнення метастазування, за онкологічних захворювань.

Перші препарати на основі антагоністів інтегринових рецепторів $\alpha\text{IIb}\beta 3$, такі як абциксимаб, тирофібан та ептифібатид, були розроблені в 1990-х роках для запобігання тромбозу під час черезшкірного коронарного втручання. Ці дезінтегрини значно зменшували кількість гострих ішемічних подій, демонструючи терапевтичну силу блокування інтегрин-опосередкованих взаємодій у кардіології. Ретроспективно ці препарати довели, що короткочасна блокада таких взаємодій може запобігти тромбоцитарно-опосередкованим ускладненням без повної системної антикоагуляції. Незважаючи на успіх, ризики кровотеч і проблеми з введенням (внутрішньовенне введення) обмежували їх широке застосування. Однак, дослідження пероральних антагоністів інтегринових рецепторів допомогли виявити ключові структурні та фармакодинамічні проблеми, що призвело до сучасного вдосконалення дизайну та селективності проантагоністів інтегринових рецепторів, таких як циленгітид (інгібітор $\alpha\nu\beta 3/\alpha\nu\beta 5$). Пероральне застосування дезінтегринів показали

багатообіцяючі результати в доклінічних моделях, пригнічуючи ангіогенез і метастазування. У хворих на онкологічні захворювання часто спостерігаються протромботичні стани, а інтегрини беруть участь у взаємодії тромбоцитів з пухлинними клітинами, сприяючи метастатичному поширенню. Антагоністи інтегринових рецепторів за умов терапевтичного застосування можуть мати подвійну користь, тому що вони здібні пригнічувати як тромбоутворення, так і пухлинну прогресію.

Саме тому дисертаційна робота Олега Платонова є актуальною та має як теоретичне, так і практичне значення. Самі дослідження, викладені у дисертаційній роботі, беруть за мету отримання, характеристику та апробацію дезінтегрину як потенційної антитромботичної та антиметастатичної сполуки.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень з їх обговоренням, викладених у вісьмох розділах, заключення, висновків, списку використаних джерел літератури який містить 176 посилань. Розділи, які наявні в роботі, наступні: Розділ 1, Огляд літератури; Розділ 2, Матеріали та методи досліджень; Розділ 3, Дослідження агрегаційної здатності тромбоцитів за моделювання патологічних станів різного генезу; Розділ 4, Отримання і характеристика антагоністів інтегринових рецепторів з отрути змій; Розділ 5, Антиагрегантна дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*; Розділ 6, Ідентифікація дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*; Розділ 7, Антипроліферативна дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* та розділ 8, заключення. Дисертаційна робота викладена на 140 сторінках (з них 117 сторінка основної частини), містить 40 рисунків та 8 таблиць.

Основні результати дисертаційної роботи, їхня новизна та практичне значення. Метою роботи є отримання та характеристика дезінтегринів з отрути змій для 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.

Відповідно до мети було сформульовано вісім основних завдань, які було успішно завершено, використовуючи наступні методи: хроматографічні, електрофоретичні, мас-спектрометричні, комп'ютерного моделювання, агрегаційні, культивування клітин, МТТ-тесту, перевірка препарату та моделювання патологій на лабораторних тваринах (щурах).

Спершу автором було накопичено дані по агрегаційній здатності тромбоцитів в плазмі крові лабораторних тварин за умов моделювання *in vivo* патологій різного генезу, зокрема моделях, які пов'язані з гострим або хронічним запаленням: тетрациклінову модель гепатозу, диклофенак-індуковану модель гепатиту, діабету, викликаного ожирінням, атеросклерозу, пухлинного росту, LPS-індукованого запалення, гострого радіаційного синдрому, введення фрагменту S-шипа SARS-CoV-2. При аналізі порівнювали ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів у експериментальних та у здорових тварин одного віку та лінії. Виявлено гіперагрегацію у моделях патологій тетрациклінового гепатозу, діабету, викликаного ожирінням, атеросклерозу та пухлинного росту. Також зазначена гіпоагрегація при диклофенак-індукованому гепатиту, LPS-індукованого запалення, гострого радіаційного синдрому, введення фрагменту S-шипа SARS-CoV-2.

Надалі автор приходить до висновку, що необхідний антагоніст інтегринових рецепторів для пригнічення агрегації тромбоцитів й переходить до його отримання з отрут змій. Описано й наведено графіки хроматографічного розділення (різних за умовами) цільних отрут трьох змій – *Bitis arietans*, *Calloselasma rhodostoma*, та *Echis multisquamatus*. Показано, на яких етапах було отримано дезінтегрин та електрофоретичним методом ПААГ у системі Лемлі зазначено чистоту протеїнових фракцій.

Надалі описується вплив кожного дезінтегрину з отрут *Bitis arietans*, *Calloselasma rhodostoma*, та *Echis multisquamatus* на процес ADP-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові в залежності від концентрації дезінтегринів. Також було досліджено їхню здатність взаємодіяти з GPIIb/IIIa-рецептором на відмитих тромбоцитах в лунках 96-лункового планшету. Показано, що всі три досліджувані протеїни володіли здатністю

зв'язуватися з GPIIb/IIIa-рецептором тромбоцитів. Для подальшої роботи було обрано найбільш ефективний дезінтегрин, яким, за думкою автора, став отриманий з отрути *Echis multisquamatus*.

Варто зазначити, що дезінтегрини було проаналізовано за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометричного аналізу, при цьому пробопідготовку здійснювали за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії. Результат цих досліджень показав, що аліквота фракції з отрути *Bitis arietans* містила два дезінтегрини масою 13,7 та 9,0 кДа, у складі фракції отрути *Calloselasma rhodostoma* протеїновий компонент з молекулярною масою 13.1 кДа та отриманий з отрути *Echis multisquamatus* компонент з молекулярною масою 14,887 кДа.

Далі проведений амінокислотний аналіз дав автору змогу кількісно оцінити вміст та співвідношення амінокислот у зразку дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* й виявити підвищений вміст цистеїну та аспарагінової кислоти, що слугує ще одним підтвердженням дезінтегринової природи протеїну. Для додаткової характеристики було використано методи трипсинолізу та двомірного електрофорезу, за результатами яких виявлено гомологію з вже існуючим у протеїновій базі даних дезінтегрином та ізоелектричну точку двох його ізоформ. Використовуючи метод *in silico*, автором побудовано теоретичну просторову структуру гомодимерної молекули дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*.

Наступним етапом діяльності автора стала перевірка дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* на інгібування агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові жінок з ускладненою вагітністю, яке показало ефективне інгібування у всіх тринадцяти зразках. Також, не завадить зазначити, перевірилась інгібіторна дія дезінтегрину за умов прийому антикоагулянтів та за аспіринорезистентності, яка виявилась так само ефективною. Тож, як зазначає автор, дезінтегрин може бути потенційною платформою для створення антиагрегантного препарату. Було перевірено можливості застосування дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* для зниження прокоагулянтного

потенціалу тромбоцитів *in vivo* на щурячій моделі й наведено ефективну антиагрегантну дію і за таких умов введення.

Найбільш визначальним етапом дослідження стала перевірка здатності отриманого дезінтегрину пригнічувати проліферативну активність пухлинних та непухлинних клітин у культурі й зафіксовано показники IC50 на культурах клітини лінії карциноми легень Льюїса та HeLa й клітини лінії BV-2 та МАЕС. Також перевірилися швидкість прикріплення клітин до субстрату за дії дезінтегрину та вивчалась дія досліджуваного дезінтегрину на фази клітинного циклу. Інтенсивність прикріплення клітин за присутності дезінтегрину була достовірно нижчою, порівняно з відповідним контролем, що свідчить про достовірне інгібування прикріплення пухлинних клітин до поверхні. Дезінтегрин помірно інгібував фази синтезу та поділу клітинного циклу, що є непоганим результатом.

Для оцінки протипухлинної дії дезінтегрину *in vivo* автором було проведено перевивку клітин лінії карциносаркоми Уокера W-256 щурам лінії Вістар. Отримані результати відмічали тенденцію до зменшення об'єму пухлини у щурів дослідної групи упродовж спостереження та достовірне зменшення об'єму пухлини на фоні застосування дезінтегрину. Подібні дослідження були проведені на мишах зі схожим результатом, проте окрім динаміки росту пухлини наведено утворення й зростання метастазів, при цьому інгібування метастазів за об'ємом становила майже 100 %.

Зауваження та питання.

1. Огляд літератури містить певний дисбаланс, якого було б бажано уникнути. Зокрема, більша частина огляду присвячена гемостазу (6 стор) та моделям онкогенезу у тварин (16 стор) і тільки 10 сторінок присвячено основній темі дисертації інтегринам та дезінтегринам.

2. У вступі треба чіткіше сформулювати мету та логічно розставити задачі, по мірі їх вирішення (спочатку отримання дезінтегринів, характеристика їх *in vitro*, вибір найкращого і так далі).

3. Результати роботи теж треба представити згідно логічному ланцюгу їх отримання і почати з розділу отримання дезінтегринів, їх молекулярної

характеристики, виявлення найбільш ефективного дезінтегрину та результати його більш детального вивчення і закінчити результатами на моделях *in vivo*.

4. Висновки мають бути більш чіткими і відповідати отриманим результатам.

5. Текст дисертації потребує редагування та виправлення орфографічних та граматичних помилок.

Питання 1: як ви вважаєте іммобілізація дезінтегринів на поверхню біоматеріалів, що контактують з кров'ю могла б покращати їх біосумісність?

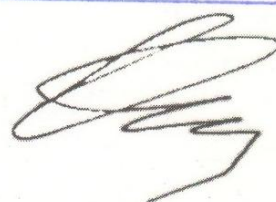
Питання 2: чим на вашу думку відрізняється найбільш ефективний дезінтегрин з *Echis multisquamatus* від інших дезінтегринів, які ви вивчали? Яка характеристика дезінтегрину є ключовою в його активності?

Втім, наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність представленого дисертаційного дослідження. Результати, що отримано в дисертаційній роботі, істотно розширюють існуючі практичні та теоретичні знання про біохімічні механізми інтегринових взаємодій.

Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Олега ПЛАТОНОВА «АНТИТРОМБОТИЧНА ТА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНА ДІЯ АНТАГОНІСТА ІНТЕГРИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ» за актуальністю, методичним рівнем, об'ємом та новизною отриманих експериментальних результатів, особистим внеском здобувача та науково-практичним значенням відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії, скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р. (№ 44) та може бути представлена до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія.

Старший науковий співробітник
відділу структури та функції білка
Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України

Підпис *С. Снежкова*
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
національної академії наук України
"22" липня 2025 р.



Слизова Снежкова