

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, академіка НАН України,
завідувача відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики

НАН України Валерія ФІЛОНЕНКА на дисертаційну роботу Олега
ПЛАТОНОВА «АНТИТРОМБОТИЧНА ТА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНА ДІЯ
АНТАГОНІСТІВ ІНТЕГРИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ», подану на здобуття наукового ступеня
доктора філософії галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

1. Актуальність обраної теми. Інтегрини – це родина молекул клітинної адгезії, які опосередковують взаємодію між клітинами, з позаклітинним матриксом та патогенами. Самі інтегрини є гетеродимерними трансмембранними протеїнами, що складаються з нековалентно пов'язаних α - та β -субодиниць.

Екзодомени інтегрину зв'язуються з глікопротеїнами позаклітинного матриксу, іншими клітинними рецепторами та молекулами міжклітинної адгезії. Цитоплазматичні хвости взаємодіють з адаптерними молекулами, активаторами та інгібіторами інтегрин-опосередкованих взаємодій. Конкурентне зв'язування між цими молекулами регулює передачу сигналу, опосередковану інтегрином.

Динамічна регуляція активації інтегрину індукується зв'язуванням ліганду позаклітинного матриксу з екзодоменом, а також асоціацією внутрішньоклітинних адаптерних молекул з цитоплазматичним «хвостом». Двонаправлені процеси активації називаються сигналами «зовні всередину» та «зсередини назовні». При сигналюванні «зовні всередину» відбувається зв'язування ліганду з інтегрином стимулює відкриття головної частини, за яким слідує розширення інтегрину та розділення нижньої частини рецептора. Водночас за сигналювання «зсередини назовні» ініціюється зв'язування цитоплазматичного хвоста інтегрину з протеїнами цитоскелету, що призводить до розділення нижньої частини рецептора, а конформаційна зміна поширюється на головну частину.

Таким чином інтегринові рецептори сполучають внутрішньоклітинне середовище із зовнішньоклітинним, забезпечуючи взаємодію клітин із оточенням. Ці рецептори не лише забезпечують механічне прикріплення клітини, але і забезпечують її «спілкування» з оточенням. З огляду на такі функції зрозуміло, що з їхньою активністю пов'язаний розвиток

багатьох важких патологій людини серед яких онкологічні захворювання, запальні та аутоімунні процеси, порушення системи гемостазу та багато іншого. Тому вивчення інтегринових рецепторів та шляхів їхнього регулювання є важливим напрямком досліджень сучасної молекулярної біології.

В роботі Олега ПЛАТОНОВА досліджено один із механізмів впливу на активність інтегринових рецепторів за участі дезінтегринів отриманих з отрути змій, що здатні розпізнаватись інтегриновими рецепторами за рахунок специфічних трипептидних послідовностей, наприклад RGD, KGD, MLD та ін. Зв'язуючись з інтегринами, дезінтегрини блокують інтегрин-опосередковані взаємодії, а також сигналінг як «ззовні всередину», так і «зсередини назовні». З огляду на те, що інтегринові взаємодії є критично важливими для виживання пухлинних клітин та перебігу онкологічних захворювань загалом, а також для процесів тромбоутворення, актуальність роботи не підлягає жодним сумнівам.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках проєктів НДР: № 0114U003217 «Вивчення механізму формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностиків стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2019-2023); № 0123U102770 «Вплив природної і штучної імунізації антигенами SARS-CoV-2 на стан системи гемостазу» (2023-2024); № 0124U000251 «Дослідження та пошук способів регуляції молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення» (2024-2028).

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дослідження було проведено дисертантом самостійно, і його результати є оригінальним науковим внеском, виконаним на високому методичному та теоретичному рівнях. Робота має логічну структуру і представляє собою комплексне наукове дослідження. Важливим є поєднання як класичних біохімічних методів, так і досліджень *in vitro* та *in vivo*, які вдало підтверджують отримані результати з обох сторін. Необхідно відзначити аргументований аналіз отриманих даних, що свідчить про високий рівень наукової компетентності автора.

4. Достовірність основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень та одержаних результатів. Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає ніяких сумнівів, оскільки Олег ПЛАТОНОВ аргументував отриманні результати на кожному етапі експериментів. Для результатів *in vitro* було проведено статистичний аналіз.

5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів. Наукова новизна проведених наукових досліджень, одержаних результатів, а також основних наукових

положень, висновків і практичних рекомендацій, зроблених Олегом ПЛАТОНОВИМ, полягає у тому, що вперше було проведено подібне комплексне дослідження дії дезінтегрину за різних патологічних станів та доведено його ефективне інгібування процесів гіперагрегації тромбоцитів за вагітності з ускладненнями під час гестації на збагаченій тромбоцитами плазмі крові та при перебігу онкологічного захворювання на тваринній моделі *in vivo*. Також вперше представлено теоретичну просторову модель молекули димеризованого дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*. Також можна відмітити розробку й удосконалення процесу одержання дезінтегринів з цільної отрути змії.

6. Практичне значення одержаних результатів. Отримано, охарактеризовано, та перевірено інгібіторну дію антагоніста інтегринових рецепторів з *Echis multisquamatus*, що розширює розуміння інтегрин-асоційованих шляхів сигналіngu й дозволяє говорити про застосування дезінтегрину як потенційного препарату для попередження чи елімінації тромбозів та для онкотерапій.

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях. За результатами дослідження опубліковано 10 статей у фахових наукових виданнях України та міжнародних журналах і 4 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових Всеукраїнських та Міжнародних конференцій. Основні наукові положення дисертаційного дослідження повністю, на професійному рівні викладені у представлених публікаціях та обговорені на наукових зібраннях.

8. Структура 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 (186 посилань). Дисертаційна робота викладена на 163 сторінках (з них 132 сторінки основної частини), містить 40 рисунків та 8 таблиць.

Огляд літератури стосується аналізу наявних даних за темою дослідження. Проаналізовано сучасний стан проблеми, обґрунтовано актуальність та необхідність проведення досліджень. Методи детально охарактеризовані.

Розділ 3, з якого починаються результати та їх обговорення, присвячений агрегації тромбоцитів за різних патологічних станів, з гарним поясненням кожного.

Розділ 4 описує хроматографічне розділення цільних отрут змії та роботу з отриманими фракціями, перевірка цих фракцій електрофоретично у поліакриламідному гелі та визначенно концентрації отриманих протеїнів. Надалі відбулось визначення молекулярної маси отриманих протеїнів та перевірка їх активності на АДФ-індуковану агрегації тромбоцитів.

В подальших дослідженнях, викладених у розділі 5, визначено афінність протеїнів до інтегринового рецептора тромбоцитів методом непрямого імуноензимного аналізу. Дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* мав найбільший показник афінності за результатом

аналізу та його було обрано для наступних досліджень, спершу – для аналізу його амінокислотного складу та пошуку гомологій із вже існуючими протеїнами у UNIPROT DataBase. На основі результатів гомології було побудовано тривимірну модель гетеродимерного дезінтегрину.

В наступному розділі 6 описуються дослідження *in vitro* на тромбоцитах вагітних жінок з ускладненнями під час гестації, яке показало ефективне зниження ступеню агрегації тромбоцитів, що дає змогу говорити про дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* як про інгібітора цього процесу. Також було проведено *in vivo* дослідження на тваринній моделі щурів дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*, яке показало ефективне інгібування процесу АДФ-індуковану агрегації тромбоцитів і за умов введення у живий організм.

На останньому етапі досліджень розділа 7 описуються *in vitro* та *in vivo* експерименти по антипроліферативній дії дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*. До *in vitro* досліджень входить МТТ-тест на виживаність за присутності дезінтегрину у культурах онкоклетин ліній карциноми легень Льюїса та раку шийки матки. При ньому показник IC50 для клітин HeLa був значно менший, аніж для клітин LLC. МТТ-тест проводився і на непухлинних клітинах, таких як клітинах мікроглії та ендотелію аорти миші, що мали приблизно однаковий показник IC50.

Представлено також і результати тесту на прикріплення пухлинних клітин до субстрату під дією дезінтегрину, яке показало що 50 % клітин лінії HeLa не були прикріплені, тоді як відсоток прикріплених клітин лінії МАЕС не зазнавав значних змін та знаходився в межах 80 %. При цьому під час досліджень швидкості прикріплення клітин LLC до субстрату відбувалось інгібування від 15 до 25 % у порівнянні з контролем.

Також описано проведений експеримент впливу дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* на клітинний цикл клітин мікроглії та ендотелію аорти миші, що показав незначний ступінь інгібування фаз S та G2/M+S у обох ліній, проте у клітин нейроглії також інгібувалась фаза G2/M, тоді як у фазі G0/G1 у них та у клітин лінії МАЕС, у останніх разом із G2/M, відсоток клітин збільшувався.

Дослідження щодо антипроліферативної дії дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* представлені перебігом онкогенезу на двох тваринних моделях *in vivo*. При цьому, на моделі щурів показано достовірне інгібування росту пухлини, тоді як на моделі мишей, окрім інгібування росту пухлини, показане й майже повне інгібування метастазування, до 99,7 % у порівнянні з контролем.

Як зазначено у розділі 8, заключення, дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* впливає на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів вагітних жінок з ускладненнями під час гестації, знижуючи ступінь агрегації. Виявлено ефект пригнічення проліферації пухлинних клітин *in vitro* й *in vivo*, у культурі та на тваринних моделях. Такі біологічні агенти можуть бути

потенційною основою для створення як антитромботичних препаратів, так і стати частиною онкотерапій.

Для проведення досліджень Олег ПЛАТОНОВ використовував як сучасні методи, такі як MALDI-TOF мас-спектрометричний аналіз, молекулярні докінг й моделювання для побудови просторової структури, аналіз гомологій по результатах трипсинолізу, так і перевірені часом методи елетрофорезу у ПААГ, іонна хроматографія, МТТ тест *in vitro*. Варто також згадати й інші дослідження *in vitro*, наприклад непрямий імуноферментний аналіз ELISA та експерименти з пухлинними на непухлинними лініями клітин.

9. Запитання, зауваження та побажання до дисертаційної роботи.

1. У огляді літератури надміру уваги присвячено опису онкологічних моделей на тваринах. Було б доцільніше зосередитися на структурі і функціях дезінтегринів.

2. На жаль, повністю відсутні дослідження ефектів дезінтегринів на процеси внутрішньоклітинного сигналювання. Не задіяно такі експериментальні підходи, як протокова цитометрія та спектрофлуориметрія, знехтувано можливістю залучити до роботи методи конфокальної та лазерної мікроскопії. Крім того, було б доцільним перевірити антиагрегантну дію дезінтегрину/ів з використанням вже створених моделей індукованих у модельних тварин патологій за яких відбувається підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів.

3. Хотілось би почути відповідь на питання щодо можливого механізму протипухлинної дії дезінтегринів. Чи не розвивалася у тварин імунна реакція на введення протеїну?

4. Чи доцільно пропонувати для використання у клініці препарат, який слід вводити внутрішньовенно, якщо існують аналоги, придатні до перорального застосування?

5. Чим можна пояснити, що фракція дезінтегринів з отрути *Bitis arietans* не зв'язувалась з Q-Sepharose на відміну від таких з отрут *Calloselasma rhodostoma* та *Echis multisquamatus*, що навпаки ефективно зв'язувалися носієм і їхня елюція відбувалася навпаки за високої іонної сили.

6. Було показано, що дезінтегрин з отрути *Echis multisqamatis* знижував ступінь агрегації тромбоцитів в плазмі крові пацієнтки, яка приймала аспірин вдвічі. Однак для пацієнтки яка мала діагностовану нечутливість до аспірину чітко не зазначено наскільки суттєвим було таке зниження порівняно з пацієнтом з чутливістю до аспірину. а цікаво було б порівняти.

7. На електрофореграмах варто було б зазначати молекулярну масу протеїнових маркерів адже це суттєво полегшувало б сприйняття матеріалу.

10. Висновок. Вважаю, що дисертаційна робота Олега ПЛАТОНОВА «АНТИТРОМБОТИЧНА ТА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНА ДІЯ АНТАГОНІСТІВ ІНТЕГРИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ» за своєю актуальністю, науково-теоретичним рівнем, науковою новизною і практичним значенням повністю 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,
академік НАН України, завідувач
відділу сигнальних систем клітини
Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України

Валерій Філоненко

