

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Платонов Олег Максимович**

УДК 577.112.083; 577.151.45

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**АНТИТРОМБОТИЧНА ТА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНА ДІЯ  
АНТАГОНІСТІВ ІНТЕГРИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ О.М. Платонов

Науковий консультант: Комісаренко Сергій Васильович, доктор  
біологічних наук, професор, академік НАН України

Київ – 2025

## 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 змії.

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<sub>50</sub> = 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<sub>50</sub> 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* (IC<sub>50</sub> = 1.5 µM) 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 (IC<sub>50</sub> was 0.48 µM, 0.40 µM, 0.47 µM, 0.20 µM, 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;

Сачвенко 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.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	18
Розділ 1. Огляд літератури .....	23
1.1. Гемостаз .....	23
1.1.1. Тромбоцитарний гемостаз .....	24
1.1.2. Тромбоцити.....	25
1.2. Інтегрини, дезінтегрини та інтегрин-опосередковані взаємодії ...	29
1.2.1. Інтегрини.....	29
1.2.2. Дезінтегрини.....	34
1.3. Дезінтегрини у інтегрин-опосередкованих взаємодіях.....	38
1.3.1. Дія дезінтегринів на тромбоцити .....	38
1.3.2. Дія дезінтегринів на пухлинні клітини .....	39
1.4. Моделі канцерогенезу .....	43
Розділ 2. Матеріали та методи дослідження .....	59
2.1. Матеріали .....	59
2.1.1. Реактиви .....	59
2.1.2. Збагачена тромбоцитами плазма крові людини .....	59
2.1.3. Культури клітин .....	60
2.2. Створення моделей для дослідження процесу агрегації тромбоцитів за патологічних станів .....	61
2.2.1. Діабет.....	61
2.2.2. Атеросклероз .....	61
2.2.3. Канцерогенез .....	62
2.2.4. Токсичний гепатит .....	63
2.2.5. Жировий гепатоз .....	63

2.2.6. LPS-індуковане запалення .....	64
2.2.7. Гостре радіаційне ураження .....	64
2.2.8. SARS-CoV-2 .....	65
2.2.9. Утримання тварин та висновки біоетичних комісій .....	65
2.3. Методи.....	66
2.3.1. Іонообмінна хроматографія .....	66
2.3.2. Хроматографія розділення за розміром.....	66
2.3.3. Електрофорез протеїнів у ПААГ .....	67
2.3.4. Визначення концентрації протеїнів .....	67
2.3.5. Високоєфективна рідинна хроматографія.....	68
2.3.6. Мас-спектрометрія.....	68
2.3.7. Трипсиноліз .....	69
2.3.8. Амінокислотний аналіз .....	69
2.3.9. Моделювання просторової структури протеїну .....	69
2.3.10. ADP-індукована агрегація тромбоцитів .....	69
2.3.11. Непрямий імуноферментний аналіз.....	69
2.3.12. Оцінка життєздатності клітин .....	70
2.3.13. Визначення інтенсивності прикріплення клітин .....	70
2.3.14. Визначення клітинного циклу .....	71
2.3.15. Оцінка антипроліферативної дії на канцерогенез <i>in vivo</i> .....	71
2.3.16. Статистичний аналіз даних .....	73
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	74
Розділ 3. Дослідження агрегаційної здатності тромбоцитів за моделювання патологічних станів різного генезу .....	74
3.1. Діабет, викликаний ожирінням .....	75

	16
3.2. Атеросклероз .....	76
3.3. Канцерогенез .....	79
3.4. Гепатит .....	80
3.5. Гепатоз .....	82
3.6. LPS-індуковане запалення .....	83
3.7. Гострий радіаційний синдром .....	85
3.8. Інфікування SARS-CoV-2 .....	86
Розділ 4. Отримання і характеристика антагоністів інтегринових рецепторів з отрути змій.....	89
4.1 Отримання дезінтегринів .....	89
4.1.1. Хроматографічне фракціонування отрути <i>Bitis arietans</i> .....	89
4.1.2. Хроматографічне фракціонування отрути <i>Calloselasma rhodostoma</i> .....	92
4.1.3. Хроматографічне фракціонування отрути <i>Echis multisquamatus</i> .....	96
4.2. Характеристика дезінтегринів .....	99
4.2.1. Дія на тромбоцити.....	99
4.2.2. Високоефективна рідинна хроматографія та мас-спектрометричний аналіз дезінтегринів .....	103
Розділ 5. Ідентифікація дезінтегрину з отрути <i>Echis multisquamatus</i> ....	107
Розділ 6. Антиагрегантна дія дезінтегрину з отрути <i>Echis multisquamatus</i> .....	113
6.1. Антиагрегантна дія дезінтегрину з отрути <i>Echis multisqamatis ex vivo</i> .....	113
6.2. Антиагрегантна дія дезінтегрину з отрути <i>Echis multisqamatus</i> за умов внутрішньовенного введення щурам <i>in vivo</i> .....	116



Розділ 7. Антипроліферативна дія дезінтегрину з отрути <i>Echis multisquamatus</i> .....	119
7.1. Антипроліферативна дія на пухлинні клітини в культурі .....	119
7.2. Протипухлинна та антиметастатична дія дезінтегрину з отрути <i>Echis multisquamatus in vivo</i> .....	124
7.2.1. Протипухлинна дія <i>in vivo</i> .....	124
7.2.2. Антиметастатична дія <i>in vivo</i> .....	126
Розділ 8. Заключення .....	128
Висновки .....	131
Список використаних джерел .....	133
Додаток 1.....	158

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Інтегрини – основні клітинні рецептори, які відповідають за прикріплення клітин до субстрату, зокрема позаклітинного матриксу, та опосередковують клітино-клітинні взаємодії. Відповідно, їхня роль є визначальною для процесів, які залежать від здатності клітин здійснювати такі взаємодії. Зокрема йдеться про агрегацію тромбоцитів, яку опосередковано взаємодіями інтегринів з фібрин(оген)ом, а також про проліферацію, міграцію та адгезію пухлинних клітин. Ці процеси лежать у основі таких складних та небезпечних патологічних станів, як серцево-судинні захворювання, що пов'язано з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення, та онкологічні захворювання, при яких спостерігається прогресія пухлин та метастазування).

Під час загрози внутрішньосудинного тромбоутворення застосовують антикоагулянтні препарати, частина яких має спрямовану дію на процес агрегації тромбоцитів (антиагреганти). Найвідомішим та найбільш широко вживаним антиагрегантом є аспірин, однак близько 20 % населення мають вроджену аспіринорезистентність. Набір більш специфічних інгібіторів агрегації тромбоцитів постійно поповнюється, однак кожен з таких препаратів може мати недоліки, як от низька ефективність, неможливість достатньо ефективного контролю їхньої дії, висока вартість, тощо.

Основними побічними ефектами протипухлинних препаратів є токсичність, неселективність, проблема з доставкою сполуки до потрібного місця в організмі тощо. Протягом десятиліть безперестанно триває пошук, апробація та покращення потенційних ліків, які мали б змогу подолати онкологічні захворювання. Одне з найбільш актуальних питань, що постає на сьогоднішній день перед дослідниками, є набування пухлиною резистентності до терапії, що ускладнює ефективність лікування.

Актуальним і перспективним напрямом у розробці засобів регуляції процесів, пов'язаних з інтегриновими рецепторами, як у онкології, так і у

гемостазіології є дослідження дезінтегринів. Дезінтегрини, або антагоністи інтегринових рецепторів, – це невеликі цистеїнбагаті поліпептиди, здатні взаємодіяти з інтегриновими рецепторами, блокуючи їхню взаємодію з лігандами.

Блокуючи тромбоцитарні інтегринові рецептори фібриногену, 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 беруть участь у виживанні пухлинних клітин, їх рухливості, інвазії, ангіогенезі та інших процесах, необхідних для блокування виникнення, прогресування, інвазії, диференціювання та метастазування пухлинних клітин, дезінтегрини є основою для розробки нових терапевтичних засобів лікування онкологічних захворювань. Дезінтегрини можуть допомогти зменшити інвазивність пухлинних клітин, що дає змогу зробити пухлину менш агресивною і обмежити здатність до метастазування.

**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).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи є отримання та характеристика дезінтегринів з отрути змії 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 були поставлені такі завдання:

1. Провести аналіз стану тромбоцитарної ланки гемостазу на моделях патологій, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення *in vivo*.
2. Отримати та охарактеризувати дезінтегрини з отрути змій.
3. Дослідити дію отриманих дезінтегринів на агрегацію тромбоцитів людини та обрати серед них найбільш підходящий для створення препарату, спрямованого на інгібування взаємодій, опосередкованих інтегриновими рецепторами.
4. Провести ідентифікацію обраного дезінтегрину за допомогою мас-спектрометрії та біоінформатичних підходів.
5. Вивчити здатність обраного дезінтегрину інгібувати агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові умовно здорових донорів, жінок з ускладненою вагітністю, на фоні адміністрації гепарину та аспірину та в умовах аспіринорезистентності.
6. Перевірити антиагрегантну дію обраного дезінтегрину *in vivo* за умов введення його лабораторним тваринам.
7. Дослідити антипроліферативну дію обраного дезінтегрину на клітини ліній LLC, HeLa, MAEC та BV-2 в культурі.
8. Апробувати дію дезінтегрину на прогресію перевитих пухлинних клітин та на їх метастазування на моделях *in vivo*.

**Об'єкт дослідження.** Ефекти антагоністів інтегринових рецепторів на інтегрин-опосередковані взаємодії тромбоцитів та пухлинних клітин.

**Предмет дослідження.** Антагоністи інтегринових рецепторів (дезінтегрини).

**Методи дослідження.** У роботі було застосовано основні хроматографічні, електрофоретичні, мас-спектрометричні методи, підходи біоінформатики, методи культивування клітин, моделювання патологічних

станів на тваринах, цитометрію, тощо. Для очистки поліпептидів використовували іонообмінну та афінну хроматографію, хроматографію, що поділяє за розміром; для ідентифікації протеїнів – електрофорез в ПААГ, 2D-електрофорез, високоефективну рідинну хроматографію та мас-спектрометрію; для встановлення структури протеїну – трипсиноліз з наступним мас-спектрометричним аналізом, амінокислотний аналіз та молекулярне моделювання; стан тромбоцитів оцінювали шляхом агрегатометрії; життєздатність клітин у культурі визначали за допомогою МТТ-тесту, особливості їхнього росту вивчали за допомогою цитометрії та тесту на прикріплення; моделювали канцерогенез у тварин шляхом перевивання їм пухлинних клітин.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Доведено, що інгібування інтегрин-опосередкованих взаємодій антагоністами інтегринових рецепторів порушує гомеостаз пухлинних клітин, зменшує їхню виживаність та здатність до адгезії, а за умов *in vivo* – запобігає прогресії пухлини та метастазуванню.

**Практичне значення одержаних результатів.** Запропоновано дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* як основу для створення препаратів, що матимуть антиагрегантну дію та ефективно знижуватимуть метастазування пухлин за рахунок блокування інтегрин-опосередкованої адгезії.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем самостійно проаналізовано дані літератури за темою дисертації, виконано основний обсяг експериментальних досліджень, проведено статистичний аналіз одержаних результатів. Здобувач самостійно проводив очистку та характеристику поліпептидів, визначення ступеню та швидкості агрегації тромбоцитів у зразках плазми крові експериментальних тварин та людини, культивування клітин, МТТ-тест та інші основні аспекти роботи. Мету, завдання і план роботи здобувачем сформульовано разом з науковим керівником академіком НАН України С.В. Комісаренком.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертації було повідомлено та обговорено на вітчизняних та міжнародних конференціях:

«Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2021» – Київ, 26 травня 2021. Conference: 26th congress of the ISFP&PA and Fibrinolysis workshop of the Hungarian Society of Thrombosis and Haemostasis At: Budapest, 11-14 October, 2023. «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2023» – Київ, 26 травня 2023.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 14 робіт, з них 10 статей в іноземних фахових наукових виданнях, представлених у базах Scopus, та 4 тез доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конференціях

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

## Розділ 1. Огляд літератури

### 1.1. Гемостаз

Гемостаз – це один із найважливіших фізіологічних процесів, що забезпечує, з одного боку, збереження рідкого стану крові, а з іншого боку – зупинку кровотечі і запобігання крововтраті. Компоненти органів і тканин, які беруть участь у виконання цих функцій, утворюють систему гемостазу – біологічну систему, яка, за необхідності, здійснює швидку зупинку кровотечі, зберігаючи достатній об'єм циркулюючої крові, тим самим забезпечуючи нормальне кровопостачання органів.

Система гемостазу –динамічна система, яка інтегрує складні біохімічні й клітинні процеси для підтримання балансу між рідким станом крові, запобіганням крововтраті та захистом від тромбоутворення [1]. Уявіть собі тонкий баланс: з одного боку, необхідно швидко й ефективно зупинити кровотечу при пошкодженні судини, а з іншого — уникнути утворення тромбів, які можуть перешкоджати нормальній циркуляції крові. За рахунок компенсаторної взаємодії система гемостазу підтримує рідкий стан крові, тоді як при пошкодженні судин кров швидко згортається, зупиняючи кровотечу. На молекулярному рівні це є прикладом динамічної рівноваги між про- та антикоагулянтними ланками системи гемостазу: як про-, так і антикоагулянти взаємодіють для підтримання нормального гемостазу. Така рівновага забезпечується взаємодією судинно-тромбоцитарної і коагуляційної ланок. В реалізації тромбоцитарного гемостазу головна роль належить судинній стінці та тромбоцитам, а в коагуляційному гемостазі – насамперед системі зсідання крові. Обидва процеси регулюються і контролюються антикоагулянтними механізмами та фібринолітичною системою. Кожен із цих процесів відіграє свою унікальну роль, утворюючи багаторівневу захисну систему [2].

Система гемостазу є надзвичайно чутливою, і навіть найменші порушення в її функціонуванні можуть мати серйозні наслідки. Так, порушення балансу коагуляційного каскаду може призвести до тромбозу, який

призводить до ішемії тканин або тромбоемболії. З іншого боку, недостатність факторів зсідання крові або порушення функції тромбоцитів спричиняють схильність до кровотеч [3]. Яскравими прикладами таких порушень є гемофілія або хвороба Віллебранда [4]. Діагностика стану системи гемостазу має важливе значення у клінічній практиці. Знання механізмів цього процесу дозволяє лікарям призначати пацієнтам відповідну терапію [5]. Використання антикоагулянтів, тромболітиків чи прокоагулянтів, наприклад, під час складних операцій базується на детальному розумінні механізмів коагуляційного процесу [6].

### **1.1.1. Тромбоцитарний гемостаз**

Судинно-тромбоцитарний, або первинний, гемостаз є результатом складних взаємодій між тромбоцитами, стінкою судини та адгезивними протеїнами, що призводить до утворення «тромбоцитарної пробки», або тромбоцитарного тромбу. Процес поділяють на 3 стадії: 1) тимчасовий спазм судин; 2) утворення тромбоцитарного тромбу за рахунок адгезії та агрегації тромбоцитів; 3) ретракція тромбоцитарного тромбу. У відповідь на ушкодження ендотелію гладенькі м'язи стінок судин скорочуються, зменшуючи приток крові до ушкодженої ділянки. Водночас в зоні пошкодження відбувається адгезія циркулюючих тромбоцитів до колагену та інших протеїнів субендотелію. Тромбоцити прилипають безпосередньо до колагенових волокон за участі колагенових рецепторів – глікопротеїнів. Із гранул тромбоцитів, що адгезують, як і з ендотелію, вивільнюються фактори (АДФ, фактор фон Віллебранда, тромбоспондин, вітронектин, ін.), які беруть участь у адгезії і сприяють залученню інших тромбоцитів. Під дією АДФ тромбоцити утворюють агрегати, які є основою первинного тромбоцитарного тромбу. На цьому етапі запускається позитивний зворотний зв'язок, який забезпечує швидку реакцію на пошкодження [7].

Після утворення тромбоцитарного тромбу відбувається його стабілізація – ущільнення і закріплення в місці пошкодження для опору тиску кровотока і



попередження повторної кровотечі. Пробка стабілізується за рахунок вивільнення вмісту гранул, експресії молекул адгезії на поверхні тромбоцитів і активації сигнальних шляхів. Утворений до цього часу тромбін перетворює фібриноген на фібрин, волокна якого утворюють сітку, що стабілізує тромбоцитарну пробку і створює міцний тромб, який закриває місце ушкодження [8, 9].

Після стабілізації тромбу запускається процес ретракції – стискання тромбу під дією тромбостеніну тромбоцитів за рахунок скорочення їх актин-міозинового комплексу. Це дозволяє зменшити розмір згустку і ущільнити його, що сприяє зменшенню кровотоку через ушкоджену ділянку [10, 11]. Крім того, для підтримання динамічної рівноваги необхідно, щоб тромб, після виконання його функції, було вчасно видалено. Це завдання виконує система фібринолізу, під дією компонентів якої відбувається розщеплення та елімінація фібринового тромбу, що забезпечує відновлення нормального кровотоку [12].

Таким чином, тромбоцитарний, або первинний, гемостаз реалізується активністю тромбоцитів і різних коагуляційних факторів, які зв'язуються з тромбоцитами і допомагають іммобілізувати їх в місцях ушкодження тканин, що стимулює утворення тромбоцитарного тромбу, необхідного для закриття ушкодження і запобігання надмірній крововтраті [13].

### **1.1.2. Тромбоцити**

Тромбоцити – це найменші з трьох основних типів клітин крові. Це – без'ядерні клітини крові розміром 1-4 мкм (20 % від діаметра еритроцитів) і товщиною 0,5-0,75 мкм. Це складні клітини, які містять три різні типи гранул:  $\alpha$ -гранули, щільні або  $\delta$ -гранули та лізосоми, компоненти яких необхідні для нормального функціонування тромбоцитів і для участі в коагуляційному процесі. Тромбоцити беруть активну участь в процесі згортання крові: при пошкодженні стінки судини відбувається адгезія тромбоцитів до поверхні

субендотелію. Процес адгезії опосередковано рецепторами тромбоцитів або ендотеліальних клітин і адгезивними протеїнами, такими як фактор фон Віллебранда, колаген і фібриноген. Наступна активація тромбоцитів призводить до залучення додаткових тромбоцитів і утворення тромбоцитарних агрегатів – основи тромбоцитарної пробки. Крім того, активовані тромбоцити створюють міцний зв'язок між первинним і вторинним гемостазом, оскільки забезпечують фосфоліпідну поверхню для збирання ферментативних активаторних комплексів, необхідних для генерації тромбіну [14].

На початковому етапі коагуляційного каскаду відбувається адгезія тромбоцитів у місці пошкодження ендотелію судин. У нормі клітини ендотелію щільно прилягають одна до одної і слабо взаємодіють з клітинами, що циркулюють в крові. Неперервний шар ендотелію слугує бар'єром між тромбоцитами, що циркулюють, і субендотеліальним матриксом. При пошкодженні бар'єрна функція ендотелію порушується, і на його поверхні експонуються протеїни, які включаються в процес зсідання крові. Поверхня мембрани пошкодженого ендотелію набуває позитивного заряду, тому до неї прилипають тромбоцити, зовню поверхню яких заряджено негативно. Тромбоцити переміщуються як на пошкоджену поверхню ендотелію, так і на поверхню судини. Процес адгезії забезпечується клітинними рецепторами, які є мембранними глікопротеїнами, і розташовані вони на поверхні клітин. В мембрані тромбоцитів знаходяться специфічні рецептори, які миттєво зв'язуються з відповідними лігандами у екстрацелюлярному матриксі. Для взаємодії ліганд-тромбоцитарний рецептор необхідний фактор фон Віллебранда, який під час адгезії тромбоцитів зв'язується з GPIIb-рецепторами їхньої мембрани [15].

При порушенні цілісності судин тромбоцити стають доступними для компонентів екстрацелюлярного матрикса. Взаємодія тромбоцитів з цими протеїнами може бути прямою і опосередкованою, але принципово важливе значення має колаген.

Перший етап взаємодії тромбоцитів з субендотелієм відбувається за допомогою рецептора колагену – GPIb-IX-V, що опосередковують рух і прилипання тромбоцитів біля місця пошкодження судини. Фактор фон Віллебранда виконує роль «біологічного клею», прикріплюючи до колагену субендотелію адгезовані тромбоцити через глікопротеїновий комплекс GPIb-V-IX. Тромб збільшується у розмірі по мірі адгезії та агрегації нових тромбоцитів, скупчення яких в агрегат забезпечує взаємодія фібриногену з GPIIb-IIIa.

Стабілізація адгезії тромбоцитів відбувається за участі рецепторів колагену, фібронектину і ламініну. Зв'язування тромбоцитарних рецепторів колагену  $\alpha 2\beta 1$  і GPVI з колагеном викликає активацію адгезованих тромбоцитів. Активація тромбоцитів – складний процес, який регулюється а) змінами в метаболічних і біохімічних механізмах, б) зміною форми тромбоцитів, в) активацією тромбоцитарних рецепторів, г) змінами в орієнтації мембранних фосфоліпідів.

Активацію тромбоцитів викликають колаген і ряд розчинних агоністів (АДФ, тромбін, тромбоксан A2), взаємодіючи зі специфічними мембранними рецепторами. Ці рецептори зв'язані з G-протеїнами, які підсилюють активацію тромбоцитів.

В процесі активації з щільних гранул тромбоцитів вивільнюється АДФ, а з  $\alpha$ -гранул – фібриноген, фактор V і Р-селектин. Всі ці протеїни мають на тромбоцитарній плазматичній мембрані специфічні рецептори. АДФ діє на тромбоцити за допомогою рецепторів P2Y1 і P2Y12, тоді як тромбоксан A2 активує на поверхні тромбоцитів тромбоксан-простаноїдний рецептор. Тромбін активує тромбоцити за допомогою взаємодії рецепторів родини PAR-1 і PAR-4. Тромбоцити, що взаємодіють з цими посередниками, підлягають реорганізації актинового цитоскелету, внаслідок чого змінюють форму. З'являються псевдоподії, які формують комірчасту сітку тромбоцитів в тромбоцитарному тромбі [16].

Взаємодія тромбоцитів з колагеном, фактором фон Віллебранда, АДФ, тромбоксаном A2 і тромбіном викликає внутрішньоклітинні сигнали, що ініціюють активацію рецептора фібриногену – інтегрини GPIIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3), внаслідок чого він зв'язується з фібриногеном. Утворюється поперечно зшиті агрегати, накопичення яких у місцях пошкодження судини призводить до зупинки кровотечі. Таким чином, активація тромбоцитів є продуктом сигналіngu різних рецепторів, кожний з яких вносить вклад в формування тромбоцитарного тромбу.

Агрегацію тромбоцитів визначають як процес взаємозв'язку між двома тромбоцитами. Після адгезії дископодібна форма тромбоцитів змінюється на сферичну, відбувається вивільнення вмісту тромбоцитарних гранул. В результаті їх потрапляння до кровотоку здійснюється механізм позитивного зворотнього зв'язку, що проявляється у посиленні першочергової агрегації тромбоцитів з одночасним залученням в процес агрегації сусідніх неактивованих клітин [17]. За фізіологічних умов тромбоцити не агрегують між собою і не прикріплюються до судинних стінок через те, що остання постійно генерує простациклін, який є потужним антитромбоцитарним агентом [18].

Виділяють первинну і вторинну фази агрегації. Первинна – оборотна агрегація – під впливом АДФ тромбоцити утворюють пухкий тромбоцитарний агрегат, що проникний для компонентів плазми крові. Тромбоцити з'єднуються один з одним фібриногеновими містками [19]. Вторинна фаза – необоротна агрегація. В даному випадку тромбін, що до цього утворився, діє на рецептори тромбоцитів і призводить до злиття тромбоцитів в суцільну масу. Новоутворений тромбоцитарний тромб є непроникним для компонентів плазми крові. Для нормальної агрегації тромбоцитів необхідні три умови: підвищена вірогідність контакту між двома тромбоцитами, наявність іонів кальцію і фібриногену. У випадку порушення однієї з умов, агрегація тромбоцитів не відбувається [20]. У випадку переродження судини агрегація тромбоцитів є дуже суттєвою для формування тромбоцитарного тромбу і для

тромбу біля місця розриву атеросклеротичної бляшки. Взаємодія між зв'язаним з матриксом фактором фон Віллебранда і GPIIb, в першу чергу, слугує для скупчення тромбоцитів на площі пошкодження і, частково, є передумовою для утримання інтегрин-опосередкованої клітини [21].

В цілому традиційна модель агрегації тромбоцитів виглядає таким чином: активація тромбоцитів викликає активацію тромбоцитарного рецептора фібриногену – інтегрину GPIIbIIIa, зв'язування з яким фібриногену стабілізує процес агрегації. Зв'язування фактора фон Віллебранда з GPIb-V-IX викликає активацію тромбоцитів незалежно від індуктора. У той час як взаємодія фактор фон Віллебранда-GPIIb необхідна для ініціації взаємодії тромбоцит-тромбоцит, незворотна агрегація тромбоцитів вимагає вторинної адгезії між фактором фон Віллебранда та GPIIbIIIa, який відіграє в агрегації тромбоцитів основну роль. Центри зв'язування фібриногену з рецепторами експонуються лише після активації тромбоцитів; процес зв'язування залежить від іонів кальцію. Невеликі агрегати тромбоцитів формуються за допомогою фібриногенових містків між двома сусідніми тромбоцитами, а також за участю тромбоспондину. Останній вступає в дію у другій фазі агрегації, посилюючи міжклітинну взаємодію та перетворюючи оборотні мікро- та макроагрегати на необоротні структури.

## **1.2. Інтегрини, дезінтегрини та інтегрин-опосередковані взаємодії**

### **1.2.1. Інтегрини**

Інтегрини – інтегральні мембранні протеїнові комплекси – є класом гетеродимерних трансмембранних клітинних рецепторів, які забезпечують взаємодію клітин між собою, з позаклітинним матриксом і здійснюють передачу зовнішніх та внутрішніх механохімічних міжклітинних сигналів [22]. Свою назву ця група рецепторів отримала у зв'язку з їх участю в об'єднанні (інтеграції) внутрішньоклітинного цитоскелету з позаклітинним

матриксом. Позаклітинні двовалентні катіони, такі як  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ , можуть впливати на специфічність та спорідненість інтегринів при зв'язуванні з їх лігандами [23].

Позаклітинний домен  $\alpha$ -субодиниці складається з глобулярної головної частини та хвостової частини. Перший складається з  $\alpha\text{I}$  ділянки,  $\beta$  - пропелера та ніжкового домену. Нижній домен хвостової частини складається з ділянок calf-1 і calf-2. Розширюючи проміжок між  $\beta$ -пропелером та  $\alpha\text{I}$  доменом, LFA-1 може взаємодіяти з більшими лігандами. Вершина  $\alpha\text{I}$  домену містить іон-залежний сайт адгезії (MIDAS), завдяки якому двовалентні катіони ( $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Mg}^{2+}$ ) приєднується до узгоджених залишків глутамінової кислоти ICAM-1, що є необхідним для конформаційних змін і, таким чином, активації інтегрину [24].

Структурно інтегринові рецептори є нековалентно зв'язаними гетеродимерами, які складаються з двох типів субодиниць –  $\alpha$  і  $\beta$ . Альфа-субодиниці визначають специфічність інтегрину до ліганду, а  $\beta$ -субодиниці пов'язані з компонентами цитоскелету і забезпечують передачу сигналу в клітині. У ссавців відомо 19  $\alpha$ - і 8  $\beta$ -субодиниць. У людини описано 18  $\alpha$ - і 8  $\beta$ -субодиниць, при цьому кожна  $\alpha$ -субодиниця утворює комплекс тільки з певним набором  $\beta$ -субодиниць, що на даний момент складає 24 гетеродимерні варіанти з різними типами зв'язування та різним розподілом у тканинах. Кожна субодиниця має одну спіраль, що охоплює мембрану, і, як правило, короткий неструктурований цитоплазматичний хвіст. Розмір змінюється, але зазвичай  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниці містять близько 1000 і 750 амінокислот відповідно. Класифікують інтегрини на основі  $\beta$ -субодиниці, яка з'єднана з цитоскелетом і передає зовнішні та внутрішні сигнали і яка разом з  $\alpha$ -субодиницею утворює функціональний рецептор. Як  $\alpha$ -, так і  $\beta$ -субодиниці містять великі N-кінцеві екстрацелюлярні домени, невеликий трансмембранний домен і C кінцеву ділянку.  $\beta$ -Субодиниця має 4 цистеїнбагаті послідовності, які в різних формах зберігаються у всіх 8 субодиницях. Цитоплазматичний хвіст утримує інтегрин в цитоселеті і регулює його функції.  $\alpha$ -Субодиниця містить 3-4 ділянки зв'язування з двовалентними катіонами [25, 26, 27].

Багато інтегринів зв'язується з позаклітинним матриксом, внаслідок чого опосередковують взаємодію клітина-позаклітинний матрикс. Деякі інтегрини зв'язують з клітинною мембраною протеїни, що беруть участь у взаємодії клітина-клітина. За лігандною специфічністю інтегрини зазвичай класифікують як колаген-зв'язуючі ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  та  $\alpha 11\beta 1$ ), RGD-специфічні інтегрини ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$  та  $\alpha IIb\beta 3$ ), ламінін-зв'язуючі інтегрини ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  та  $\alpha 6\beta 4$ ) та лейкоцитарні інтегрини ( $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$  та  $\alpha D\beta 2$ ) [28]. Субодинаця  $\beta 2$  інтегрину (CD18) може з'єднуватися з однією з чотирьох  $\alpha$ -субодиниць ( $\alpha L$ -CD11a,  $\alpha M$ -CD11b,  $\alpha X$ -CD11c і  $\alpha D$ -CD11d), утворюючи лейкоцитарний функціонально-асоційований антиген-1, Mac1/CR3 (антиген макрофагів-1, рецептор комплементу 3), 150.95/CR4 (рецептор комплементу 4) і CD18/CD11d відповідно. CD11a/CD18 експресується переважно на всіх лейкоцитах, тоді як CD11b/CD18, CD11c/CD18 і CD11d/CD18 експресуються на міелоїдних клітинах. Інтегрин  $\alpha M\beta 2$  (також відомий як CR3, CD11b/CD18 або Mac-1) міститься на фагоцитарних клітинах і бере участь в адгезії лейкоцитів до ендотелію та опсонізації мікробів. Лігандами для CR3 є компонент комплементу iC3b, молекула міжклітинної адгезії (ICAM-1) та фактори коагуляції, такі як фібриноген і фактор X [29].

Характерним прикладом чітко вираженої специфічності для певного типу клітин є тромбоцитарний інтегрин GPIIb/IIIa, який сприяє взаємодії тромбоцитів один з одним. Основними лігандами для цього інтегрину в процесі агрегації тромбоцитів є фібриноген і фактор фон Віллебранда, однак він може зв'язуватись також з фібро нектином і вітронектином, що є важливим для адгезії активованих тромбоцитів до субендотелію [30, 31].

При алоїмунній тромбоцитопенії часто спостерігаються аутоантитіла до інтегрину  $\beta 3$  та GPIIb/IIIa [32]. Внутрішньочерепні крововиливи можуть спостерігатися частіше у немовлят з антитілами до інтегрину  $\beta 3$ , ніж у тих, хто має антитіла до GPIIb/IIIa [33]. Існуючі дані *in vitro* та *in vivo* свідчать про те, що  $\beta 3$  інтегрин може зв'язувати ширший спектр лігандів, включаючи фібриноген

та фактор фон Віллебранда, а аутоантитіла, які блокують його функцію, можуть викликати глибший функціональний дефіцит, ніж анти-GPIIb/IIIa антитіла [34].

Завдяки своєму різноманіттю інтегрини беруть участь не тільки в процесах адгезії та агрегації клітин і у диференціації тканин, але також опосередковують широкий спектр клітинних ефектів, що призводить до прогресування пухлини та метастазування. Інтегрини, що експресуються в пухлинних клітинах, сприяють прогресуванню та метастазуванню останніх шляхом збільшення міграції пухлинних клітин, інвазії, проліферації та виживання.

Оскільки багато злоякісних пухлин походять з епітеліальних клітин, інтегрини, що експресуються останніми (включаючи  $\alpha\beta4$ ,  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha2\beta1$  і  $\alpha3\beta1$ ), опосередковують клітинну адгезію до базальної мембрани і тим самим забезпечують умови, сприятливі для інвазії пухлинних клітин. Інтегрини також сприяють інвазії пухлинних клітин, регулюючи локалізацію та активність протеїназ, що руйнують матрицю, таких як матрична металопротеаза 2 (MMP2) і активатор плазміногену урокіназного типу (uPA).

Експресія інтегринів нормальною та пухлинною клітиною може значно відрізнятись. Зокрема, інтегрини  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha5\beta1$  та  $\alpha\nu\beta6$  зазвичай експресуються на низькому або невизначеному рівні у більшості епітеліальних клітин дорослої людини, але в деяких пухлинах їхня експресія може бути сильно підвищена. Рівень експресії інтегринів, таких як  $\alpha2\beta1$ , в пухлинних клітинах знижується, що потенційно збільшує їх дисемінацію. Фактично, повторна експресія  $\alpha2\beta1$  в клітинах раку молочної залози змінила деякі злоякісні властивості цих клітин, що свідчить про функціонування  $\alpha2\beta1$  як супресора пухлини. Експресія інтегринів  $\alpha\nu\beta3$ ,  $\alpha\nu\beta5$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha\beta4$ ,  $\alpha4\beta1$  та  $\alpha\nu\beta6$  різними типами пухлинних клітин корелює з прогресуванням захворювання, тому ці інтегрини є найбільш вивченими в онкології [35].

Інтегрини вважалися привабливими фармакологічними мішенями для препаратів, спрямованих на пригнічення кількох ключових процесів у



прогресуванні раку, таких як проліферація, виживання та міграція клітин. Недавні дослідження показали, що певні рецептори факторів росту та онкогени вимагають специфічних інтегринів для їх впливу на пухлиноутворення та метастазування. Це свідчить про вірогідність адаптувати використання антагоністів інтегрину в тих випадках, коли пухлини реагують на певні фактори росту або онкогени. Альтернативно, склад екстрацелюлярного матриксу мікрооточення пухлини може відігравати важливу роль у визначенні чутливості пухлини до антагоністів інтегрину. Це може частково пояснити клінічну реакцію пацієнтів з гліобластою, які отримували ціленгітид [попередня, Черешня 10 канкер зараз 32].

Однак, незважаючи на початкові обнадійливі результати доклінічних досліджень, моноклональні антитіла, пептиди-антагоністи та малі молекули, що використовуються як інгібітори функцій інтегринів, в основному виявилися невдалими в клінічних випробуваннях, і до цього часу жоден з них не був визнаний ефективним протираковим препаратом.

Новим і багатообіцяючим підходом є націлювання на інтегрини для покращення доставки протипухлинних препаратів або для візуалізації ракових уражень. Циклічні наноносії на основі RGD у поєднанні з протираковими агентами успішно використовують для націлювання на  $\alpha v \beta 3$ -інтегрини, які надмірно експресують ангіогенні ендотеліальні або ракові клітини [36]. Ці носії, інтерналізуючись через рецептор-опосередкований ендцитоз, забезпечують ефективну внутрішньоклітинну доставку ліків, а їх ефективність ще більше підвищується при використанні для подвійного направленого впливу.

Одночасна доставка пептидів, спрямованих проти  $\alpha v \beta 3$  інтегрину та Р-селектину або CD44, продемонструвала підвищену антиангіогенну та протиракову ефективність у порівнянні зі стратегіями одиночного таргетування [37, 38]. Цікаво, що  $\alpha v \beta 6$ -інтегрин-специфічний пептид був з'єднаний з фотосенсибілізатором і використаний для підвищення ефективності фотодинамічної терапії в легеневій моделі миші. Локальна

активація сполуки світловим опроміненням індукує продукцію активних форм кисню, некротичну загибель ракових клітин та відповідь, опосередковану дендритними клітинами та CD8<sup>+</sup> Т-клітинами [39].

### 1.2.2. Дезінтегрини

Пошуки селективних біологічних протеїнів, пептидів та агентів, яких можна взяти за основу для рекомбінантного або синтетичного відтворювального препарату завжди було актуальним питанням. Одним з таких пептидів став дезінтегрин, який було представлено у 1987 як неферментний низькомолекулярний протеїн, що інгібує агрегацію тромбоцитів шляхом конкурентного блокування зв'язування фібриногену з АДФ-індукованими тромбоцитами [40].

Дезінтегрини зміїної отрути (SVD) – це родина високогомологічних, неензиматичних багатих на цистеїн компонентів отрути змій родин *Viperidae*, *Crotalidae*, *Atractaspididae*, *Elapidae*, *Colubridae*. Дезінтегрини є поліпептидами, отриманими в результаті протеолітичного процесингу попередників металопротеїназ зміїної отрути (SVMP), які, у свою чергу, еволюціонували з гена, що кодує молекулу дезінтегрину та металопротеїнази. У структурі дезінтегринів є послідовність аргінін-гліцин-аспарагінова кислота (RGD), яка необхідна для розпізнавання інтегрину. Мотив RGD також присутній у структурі протеїнів, які беруть участь у клітинній адгезії – фібриногену, фібронектину, фактору фон Віллебранда та колагену. Тому дезінтегрини можуть конкурентно пригнічувати взаємодії інтегрин-ліганд: вони блокують зв'язування фібриногену з його тромбоцитарним рецептором – GPIIb/IIIa і є потужними інгібіторами агрегації тромбоцитів. Дезінтегрини в 2000 разів ефективніші, ніж короткі синтетичні лінійні пептиди, що містять RGD, у блокуванні фібриноген-залежної агрегації тромбоцитів. Ймовірно, амінокислоти, що оточують послідовність RGD і внутрішньоланцюгові дисульфідні містки, приводять послідовність RGD у відповідну конформацію, що пояснює високу, але змінну, інгібіторну активність дезінтегрину.

Дезінтегрини блокують адгезивні функції RGD-залежних інтегринів, присутніх на різних типах клітин у різних тканинах: з цієї причини вони не є GPIIb/IIIa-специфічними.

Дезінтегрини класифікують структурно або функціонально відповідно відповідно до мотиву розпізнавання, здатного специфічно зв'язуватися з інтегринами. Структурна класифікація дезінтегринів базується на доменній організації металопротеїнази (SVMP), від якої вони походять. Існує три основні класи SVMP (P-I, P-II та P-III), які відрізняються наявністю/відсутністю трьох окремих доменів: всі SVMP містять металопротеїназний домен; SVMP класу P-III додатково володіють як дезінтегрин-подібними, так і цистеїнбагатими доменами; протеїни класу P-II позбавлені цистеїнбагатого домену, але мають дезінтегрин-подібний домен; а SVMP класу P-I володіють лише металопротеїназним доменом [41].

Класи P-II і P-III можна розділити відповідно до протеолітичного процесингу їхніх доменів і їхньої здатності утворювати димерні структури. Мономерні дезінтегрини відомі як RGD-залежні дезінтегрини розміром приблизно 5-15 кДа. Цей клас дезінтегринів досить поширений у зміїній отруті і відіграє вирішальну роль у взаємодії з інтегринами на поверхні клітини. При протеолізі SVMP класу P-II залишається тільки дезінтегриноподібний домен. Протеоліз SVMP класу P-III призводить до утворення фрагментів, які ковалентно з'єднують дезінтегринподібний та цистеїновий домен і називаються ECD-дезінтегриноподібними/цистеїновими доменами.

Приблизно через десять років після відкриття було ідентифіковано дезінтегрини, що містять мотиви KGD, WGD, VGD, MGD, RTS, KTS. Це дезінтегрини, яких багато в отруті гадюк і які містять послідовність MLD (Met-Leu-Asp), K/RTS (Lys/Arg-Thr-Ser) та ін. на відкритій поверхні петлі, що специфічно зв'язується з інтегринами на поверхні різних типів клітин [42, 43].

За кількістю залишків і дисульфідних містків дезінтегрини поділяють на чотири підродини: менші – короткі дезінтегрини, що складаються з 49-51 залишку і чотирьох дисульфідних містків; середні – близько 70 залишків і

шести містків; найбільші – довгі дезінтегрини, що складаються з 84 залишків, зшитих сімома дисульфідними містками; а також гомо- і гетеродимерні дезінтегрини. Димерні дезінтегрини містять субодиниці з приблизно 67 залишків, зшитих 2 міжланцюговими цистеїновими зв'язками та 4 внутрішньоланцюговими дисульфідними зв'язками. Еволюційний шлях диверсифікації структури дезінтегрину включав скорочення поліпептидного ланцюга та вибірккову втрату пар цистеїнових залишків, що утворюють дисульфідні зв'язки [44].

Функціональна класифікація дезінтегринів залежить від їхньої здатності взаємодіяти зі специфічними інтегринами. Розпізнавання інтегринів опосередковано специфічною сполучною петлею кожного дезінтегрину. Крім того, трипептидний мотив, конформація його петлі та С-кінцева амінокислотна послідовність дезінтегрину впливають на зв'язування та селективність інтегрину. С-кінцева область дезінтегринів та гнучкість RGD (розташованої на вершині петлі) можуть бути необхідними для розпізнавання  $\beta$ -субодиниці інтегрину. Ці дві частини взаємно впливають на їхню конформації, що є вирішальним для модуляції селективності дезінтегринів до різних інтегринів.

Ідентифіковано три функціональні класи, що містять RGD, MLD або R/KTS мотиви [45]. RGD-дезінтегрини становлять найбільшу і найбільш досліджену родину дезінтегринів, які інгібують фізіологічні функції інтегринів  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha \nu \beta 1$ ,  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  і  $\alpha \nu \beta 5$ . Більшість ідентифікованих RGD-дезінтегринів є мономерними, хоча є деякі субодиниці RGD, що належать до димерів, і в цих випадках друга субодиниця може містити інший мотив [46].

З іншого боку, мотив MLD зустрічається лише в гетеродимерних дезінтегринах і опосередковує зв'язування з інтегринами  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  та  $\alpha 4\beta 7$ . KTS або RTS мотиви в активному центрі, в свою чергу, селективно спрямовують активність дезінтегринів до колагенового рецептора  $\alpha 1\beta 1$  інтегрину. Структурно R/KTS-дезінтегрини є

короткими мономерними молекулами, що містять приблизно 41 амінокислоту в поліпептидному ланцюзі. Вони нетоксичні в терапевтичних дозах. RGD-дезінтегрини є найбільш дослідженими, і ці дослідження призвели до розробки та синтезу нових фармацевтичних сполук – ептифібатиду та тирофібану, які нині залучено для терапії гострого коронарного ішемічного синдрому. MLD-та KTS-дизінтегрини специфічні для лейкоцитарних інтегринів та колагенових рецепторів відповідно і можуть бути цікавими для нових галузей фармацевтичних досліджень [47].

Серед своїх унікальних властивостей дезінтегрини зміїної отрути можуть пригнічувати агрегацію тромбоцитів шляхом запобігання взаємодії GPIIb/IIIa з фібриногеном, потенційно порушуючи процес згортання крові. На основі дезінтегринів зі зміїної отрути було створено два важливих антитромбоцитарних препарати, і вони є на ринку зараз. Згодом, крім їх дії на рецептори тромбоцитів, було визначено та охарактеризовано вплив різних дезінтегринів на інші клітини. Виявлено різні біологічні функції дезінтегринів, включаючи вплив на хемотаксис нейтрофілів людини до сайтів запалення та пошкодження тканин, антипаразитарну активність, антивірусну та протипухлинну дію через індукцію апоптозу і цитотоксичності, а також інгібування етапів розвитку та прогресування пухлини. Крім того, дезінтегрини зміїної отрути продемонстрували протиракові властивості, націлюючись на інтегрини, які надмірно експресуються в конкретних ракових клітинах, і блокуючи опосередковані інтегрином сигнальні шляхи. Ці дезінтегрини також можуть пригнічувати ріст пухлини та метастазування [48].

Дослідження дезінтегринів актуальні для розуміння біології токсинів отрути гадюки, але також надають інформацію про нові структурні детермінанти, залучені до розпізнавання інтегринів, які можуть бути корисними як у фундаментальних, так і в клінічних дослідженнях.

### 1.3. Дезінтегрини у інтегрин-опосередкованих взаємодіях

#### 1.3.1. Дія дезінтегринів на тромбоцити

Білкові компоненти зміїної отрути за дією на агрегацію тромбоцитів можна розділити на дві групи –індуктори (активатори) та інгібітори. Останні являють собою дезінтегрини, що діють як антагоністи тромбоцитарного рецептора фібриногену – глікопротеїна ІІbІІІa. Дезінтегрини блокують GРІІbІІІa, заважаючи зв'язуванню з ним фібриногену, і тим самим викликають інгібування агрегації тромбоцитів.

За здатність інгібувати агрегацію тромбоцитів відповідає RGD-мотив дезінтегринів, з яким зв'язується інтегрин. Для застосування дезінтегринів у фармакологічних дослідженнях та діагностуванні хвороб спеціально блокують RGD – залежні інтегрини. RGD дезінтегрини застосовують в лабораторних дослідженнях *in vivo* та *in vitro*, а також демонструють ефективність інгібування інтегринів при тромбоемболічних захворюваннях.

На світовому ринку вже присутні препарати на основі дезінтегринів. Тирофібан (Aggrastat) – це непептидна молекула, яка була розроблена на основі мотиву RGD, присутнього в оригінальній молекулі дезінтегрину, ехістатину. Цей дезінтегрин містить RGD-послідовність у формі зовнішньої петлі, яка зв'язується з інтегринами  $\alpha$ ІІb $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 5 та  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 з дуже високою афінністю в низькому наномолярному діапазоні при наступних значеннях IC50:  $\alpha$ v $\beta$ 3 (0,46 нМ),  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (0,57 нМ) та  $\alpha$ ІІb $\beta$ 3 (0,9 нМ)]. Шляхом оптимізації RGD-мотиву лідуючого пептиду було розроблено пептидоміметик з 3000-кратним збільшенням потенціалу інгібування агрегації тромбоцитів зі збереженням селективності до  $\alpha$ ІІb $\beta$ 3 порівняно з іншими інтегринами. Тирофібан не інгібує  $\alpha$ V $\beta$ 3 або  $\alpha$ M $\beta$ 2 інтегрини і має молекулярну масу менше 1 kDa.

Інший, Ептифібатид (Інтегринілін), одне з похідних Барбурину (очищеного з отрути змії *Sistrurus miliarius barbouri*), є циклічним гептапептидом, конкурентним антагоністом активованого тромбоцитарного  $\alpha$ ІІb $\beta$ 3 інтегрину за допомогою послідовності розпізнавання інтегрину KGD [49]. Механізм

його дії полягає у запобіганні зв'язуванню та зшиванню фібриногену з поверхнею тромбоцитів, що спричиняє пригнічення агрегації тромбоцитів та запобігає утворенню тромбу.

Барбурин, виділений з цієї південно-східної гримучої змії, містить амінокислотну заміну Lys (K) на Arg (R) в RGD-послідовності, в результаті чого утворюється KGD-мотив, високоспецифічний для  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  (GP IIb-IIIa) . Використовуючи цю інформацію, було синтезовано низку конформаційно обмежених дисульфідних пептидів, що містять амінокислотну послідовність KGD. Включення послідовності KGD в циклічний пептидний шаблон з подальшою систематичною оптимізацією розміру циклічного кільця, гідрофобності та дериватизації лізинового бічного ланцюга послідовності KGD дозволило отримати пептидні аналоги, які демонструють  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  інтегрин інгібуючий потенціал та селективність, порівнянну з таким у Барбурина [50].

Дезінтегрини, здатні блокувати  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , також продемонстрували багатообіцяючу та цікаву активність. Саксатилін, наприклад, дезінтегрин з *Gloydius saxatilis*, в амінокислотному складі якого є RGD послідовність, інгібує колаген-індуковану активацію тромбоцитів, пригнічуючи таким чином гранулярну секрецію тромбоцитів, а також подальшу міграцію та інвазію ендотеліальних клітин [51].

Результати клінічних досліджень припускають, що блокада інтегрину IIbIIIa та ін. може бути використана як ефективна терапія при тромботичних ускладненнях. Таким чином, дезінтегрини можуть слугувати можливими структурними прототипами агентів для розвитку антитромботичної терапії.

### 1.3.2. Дія дезінтегринів на пухлинні клітини

Рак характеризується неконтрольованим поділом клітин, трансформацією клітин, уникненням апоптозу, інвазією та метастазуванням. Інтегрини клітин важливі для адгезії клітин, міграції клітин, організації тканин, росту клітин, Індукція апоптозу є найважливішим механізмом багатьох протипухлинних засобів. Дезінтегрини отрути змії розглядають – як

антипроліферативні агенти, що здатні вибірково пригнічувати ракові клітини при метастазуванні. Дезінтегрини це – молекули з низькою молекулярною масою, з різною структурою, потужністю та специфічністю [52].

Zhang та ін. виділили АСТХ-6 (білки, 98 кДа, містять дві субодиниці) із зміїної отрути *Agkistrodon acutus* [53]. Автори виявили, що АСТХ-6 може викликати апоптоз клітин та повідомили, що активні форми кисню (АФК), а саме перекис водню брали участь в апоптозі, який є наслідком окислення L-амінокислоти АСТХ-8. АСТХ-8 не має активності щодо членів сімейства антиапоптичних / проапоптичних BCL2. Він працює в основному за двома механізмами: по-перше, шляхом транслокації Bax та Bad, а друга дія була на Bad, пов'язану з Bcl-xL, щоб замінити на Bak. Активовані Bax і Bak відігравали важливу роль у вивільненні цитохрому C, опосередковуючи апоптоз. Індукція апоптозу проявляється контролем за розміром пухлини та кількістю пухлинних клітин, встановлюючи застосування індукторів апоптозу як життєво важливих компонентів у лікуванні раку.

Torii та ін. отримав фактор, що індукує апоптоз [54], апоксин I з отрути гримучої змії та аміно-кінцеві послідовності очищеного апоксину-I, подібні до L-амінокислотних оксидаз (LAO). Після створення первинної структури апоксину-I за допомогою клонованої к-ДНК автори продемонстрували, що апоксин-I, ймовірно, зв'язує FAD для каталізу окислювального дезамінування L-амінокислот та індукуючої апоптоз активності.

Naumann та співавт. виділили та очистили L-амінокислотні оксидази з *Bothrops leucurus* (Bl-LAAO) та повідомили про біохімічні особливості Bl-LAO, пов'язані з його впливом на функцію тромбоцитів та цитотоксичність [55]. Цитотоксичність Bl-LAAO спостерігалася при раку шлунка MKN-45, аденокарциномі HUTU, колоректальному RKO та клітинних лініях фібробластів людини LL-24. Автори дійшли висновку, що отрута *B. leucurus* - це цитотоксин, який діє, головним чином, через утворення великої кількості  $H_2O_2$ , який вбиває клітини.



Ahn та ін. очистили отруту королівської кобри, *Ophiophagus hannah*, та визначили цитотоксичні компоненти очищеної отрути [56]. Компоненти переважно відповідали L-амінокислотній оксидазі. Автори спостерігали цитотоксичну дію L-амінокислотної оксидази на рак шлунка, меланому миші, фібросаркому, рак прямої кишки та клітинні лінії раку яєчників китайського хом'ячка. Було помічено, що цитотоксичний протеїн спричиняє пригнічення проліферації клітин на 74% згідно з аналізом поглинання [3H]тимідину. Механізм дії ензиму може бути пов'язаний з пригніченням включення тимідину та взаємодією з ДНК.

Gebrim та ін. оцінювали як *in vitro*, так і *in vivo* протипухлинну активність p-бромофенацилброміду (BPB), модифікованого боропстоксином-I із отрути *Bothrops jararacussu* (BthTX-I) [57]. Було виявлено, що різні клітинні лінії пухлини сприйнятливі до літичної дії BPB-BthTX-I, а також від синтетичного пептиду.

Debnath та ін. отримали летальний кардіотоксико-цитотоксичний білок з отрути індійської моноцелатної кобри, *Naja kaouthia* за допомогою іонообмінної хроматографії та рідинної хроматографії високого тиску [58]. Дослідження цитотоксичної дії протеїну на лейкозні клітини U937 та K562 показали значне пригнічення проліферації клітин залежно від дози та часу. В іншій роботі автори очистили отруту з індійської *Naja naja* за допомогою іонообмінної хроматографії та виявили, що фракція 32 має цитотоксико-кардіотоксичні властивості [59]. NN-32 продемонстрував цитотоксичність на клітини ЕАС, збільшив час виживання інокульованих мишей ЕАС, зменшив об'єм та вагу твердої пухлини. Індукована NN-32 протиракова активність у мишей ЕАС, опосередкована завдяки його апоптогенно-антиоксидантній властивості.

Sun та ін. вилучив специфічний білок Okinawa Habu-апоксин-білок-1 (ОНАР-1) з отрути *Okinawa Habu*, який добре відомий своєю токсичною дією [60]. У цьому дослідженні було визначено, що ОНАР-1 може індукувати апоптоз у деяких клітинах гліоми, і з'ясовано можливий механізм його дії.

Індукцію апоптозу визначали за допомогою електрофорезу ДНК-гелю, проточної цитометрії ДНК та аналізу TUNEL. Повідомлялося, що апоптотичний ефект ОНАР-1 на злоякісні клітини гліоми може бути через генерацію внутрішньоклітинної АФК та експресії білка p53.

Karthikeyan та ін. оцінювали протипухлинну активність отрути морської змії, *Lapemis curtus*, проти асцитової карциноми Ерліха (ЕАС) у швейцарських мишей-альбіносів та культур клітин пухлини HeLa та Hep2 [61]. Спостерігалось зменшення об'єму пухлини та кількості життєздатних пухлинних клітин, ці характеристики розглядались як важливий показник зменшення пухлинного навантаження.

Fue та ін. досліджували отруту змій та дезінтегрини, що містили Arg-Gly-Asp, або RGD-послідовність, зокрема, родостомін з отрути *Calloselasma rhodostoma* [62], й інгібували прилипання клітин раку молочної залози та простати до кісткових позаклітинних матриксів, не впливаючи на життєздатність клітин пухлини. Повідомлялося, що одночасне введення дезінтегрину з пухлинними клітинами пригнічувало ріст пухлини в кістці через зменшення адгезії клітин, міграції та остеолізу в кістці.

Gomes та ін. вивчали очищений та кристалізований теплостійкий білковий токсин (drCT-I) із отрути східноіндійської *Daboia russelli russelli* [63]. drCT-I оцінювали на протиракову активність щодо клітин ЕАС *in vivo* та лейкозних клітин людини (U937, K562) *in vitro*. drCT-I значно зменшив кількість клітин ЕАС. Автори підтвердили індукцію апоптозу. Було встановлено, що drCT-I викликав апоптоз шляхом зупинки фази G1 клітинного циклу.

Lin та ін. виділили кардіотоксин III (CTX III) із отрути *Naja naja atra* та повідомили про його протиракову активність [64]. Це було засвідчено накопиченням популяції суб-G1, екстерналізацією фосфатидилсерину, вивільненням цитохрому С та активацією як капас-9, так і каспази-3, що викликають CTX III клітинний апоптоз. Дослідження показало, що CTX III пригнічує фосфорилування JAK2, STAT3, Akt та активацію PI3K. Було

припущено, що СТХ ІІІ пригнічує активацію JAK2- та PI3K паралельно з інгібуванням фосфорилування STAT3 та Akt.

Nunes та ін. оцінили протипухлинний потенціал, а також його цитотоксичність та гемолізу активність BIL [65], галактозид-зв'язуючого лектину, виділеного з отрути *Bothrops leucurus*. Автори перевірили індукований апоптоз у клітинах K562 шляхом аналізу екстерналізації фосфатидилсерину та визначення потенціалу мембрани мітохондрій.

Nolte та співавт. очистили B<sub>J</sub>cuL, лектин із отрути *Bothrops jararacussu*, за допомогою афінної хроматографії та спостерігали його цитотоксичну дію на клітини раку шлунка MKN45 та AGS [66]. B<sub>J</sub>cuL досліджували через вплив на морфологію клітин й цитоскелет, використовуючи флуоресцентну мікроскопію. Автори підтвердили цитотоксичність B<sub>J</sub>cuL на пухлинні клітини, головним чином шляхом зміни адгезії клітин та індукції апоптозу.

Таким чином, аналіз даних літератури дозволив зробити висновок про актуальність пошуку інгібіторів активації тромбоцитів як основи антитромботичних засобів. Засновані на структурі дезінтегринів антитромботичні препарати можуть бути використані для збільшення реперфузії у пацієнтів, що проходять курс антитромботичної терапії при гострому інфаркті міокарда. Дезінтегрини виступають також як антипроліферативні агенти, що здатні вибірково пригнічувати ракові клітини при метастазуванні.

#### 1.4. Моделі канцерогенезу

Онкопатологія за останні 100 років за рівнем захворюваності та смертності в світі перемістилася з десятого місця на друге, поступаючись лише хворобам серцево-судинної системи. Незважаючи на значні досягнення сучасної науки щодо особливостей розвитку та перебігу злоякісних новоутворень, захворюваність та летальність хворих з онкологією продовжує зростати. Згідно бази даних GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) у 2022 році в різних країнах було діагностовано більше 19,0 мільйонів випадків

онкологічних захворювань та більше 9,0 мільйонів смертних випадків. Зокрема в Європі зафіксовано 4,5 мільйонів випадків, з них 2,0 мільйони з летальним наслідком (67). Як стверджує ВООЗ, смертність від раку до 2030 року зросте на 45 % порівняно з рівнем 2007 року (68). Враховуючи швидке поширення пухлин в організмі, складність у ранній діагностиці й лікуванні, можна вважати, що онкологічні хвороби належать до числа найбільш небезпечних патологій для життя людини і є однією з найактуальніших проблем медицини [69].

Результати різнобічних фундаментальних та клінічних досліджень, на жаль, не дозволяють на сьогодні подолати 50% бар'єр ефективного лікування онкологічних хворих. Окрім того, критичного значення для охорони здоров'я набула проблема резистентності до медикаментозної терапії, зростання темпів захворюваності на рак у людей молодого віку. Також залишаються не повністю з'ясованими питання механізмів метастазування, здатності пухлинних клітин уникати імунного нагляду, значення факторів мікрооточення в прогнозі ефективності терапії та перебігу захворювання [70].

Злоякісні новоутворення – різновид пухлинних утворень, які характеризуються низьким диференціюванням клітин, швидким ростом з інфільтрацією оточуючих тканин та наявністю метастазування. На сьогодні відомо більше 200 видів пухлин людини, які відрізняються за тканинним походженням, гістологічним типом, агресивністю, швидкістю росту, здатністю до метастазування, відповіддю на терапію і прогнозом. Пухлина є складною тканиною, яка також містить стромальні елементи, такі як імунні клітини, фібробласти, ендотеліальні клітини, перицити, нейрональні клітини та позаклітинний матрикс. Складна взаємодія між клітинами та неклітинними компонентами мікрооточення безумовно впливають на ініціацію, прогресію та кінцевий результат захворювання [71]. Отже, для правильного розуміння перебігу злоякісного процесу, розробки ефективних методів профілактики та лікування безсумнівне значення має його експериментальне відтворення.

Числені моделі пухлинного росту, які певною мірою відображають розвиток та перебіг захворювання у людини, індукують у лабораторних тварин, створюючи можливість для дослідження різних аспектів канцерогенезу, які неможливо ефективно вивчити безпосередньо на людському організмі [72, 73, 74, 75, 76].

Класичні дослідження на культивованих лініях ракових клітин не дозволяють беззастережно переносити отримані результати на організм людини, оскільки не враховують такі важливі аспекти як індивідуальні генетичні особливості та фізіологічні відмінності. Використання ж тваринних моделей дозволяє ініціювати ріст пухлини у більш патофізіологічних умовах, відтворити геномну гетерогенність раку людини, а також створити середовище, яке включає в себе безліч імунних і стромальних клітинних популяцій, що складають комплекс мікрооточення пухлини [77].

Експериментальні тваринні моделі мають не тільки великі переваги в моделюванні виникнення та дослідженні механізмів злоякісної трансформації, але також використовуються для оцінки ефекту різних методів лікування, що є одним з важливих та незамінних методів дослідження раку. Хоча завдяки відомим передовим терапевтичним стратегіям, таким як інгібітори імунних контрольних точок (ICIs – checkpoint inhibitors) і CAR-T (chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy) досягнуто значного прогресу в лікуванні як солідних, так і лімфопроліферативних захворювань, залишаються суперечливими та потребують подальших досліджень питання ініціації, прогресії, механізмів проліферації, ангиогенеза, метастазування, рецидивування та причини лікарської резистентності злоякісного новоутворення [78].

Тваринні моделі пухлинного росту за походженням поділяються на перевивні (сингенні, аллогенні, ксенотрансплантовані), автохонні – спонтанні та індуковані канцерогенами (хімічні, вірусні, інші канцерогенні фактори), генно-інженерні. Перевивні пухлини залежно від способу введення клітин поділяють також на ортотопічні (трансплантація в той орган або тканину, з

якої походить пухлина), гетерогенні (підшкірно) і метастатичні (в судинне русло).

Перевивні пухлинні моделі передбачають трансплантацію пухлинних клітин одного організму в інший, при цьому якщо донор і реципієнт належать до одного виду, то має місце аллотрансплантація, якщо до різних – ксенотрансплантація. В сингенній моделі пухлинні клітини переносять імунокомпетентним тваринам однієї й тієї ж лінії, в моделі ксенотрансплантації клітини пухлин людини трансплантують здебільшого імунодефіцитним тваринам, щоб уникнути імунних реакцій та відторгнення трансплантата. Моделі ксенотрансплантата, отримані від пацієнта (PDX – patient-derived xenograft), зберігають генетичні та гістопатологічні характеристики пухлини хворого і найчастіше використовуються для вивчення механізмів канцерогенеза, пошуку мішені лікарського засобу, оцінки ефективності дії протипухлинних препаратів. Проте така модель має ряд обмежень, пов'язаних видовими відмінностями [79].

Для автохонних моделей характерна ортотопічна локалізація та природна морфологія (всі пухлини людини – автохонні). Такі моделі дозволяють вивчити роль сигнальних шляхів, генів, маркерних білків, а також стоволових клітин в процесі виникнення злоякісного новоутворення. Хоча автохонна модель в найбільшій мірі імітує розвиток неоплазії в організмі людини, але для таких пухлин характерний тривалий латентний період розвитку і висока варіабільність швидкості росту.

Розроблені також генно-інженерні моделі (GEM), сконструйовані шляхом мутацій в окремих генах (зверхекспресія або нокаут), що дає змогу вивчити роль онкогенів, генів-супресорів, маркерних білків, сигнальних шляхів в ініціації, прогресії і метастазуванні новоутворення. Проте в GEM-моделях спостерігається низька частота метастазування, а отримані результати важко аналізувати статистично через значні коливання в строках виникнення і метастазування пухлин [80].

Існує значна кількість експериментальних моделей ініціації пухлинного росту у різних тварин – дрізофіл, риб (*Danio rerio*, *Xiphophorus*) мишей, щурів, хом'яків, собак, свиней, коней [81, 82, 83, 84]. Ссавці, порівняно з іншими типами тварин, мають вищий ступінь схожості з людьми, особливо миші та щури, а короткий цикл їх розмноження значно покращує ефективність експериментальних досліджень. Секвенування геному миші, показавло присутність 99% людських генів, гомологія яких досягає 78,5% [85]. Моделі на таких тваринах як свині, демонструють більше подібності з людьми з точки зору генетики, анатомічної структури, розмірів органів і патологічних проявів захворювань. Великі тварини мають також більшу тривалість життя, що дає можливість довше спостерігати динаміку процесу, неодноразово отримувати зразки крові і тканин [86, 87]. Проте експериментальні моделі повинні бути не лише максимально схожими з захворюваннями людини, але й простими у виробництві, відтворюваними, а також економічними, що дозволить широке їх застосування в різних лабораторіях [88].

Найчастіше для досліджень пов'язаних з онкологічними захворюваннями використовуються експериментальні моделі на мишах або щурах. Нещодавні дослідження геному щурів показали, що щур, як модельний організм, надає експериментальні ресурси, яких не має миша: більш точне відтворення імунного середовища людини дає змогу дослідити захисні реакції, подібність структури хромосом полегшує вивчення геному, розміри органів дозволяють отримати поздовжній аналіз росту пухлини, а розміри біологічних зразків надають можливість провести мультиплексний молекулярний аналіз пухлини та її господаря. Таким чином, базова біологія та експериментальні ресурси моделей на щурах забезпечують важливі шляхи для дослідження онкопатології [89].

**Моделі спонтанних пухлини.** Серед щурів досить поширений спонтанний рак молочної залози та печінки. Описані спонтанні пухлини молочної залози у щурів різних ліній, таких як Wistar (виведені Інститутом Wistar у США в 1907 році), SD (створені на основі щурів Wistar у 1925 році),

F344 (виведена лінія на основі штаму Fischer). Так, частота фіброаденом, аденом у самок щурів SD становила 21,3%, 16,9% і відповідно, а у самок Wistar – 12,9%, 9,5% відповідно. У щурів F344 фіброаденоми молочної залози розвивались в 41,2% випадків [90]. Хронічний гепатит і гостра гепатоцелюлярна карцинома визначається у 60% щурів лінії LEC (Long-Evans Cinnamon – виведені щури, описані Joseph A. Long, Herbert M.E. Vans, Каліфорнійський Університет, США) через рік після народження, а у 40% тварин цієї лінії спостерігається гостра постгепатитна смерть через 3–4 місяці після народження. Такий спадковий гепатит та наявність онкології пояснюється надмірним накопичення міді в печінці, продукцією великої кількості гідроксильних радикалів, що супроводжується окислювальним стресом, який є одним з механізмів розвитку гепатоцелюлярної карциноми у людини [91]. Тому щурів лінії LEC широко використовують для відтворення моделі гепатоцелюлярної карциноми.

**Моделі індукованої пухлини.** Методи індукції пухлин включають екзогенні фізичні, хімічні та біологічні чинники. При розвитку пухлин, біохімічні процеси у тварин мають подібність з такими у людини, що дозволяє вивчати механізми дії канцерогенів, їх порогові і токсичні дози, вплив мікрооточення. Такі моделі мають переваги у відносній простоті застосування, короткого експериментального часу та високої відтворюваності. Однак недоліком є те, що канцероген-індуковані моделі зрідка метастазують, можуть призводити до високої смертності тварин, а формування певних типів пухлин часто має тривалий латентний період та великі варіації у швидкості розвитку [92]. Серед канцерогенів найбільш широко застосовуваними та ефективними є хімічні, так як вони хаоактреризуються такою важливою особливістю як органоспецифічність – індукують рак у певних органах-мішенях, що дозволяє підібрати модель для оцінки канцерогенезу практично любой локалізації. При оцінці та відборі хімічних чинників ключовим моментом є те, чи залучені генні мутації до механізмів канцерогенезу. Якщо хімічна речовина індукує мутації в органі-мішені, викликаючи тим самим канцерогенез, вона



класифікується як «генотоксичний канцероген», який не має порогової чи безпечної дози і заборонений для використання в якості харчових добавок, пестицидів або ветеринарних препаратів. Якщо ж доза хімічного чинника не викликає мутацій в органі-мішені, незважаючи на канцерогенність, він класифікується як «негенотоксичний канцероген», має порогову/безпечну дозу і може використовуватися в суспільстві в дозах, нижчих за безпечну [93].

Серед вірогідних канцерогенів людини класифіковані нітрозаміни – хімічні сполуки, які індукують пухлини шлунково-кишкової системи (згідно даних, отриманих на тваринах). Високі концентрації нітратів і гербіцидів, нітратів і амінів утворюють нітрозаміни, які особливо активні при пониженій кислотності шлункової секреції [94].

Диметилнітрозаміни (DMN) і діетилнітрозаміни (DEN) – сполуки, які можуть викликати різні пухлини у мишей і щурів, але переважно пухлини печінки і легенів. Нітрозаміни активуються ферментами CYP450 та перетворюються на сильний алкілюючий агент, утворюючи аддукти ДНК, що призводить до канцерогенності. Крім індуктора неоплазії печінки DEN може додатково використовуватися 2-ацетиламінофлуорен (2-AAF) як промотор, який викликає холестаз і фіброз печінки у щурів лінії Wistar. Моделі, з використанням зазначених канцерогенів є ефективною та простою методологією для визначення субклінічних станів раку печінки [95].

Метилбензилнітрозамін (NMBA) також є важливим канцерогеном, який класифікується як нітрозамін. NMBA на сьогодні є найефективнішим індуктором пухлин стравоходу щурів. Так, у щурів лінії SD, які отримували 0,5 мг/кг NMBA тричі на тиждень протягом 5 тижнів або один раз на тиждень протягом 15 тижнів, захворюваність стравоходу становила 100% через 20 тижнів [78].

Метилнітрозамін-1-3-піридин-1-бутанон (NNK) – один із основних хімічних канцерогенів у сигаретному димі (як відомо, паління тютюну в 4 рази підвищує ризик захворюваності раку шлунку в людини), також може ефективно індукувати рак легенів у щурів, мишей і хом'яків [78].

Інша високотоксична речовина з канцерогенною, мутагенно та тератогенною активністю – нітрозо-N-метилсечовина, провокує захворювання молочної залози щурів Sprague-Dawley. Такі пухлини повторюють неоднорідність мутаційних профілів, позитивну експресію рецептора естрогену (який є переважним підтипом у пацієнтів) та мають подібні механізми уникнення імунного захисту, які спостерігаються при злоякісних новоутвореннях молочної залози людини [96].

Для індукції пухлин молочної залози використовується також диметилбензантрацен (DMBA), який відноситься до поліциклічних ароматичних вуглеводів, має сильну канцерогенну та імуносупресивну дію. У 7-тижневих самок щурів лінії SD, яким вводили 80 мг/кг DMBA в 0,5 мл кукурудзяного масла одноразово через зонд, через 12 тижнів спостерігався розвиток раку молочної залози в 100% випадків. [78]. Також описаний DMBA-індукований рак яєчників у щурів, що повторює багато патофізіологічних особливостей аналога людини [97].

Диметилгідразин є ще одним непрямим специфічним канцерогеном і викликає ініціацію та розвиток раку товстої кишки дозозалежним способом при підшкірній або внутрішньочеревній ін'єкціях [98]. Індукована ним модель раку кишечника щурів широко використовується для оцінки гістологічних особливостей та біохімічних процесів розвитку пухлини, що зумовлено його морфологічною подібністю до колоректального раку людини [99], захворюваність на який також поступово зростає [100].

Відомі інші хімічні речовини, наприклад, алкалоїди, ароматичні аміни, які є сильними канцерогенами для людини, і які також викликають захворювання різних органів у трансгенних щурів – печінки (афлатоксин B1), нирок (о-толуїдин), сечового міхура (аристолохієва кислота) [93].

До хімічних канцерогенів відносяться і терапевтичні препарати, які застосовуються в онкології. Так, тамоксифен широко використовується для ад'ювантної терапії у хворих на рак молочної залози протягом багатьох років, проте препарат індукує рак ендометрія у жінок, а також пухлини ендометрія

та печінки у щурів, шляхом альфа-гідрокситамоксифен-індукованого мутагенезу, який далі активується сульфотрансферазою та індукує адукти ДНК. Дослідження *in vivo* проведені на трансгенних Big Blue і gpt delta щурах показали, що тамоксифен викликає мутації генів lacI, cII, gpt і Spi в печінці [101].

**Генно-інженерні/трансгенні моделі.** В дослідженнях останніх років, отримано багато даних, які доводять, що мутації є однією з основних причин розвитку пухлини. Генна терапія пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями дає перспективні результати, але ефективність такого виду лікування обмежується частим виникненням стійкості до ліків. Отже, розуміння механізмів рушійних мутацій у процесах малігнізації має вирішальне значення. Переваги трансгенних тварин, у яких індукують пухлини, полягають у можливості вивчення первинних механізмів пухлиногенезу та імунного нагляду. Однак проведення експериментів на таких моделях обмежене їх значною довгостроковістю, так як важко отримати велику кількість піддослідних тварин і це перешкоджає швидким і високопродуктивним дослідженням [78]. На сьогодні зареєстровано понад 30 ліній різних трансгенних щурів, які використовувалися в нейронауках, ендокринології та онкології. Трансгенні щури високочутливі до канцерогенів, демонструють високу частоту спонтанних новоутворень – є хорошими моделями для скринінгу хіміопрофілактичних засобів, нових лікувальних підходів, вивчення механізмів канцерогенезу, канцерогенної активності хімічних речовин [93].

Зазвичай в пухлинній нокаут-моделі ген супресора пухлини інактивується або заміщується на рекомбінантну ДНК в результаті сайт-специфічної гомологічної рекомбінації між ДНК клітини і цільовою послідовністю ДНК, вбудованої в вектор. Якщо трансгенних мишей використовували для вивчення пухлиногенезу з середини 1980-х років [78], то створити першого нокаутного щура в 2009 році дозволила ZFNs-технологія (zinc-finger nucleases) [102, 103], а у 2010 році була застосована інша технологія на основі ES-клітин (embryonic stem cells) [104]. Нещодавно для

генерації нокаутних щурів були представлені системи ефektorних нуклеаз: TALENs (transcription activator-like effector nucleases) і CRISPR/Cas9 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/Cas-based RNA-guided DNA endonucleases)[84, 105].

Найчастіше в дослідженнях використовуються наступні трансгенні щури.

Hras128 – несуть c-Ha-ras протонкоген людини, чутливі до канцерогенів молочної залози, таких як N-метил-N-нітрозосечовина, 7,12-діметилбензантрацен, 2-аміно-1-метил-6-фенілімідазол[4,5-b]піридин (самки) та пухлини стравоходу та сечового міхура (самці), індуковані N-нітрозометилбензиламіном, N-бутил-N-(4-гідроксибутил)нітрозаміном [106].

TRAP – трансгенні щури Probasin-SV40 T antigen transgenic rats – чутливі до карциноми передміхурової залози (пробазин – специфічний для простати ген, який використовувався як маркер диференціювання простати та для з'ясування дії андрогенів), яка розвивається в 100% випадків у всіх частках (вентральній, дорсолатеральній і передній) до 15-тижневого віку. Показано використання TRAP-моделі для вивчення механізмів рецидивів пухлин, які не залежать від андрогенів, в хіміопрофілактичних дослідженнях [93].

Cx32ΔTg (Connexin 32 dominant-negative transgenic rats) – експресують домінантний негативний мутантний коннексин 32 (Cx32 – належить до білків міжклітинних контактів, є основним білком щілинних контактів печінки). У печінці таких тварин порушується локалізація нормальних коннексинів і помітно знижується ємність щілинних з'єднань. Дослідження індукованого хімічними речовинами канцерогенезу (диметилнітрозамін) з використанням Cx32ΔTg показали, що порушення міжклітинних комунікацій у щілинних з'єднаннях призводить до виникнення та прогресії гепатоканцерогенезу [107].

Hras250 and Kras327 (Transgenic rats carrying a mutated H- or K-ras gene controlled by Cre/loxP activation) – експресують активований людиною онкоген RAS, що регулюється системою Cre/lox. Щури, які несуть мутований ген H- або K-ras, контрольований активацією Cre/loxP (Cre-Lox recombination is a site-specific recombinase technology – сайт-специфічна рекомбіназна технологія,

яка використовується для здійснення делецій, вставок, транслокацій та інверсій у певних сайтах ДНК клітин; система Cre/loxP виділена з бактеріофага P1, належить до родини тирозинових кіназ, складається з двох коротких ДНК-послідовностей LoxP (locus of crossing-over та гена рекомбінази Cre) розвивають протокову аденокарциному підшлункової залози, яка гістопатологічно подібна до такої у людей і використовуються для ідентифікації біомаркерів раннього виявлення цієї патології [108].

**Моделі, що трансплантуються.** Моделі ксенотрансплантації, створені шляхом переносу пухлинних клітин людини та/або тканин, тваринам-реципієнтам (майже завжди з дефіцитом імунної функції, щоб уникнути відторгнення) зберігають гістологічні, імунологічні та біологічні характеристики первинної пухлини пацієнта, включаючи профіль експресії генів, мають великі переваги для скринінгу, оцінки безпеки та ефективності нових ліків, розробки біомаркерів і оцінки інших терапевтичних ефектів. Більшість пухлин людини можуть бути використані для трансплантованої моделі у тварин, при цьому різниця у строках формування пухлинного вузла невелика, а швидкість росту пухлини є однаково високою. Однак такі моделі мають обмеження, пов'язані з імунним захистом та мікрооточенням пухлини або більш тонкими відмінностями, обумовленими видоспецифічними особливостями. Крім того, тварина-реципієнт, яка має імунодефіцитний стані, потребує спеціального утримання в асептичному середовищі, забезпечення якого є дорогим [78]. Модель ксенотрансплантації дозволяє трансплантувати також лінії пухлинних клітин тваринам, що простіше та легше у використанні, але, як і в дослідженнях ліній *in vitro*, така модель пухлини не може повною мірою відображати унікальні характеристики кожного хворого.

Відомо багато онкологічних досліджень з використанням імунодефіцитних мишей *nude*, у яких відсутній тимус, а відповідно, і імунні реакції, опосередковані Т-лімфоцитами, а також мишей з важким комбінованим імунодефіцитом (SCID) – з дефектами дозрівання В- і Т-клітин, спричинені точковою мутацією в *Prkdc* (протеїнкіназа, ДНК-активована

каталітична субодиниця). Виведені та описані також миші NOD/SCID із значними дефектами вродженого та адаптивного імунітету (низька активність природних кілерів, втрата функції Т- і В-клітин), які стали стабільною та затребуваною моделлю для трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин людини (HSC) та солідних пухлин. На основі NOD/SCID, створені миші NSG та NOG з мутацією гену інтерлейкіна-2 – IL-2R $\gamma$ , які мають найвищий ступінь імунодефіциту на даний момент і використовуються для вивчення протипухлинних ефектів терапії CAR-T та інгібіторів імунної контрольної точки [78].

Щури, у порівнянні з мишами, мають більший розмір тіла і легше піддаються трансплантації різних тканин і органів. Безтимусні nude щури нагадують nude мишей відсутністю функціонально зрілих Т-клітин та застосовуються у вивченні механізмів росту пухлини. Проте, атимічні щури певних ліній гостро відторгають алотрансплантовані лімфоцити або клітини кісткового мозку, що пов'язано з наявністю алореактивних природних кілерів, і це обмежує широке застосування nude щурів (як і мишей) при трансплантації лімфом та лейкемій. У таких щурів присутні також дендритні клітини, які приймають участь у вроджених імунних реакціях за відсутності зрілих Т-клітин. З віком у них спостерігається розвиток Т-подібних клітин, які експресують CD3 і Т-клітинний рецептор (TCR) [109].

Відомо про створення, завдяки CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), щурів лінії F344/Jcl з важким комбінованим імунодефіцитом з нокаутним геном гамма-ланцюга рецептора інтерлейкіну-2 (Il2rg) окремо або разом з геном 2, що активує рекомбінацію (Rag2). Фенотип імунодефіциту був попередньо підтверджений наявністю важкої гіпоплазії тимуса як щурів з одиничним нокаутом Il2rg (sKO), так і з подвійним нокаутом Il2rg/Rag2 (dKO) [110]. Така модель може використовуватись для досліджень різних галузей онкології та відновлюваної медицини.

Сингенна трансплантація пухлинних клітин від однієї тварини іншій в межах однієї лінії також широко використовуються в експериментальних дослідженнях тієї чи іншою злоякісної патології.

Серед таких перевивних пухлин карциносаркома Walker-256 молочної залози, є однією з найбільш використовуваних у дослідженнях раку, оскільки вона специфічна для щурів, характеризується агресивністю, швидким ростом, інвазивністю, високою здатністю до метастазування. Розвиток цієї пухлини призводить до синдрому кахексії-анорексії, який проявляється мимовільною втратою ваги, інтенсивним розпадом жирової та м'язової тканини, імуносупресією, анемією та іншими фізіологічними змінами, що ведуть до загибелі тварин протягом кількох тижнів. Пухлина використовується в патофізіологічних дослідженнях, так як імітує зміни, які виникають в організмі людини [111, 112, 113, 114].

Карциносаркома походить від спонтанної аденокарциноми молочної залози самиці нелінійного щура [115]. За існуючими даними популяція клітин сучасного штаму W-256 складається з двох субпопуляцій. Одна з них є естрогензалежною, чутливою до дибутирил-цАМФ, туморогенна лише для самиць та кастрованих самців. Друга субпопуляція нечутлива до гормонів та дибутирил-цАМФ і канцерогенна навіть для статевозрілих самців. Вміст рецепторів естрогену на клітинах пухлини у популяції не перевищує середнього їх вмісту в клітинах органів, що не належать до статевій сфери [116]. Враховуючи морфологічні характеристики та перебіг захворювання, цю пухлину розглядають як експериментальну модель раку молочної залози людини, яка дозволяє відтворювати процеси, що відбуваються послідовно на всіх стадіях канцерогенезу протягом нетривалого часу [117].

Затребуваною в експериментальній онкології пухлиною, що підтримується на щурах, є аденокарцинома Герена – пухлина виділена з матки безпородного білого щура Герен П. і Герен М. в 1934 році. За гістологічною будовою представляє собою низькодиференційований рак, що рідко утворює залозистоподібні структури. Перещеплення пухлини коливається від 50% до

90%, спонтане розсмоктування не спостерігається. Середня тривалість життя тварин після перещеплення складає 30-40 днів [118].

Використовують карциному Герена як експериментальну модель раку ендометрія – класичну модель низькодиференційованої, неметастазуючої, солідної аденокарциноми тіла матки щурів, яка здатна у короткі терміни інтенсивно прогресувати і призводити до значної смертності експериментальних тварин [119].

До перещеплюваних солідних пухлин відноситься також саркома-45, отримана 1947 року в лабораторії професора Зільбера Л.О. в результаті перещеплення фібросаркоми, що виникла у щура в підшкірній клітковині після введення 9,10-диметил-1,2-бензантрацену. За своєю морфологічною характеристикою пухлина складається з фіброblastів. При стандартному підшкірному перевиванні щурам будь-якої статі пухлина росте у вигляді солітарного округлого вузла і не метастазує. Вихід пухлини у безпородних щурів спостерігається майже в 100% випадків, середня тривалість життя тварин-пухлиноносіїв складає 25-35 днів [120].

Цікавою експериментальною моделлю ураження печінки є асцитна гепатома Зайдела, яка була індукована наприкінці 50-х років XX століття у щурів 4-диметиламіноазобензолом, а асцитна пухлина утворилась з неї спонтанно в процесі пухлинної прогресії: в черевну порожнину відокремилися «острівці» клітин, що призвело до розвитку асцитної форми – проміжного етапу на шляху дисемінації пухлинних клітин в організмі, тобто етапу метастатичного каскаду. Особливістю цієї пухлини є висока частота метастазування в паратрахеальні (шийні) лімфатичні вузли: вже на 5-у добу після внутрішньоперитоніального введення щурам асциту від тварин з гепатомою метастази цієї локалізації виявлялись в 90–100% випадків. Спонтанне походження асцитної форми пухлини, висока швидкість накоплення асциту та можливість отримання великої кількості пухлинних клітин без стромальних елементів дозволяє використовувати її як зручну та



перспективну модель для вивчення механізмів пухлинної прогресії та метастазування [121].

Найбільшу схожість із гліомами людини щодо генетичних профілів, характеру інвазії та розповсюдження має лінія клітин гліоми С6 – одна з найбільш широко використовуваних клітинних ліній для індукції пухлини у щурів [122]. Ще один штаб – 101.8 за своїми гістобіологічними властивостями наближається до злоякісних гліом людини і являє собою анапластичну гліому, в якій одночасної малігнізації зазнали астроцитарна глія, олігодендроцити та епендима [123]. Ортотопічна гліобластома щурів 101.8 перевірена як надійна та відтворювана модель пухлини головного мозку, що також характеризується швидкою проліферацією та інвазивним ростом. Необхідно враховувати, що методика перещеПЛення гліом передбачає трепанацію черепа тварин та внутрішньочерепну інокуляцію пухлинних клітин [124, 125, 126] що вимагає залучення відповідних спеціалістів, обладнання, дотримання правил асептики і спеціальних мір під час хірургічної операції, належного післяопераційного спостереження та догляду.

Для вивчення уражень лімфоїдної тканини існує експериментальна модель лімфосаркоми Пліса, отримана в 1958 році після підшкірної перевивки пухлини щура, що отримував 3,3-дихлорбензидин. Пухлина характеризується швидким агресивним ростом з тенденцією до інвазії в навколишні тканини, проростанням заочеревинної клітковини, гематогенним метастазуванням та некротизацією, а також зниженою чутливістю до цитостатиків.

Спонтанні лейкомії у щурів зустрічаються рідко, проте відомо багато моделей, індукованих хімічними канцерогенами (метилхолантрен, етилнітрозсечовина, диметилбензантрацен) та іонізуючою радіацією. Мієломоноцитарний лейкоз L5222, який виник через 326 днів після разової внутрішньовенної ін'єкції етилнітрозсечовини у 3-місячної самки щура BD IX, був описаний у 1967 році. Ця модель лейкомії трансплантується щурам BD IX і використовується в доклінічних дослідженнях для вивчення терапевтичної ефективності різних препаратів. Модель гострого

мієлоцитарного лейкозу, створену на щурах Brown Norway (BNML), також можна застосовувати в доклінічних дослідженнях ефективності хіміо- та радіотерапії. Відома також лейкемія, індукована 9,10-диметил-1,2-бензантраценом у самки щура BN, яка має характеристики подібні до гострого мієлоїдного лейкозу людини, і була використана для дослідження мінімальної залишкової хвороби. На сьогодні продовжуються дослідження щодо створення нових моделей на тваринах, які б більш точно могли показати генетичні аберації та фенотипи клонів гемопоетичних клітин, допомогли краще зрозуміти патогенез мієлодиспластичного синдрому та його трансформацію в гострий лейкоз [127].

Цікаво, що деякі дезінтегрини продемонстрували помітні протипухлинні та антиангіогенні властивості. Ця чудова властивість відкриває нові можливості для їх використання як потенційних терапевтичних агентів у лікуванні раку, і, впливаючи на ріст пухлини та перешкоджаючи формуванню кровоносних судин, ці дезінтегрини демонструють багатообіцяючий потенціал у медичних дослідженнях та інноваціях.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### Розділ 2. Матеріали та методи дослідження

#### 2.1. Матеріали

##### 2.1.1. Реактиви

Було використано такі матеріали та реактиви: акриламід, біс-акриламід (“Sigma”, США); суміш протеїнів-маркерів для електрофорезу, (Fermentas), Трис (“Sigma”, США), Q-Sepharose, Superdex -75, («Pharmacia», Швеція), PD-10 (Amersham biosciences, Швеція); SDS («Bio-Rad Laboratories», США), Zorbax C18 SB300 (“Sigma”, США), кристалічну отруту *Bitis arietans*, *Echis multisquamatus* та *Calloselasma rhodostoma* одержували з серпентарію Трипільського біохімічного заводу. Решта використаних реактивів – вітчизняного виробництва категорії х.ч.

##### 2.1.2. Збагачена тромбоцитами плазма крові людини

Кров брали натщесерце з вени гострою сухою голкою з великим діаметром (19 G), без шприця (для запобігання гемолізу). При заборі крові перші 5–6 крапель відкидали. Під час взяття крові не накладали джгут і не робили масаж передпліччя для запобігання активації зсідання крові і фібринолізу.

У поліетиленову пробірку дозатором вносили 3,8% розчин цитрату натрію та змішували з кров’ю у співвідношення 1:9. Пробірку з сумішшю щільно закривали і повільними рухами обережно декілька разів перемішували (не струшуючи).

ЗТПК отримували шляхом центрифугування при 160 g впродовж 30 хв при температурі 20°C [128]. Під час центрифугування пробірки не закривали, щоб не обмежувати до тромбоцитів доступ кисню.

Відмиті тромбоцити отримували з ЗТПК центрифугуванням протягом 15 хв при 1500 об/хв і повторно суспендували в буфері 0,004 М HEPES, pH 7,4 (0,137 М NaCl, 0,003 М KCl, 0,001 М MgCl<sub>2</sub>, 0,006 М глюкози, 0,003 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

### 2.1.3. Культури клітин

Клітини карциносаркоми Уокер-256 для перевивання лабораторним тваринам одержано з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України.

Культури клітин карциноми легені Льюїс, клітин лінії мікроглії миші BV-2, клітини ендотелію аорти мишей МАЕС та клітини лінії HeLa, використані у *in vitro* дослідженнях, надані ННЦ «Інститут біології та медицини».

Клітини культури перещеплюваної карциноми легені Льюїс (LLC ) культивували в середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% FBS (Sigma, США), 1% глютаміну та 1% антибіотика-антимікотика (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C у 100% зволоженій атмосфері та 5% CO<sub>2</sub>.

Клітини ендотелію миші лінії МАЕС культивували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 15% FBS (Sigma, США), 2% глютаміну та 1% антибіотика-антимікотика (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C у 100% зволоженій атмосфері та 5% CO<sub>2</sub>.

Клітини мікроглії миші лінії BV-2 культивували в середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% FBS (Sigma, США), 2% глютаміну та 1% антибіотика-антимікотика (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C у 100% зволоженій атмосфері та 5% CO<sub>2</sub>.

Клітини карциноми шийки матки людини лінії Hela (ECACC catalog no.93021013) культивували в середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10% FBS (Sigma, США), 2% глютаміну та 1% антибіотика-антимікотика (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C у 100% зволоженій атмосфері та 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.2. Створення моделей для дослідження процесу агрегації тромбоцитів за патологічних станів**

### **2.2.1. Діабет**

Модель інсулінорезистентності, індукованої ожирінням, було отримано утриманням самців білих безпородних щурів протягом 6 місяців на дієті з високим вмістом жирів (58% ліпідів у раціоні з переважаючою часткою насичених жирних кислот). Високожирової дієти досягали шляхом додавання свинячого сала (внутрішнього жиру) до стандартного гранульованого корму. Щурів контрольної групи утримували на стандартному гранульованому раціоні віварію (вміст ліпідів у раціоні становив 4%) [129]. Через 6 місяців утримання на високожировій дієті, було проведено тест на толерантність до глюкози. Після утримання без корму протягом 12 годин, щурам вводили перорально по 1 мл 50% розчину глюкози та вимірювали концентрацію глюкози в крові в часових точках 0 хв, 45 хв, 90 хв та 150 хв. Щурів, у яких рівень глюкози в крові через 150 хв перевищував 5 ммоль/л було відібрано як такі, в яких розвилася інсулінорезистентність, індукована ожирінням [130].

### **2.2.2. Атеросклероз**

Було створено три дослідні групи щурів, в кожній з яких було по 10 лінійних спонтанно гіпертензивних щурів-самиць (SH-rats), з масою тіла 200-220 г [131]. Дві дослідні групи протягом двох місяців експерименту годували кормом з 3% вмістом холестеролу. Щури третьої, контрольної групи отримували аналогічний корм, позбавлений холестеролу. Окрім корму з холестеролом, десятьом щурам щоденно протягом двох місяців вводили per os водний розчин C-145 у розрахунку 10 мг/кг маси тіла.

### 2.2.3. Канцерогенез

Дослідження впливу дезінтегрину на ріст пухлини *in vivo* проведено на щурах лінії Wistar віком 2,5 міс та масою тіла 180-200 г. Щури перебували в стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення і на повноцінному раціоні харчування. У якості моделі пухлинного росту було використано карциносаркому Уокер-256. Враховуючи морфологічні характеристики та перебіг пухлинного процесу, цю пухлину можна розглядати як експериментальну модель раку молочної залози, яка дозволяє відтворювати процеси, що відбуваються послідовно на всіх стадіях канцерогенезу протягом нетривалого періоду часу [132].

Для отримання ізолюваних пухлинних клітин у тварин видаляли пухлини, вирізали фрагменти тканини без судин і некрозу, подрібнювали їх ножицями до розміру не більше 0,2 мм<sup>3</sup>, та інкубували 5 хв. при 37° С в 0,2% розчині трипсину в середовищі RPMI-1640 (Sigma, USA), при постійному перемішуванні на магнітній мішалці. Рідину відбирали, фільтрували через 3 шари капрону і відмивали з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки. Клітини 3 рази інкубували з трипсином та 3 рази відмивали шляхом центрифугуванням при 425 g в середовищі RPMI-1640. Процент життєздатності клітин підраховували в камері Горяєва при фарбуванні трипановим синім. Перещеплення пухлинних клітин проводили підшкірно у пахову зону правої нижньої кінцівки 10 щурів у кількості  $1,5 \times 10^6$  клітин у 300 мкл фізіологічного розчину (0,9 % NaCl). Щурів було поділено на дві групи – контрольна, якій вносили фізіологічний розчин разом з пухлинними клітинами, та дослідна, якій вносили клітини у розчині дезінтегрину в концентрації 100 мкг/мл. На кожну другу добу у хвостову вену щурів контрольної та дослідної групи вводили рівні об'єми фізіологічного розчину та розчину дезінтегрину відповідно.

Для оцінки росту пухлини проводили заміри діаметра пухлини в двох напрямках для кожної тварини за допомогою штангенциркуля кожні 2 доби у динаміці експерименту. Розраховували об'єм пухлини, а також відсоток

гальмування росту пухлини та індекс ефективності впливу досліджуваної речовини за формулами [133]:

$$\text{Об'єм (V)} = \text{довжина} \times (\text{ширина})^2 / 2$$

$$\text{Відсоток гальмування росту пухлини} = [(V \text{ контроль} - V \text{ дослід}) / V \text{ контроль}] \times 100\%$$

$$\text{Індекс ефективності (IE)} = V \text{ контроль} / V \text{ дослід}$$

#### **2.2.4. Токсичний гепатит**

Для дослідження було сформовано три групи щурів: дві контрольні та одну дослідну (по 10 тварин у кожній). Моделювання медикаментозної форми токсичного гепатиту у щурів дослідної групи проводили за авторською методикою шляхом внутрішньошлункового введення 4% водного розчину диклофенаку натрію з розрахунку 12,5 мг/кг маси тіла один раз на добу протягом 14 діб [134]. Перша контрольна група включала інтактних тварин. Другу контрольну групу складали щури, яким внутрішньошлунково вводили еквівалентну кількість двічі дистильованої води. Аналіз показників першої та другої контрольних груп показав їхню ідентичність, тому до результатів дослідження було включено лише одну контрольну групу. Біологічний матеріал відбирали на 15-ту добу експерименту.

#### **2.2.5. Жировий гепатоз**

Щурів було поділено на три групи: дві контрольні та одну дослідну (по 10 тварин у кожній). Для експериментального моделювання гострого жирового гепатозу, згідно з [135], щурам дослідної групи вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда 4% водний розчин тетрацикліну гідрохлориду один раз на добу протягом 7 днів із розрахунку 250 мг/кг маси тіла.

Тварини першої контрольної групи були інтактними. Щурам другої контрольної групи препарат вводили внутрішньошлунково з еквівалентним об'ємом подвійної дистильованої води. Аналіз показників першої та другої контрольних груп показав їхню ідентичність. Тому до результатів

дослідження було включено лише одну контрольну групу. Експеримент тривав 7 діб. Біологічний матеріал відбирали у щурів на 8-му добу експерименту під ефірним наркозом.

#### **2.2.6. LPS-індуковане запалення**

24 самиці мишей лінії C57BL/6J віком 3 місяці утримували в тихому приміщенні з контрольованою температурою (22-23 °C) у віварії Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України та забезпечували водою і сухим кормом у вигляді гранул *ad libitum* відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Мишей було поділено на 2 групи по 12 тварин у кожній. Мишам 1-ї групи внутрішньочеревно вводили LPS (50 мкл, 30 мкг/мишу в 0,9 % розчині NaCl). Мишам 2-ї групи (контрольні тварини) внутрішньочеревно вводили 0,9 % розчин NaCl в еквівалентному об'ємі. Зразки крові мишей відбирали на 2-й день після ін'єкції шляхом пункції серця [136].

#### **2.2.7. Гостре радіаційне ураження**

Самців білих щурів лінії Вістар ( $200 \pm 20$  г,  $n = 40$ ) з віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології розділили на 4 групи по 10 тварин у кожній за 2 тижні до початку експерименту для адаптації: 1-ша група – щури як опромінений контроль, що зазнали зовнішнього рентгенівського опромінення в дозі 6 Гр (група самовідновлення без ентеросорбенту), 2-га група – щури з опроміненням 6 Гр + активований карбон перорально (ентеросорбент), 3-тя група – здорові щури + активований карбон для визначення впливу ентеросорбенту на здорових щурів, 4-та група – здорові щури як інтактний контроль. 1-ша та 4-та групи щурів отримували лише їжу (овес) та воду, а 2-га та 3-тя групи щурів отримували 2 мл активованого карбону з їжею (овес) на кожного щура та водою. Щури 2-ї та 3-ї груп почали приймати активований карбон з їжею за 3 дні до опромінення для



профілактики, в день опромінення та після опромінення (для радіопроменевої терапії та лікування) до кінця експерименту. 20 тварин було убито парами хлороформу на 1-у добу після опромінення, а інші 20 щурів – на 9-у добу після опромінення. Іонізуюче випромінювання підводили рентгенівськими променями з каліброваного опромінювача RUM-17 (Дніпро, Україна) з робочим струмом 10,5 мА, системою мідних фільтрів 0,5 мм; потужність дози – 63 Р/хв, час – 11 хв.

### **2.2.8. SARS-CoV-2**

Для моделювання прозапальної відповіді у мишей на інфікування SARS-CoV-2 використали кон'югат фрагменту S-шипа вірусу 674-685 з альбуміном. Кон'югат, наданий співробітниками відділу молекулярної імунології, отримували за допомогою глутарового альдегіду, як описано раніше [137]. Якість кон'югації 674-685-С-БСА контролювали за допомогою ДСН-електрофорезу у 8% поліакриламідному гелі. З метою підсилення імуногенності короткого пептиду (674-685) його кон'югували з білковим носієм – гемоціаніном молюска (KLH) [138].

Кон'югат вводили внутрішньоочеревинно самицям мишей лінії C57BL/6J віком 3 місяці. Наступна (II) імунізація, проведена на 28-й день, стимулювала більш потужну імунну відповідь, яка досягла максимуму за два тижні після реімунізації (на 42-й день після першої імунізації).

Кров для аналізу агрегації тромбоцитів відбирали пункцією серця на 42 день, через два тижні після реімунізації. Збагачену тромбоцитами плазму крові для аналізу отримували, як описано вище.

### **2.2.9. Утримання тварин та висновки біоетичних комісій**

Тварин утримували в стандартних клітках з вільним доступом до їжі та води відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» № 3447-IV (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями

«Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Усі процедури дослідження були схвалені Комітетом з питань захисту та використання тварин Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (протокол № 7 від 04.10.2019 р.). Окремі дослідження виконано з дозволу Комітету з питань захисту та використання тварин ІЕПОР НАН України (протокол № 4 від 16.04.2015 р.).

## **2.3. Методи**

### **2.3.1. Іонообмінна хроматографія**

Для фракціонування отрути *Echis multisquamatus* було використано іонообмінну хроматографію на Q-сефарозі, врівноважену 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 8,9. Об'єм колонки становив 10 мл, швидкість елюції 1 мл/хв. Сорбовані протеїни елюювали ступінчастим градієнтом 0,15 М NaCl, 0,25 М NaCl, 0,5 М NaCl, 1 М NaCl у 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 8,9. Вміст протеїнів в отриманих фракціях визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

### **2.3.2. Хроматографія розділення за розміром**

Компоненти отриманих фракцій отрути змії розділяли з використанням хроматографії розділення за розміром на Superdex-75 prepgrade. Об'єм колонки, яку було зрівноважено 0,05М трис-НСІ буфером рН 7,4 з 0,13 М NaCl для *Bitis arietans* й *Echis multisquamatus* та 0,025М трис-НСІ буфером рН 7,4 з 0,13 М NaCl для *Calloselasma rhodostoma*, складав 30 мл, об'єм матеріалу, який наносили на колонку, складав – 0,5 мл. Швидкість елюції – 1,5 мл/хв. Вміст протеїнів в отриманих фракціях визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 280 нм.

### 2.3.3. Електрофорез протеїнів у ПААГ

Електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) в присутності SDS з використанням трис-гліцинової системи проводили за методом Лемлі на приладі для вертикального гель-електрофорезу у пластинках 10 % ПААГ [139].

Зразки для електрофорезу готували наступним чином: до розчину протеїну з концентрацією 1 мг/мл додавали буфер для зразків, що містив 5 % сахарози або гліцерин, 2 % SDS та бромфенол, який додавали до появи забарвлення. Зразки нагрівали до кипіння. Для відновлення дисульфідних зв'язків у зразки вносили 5 %  $\beta$ -меркаптоетанол [140].

Розділення проводили при силі електричного струму 19 мА для стартового гелю і 36 мА для розподільного.

Для виявлення ділянок, що містять протеїни, гелеву пластинку витримували у фарбуючому розчині (0,125 % Кумассі G-250 в 25 % ізопропанолі та 10 % оцтовій кислоті) протягом 10 хвилин. Для видалення залишків барвника використовували 2-8 % розчин оцтової кислоти. Роздільна здатність методу – 1 мкг протеїну.

Для встановлення молекулярної маси протеїнів, що досліджуються, використовували молекулярні маркери (Fermentas, Європейський союз): SM0671 (170; 130; 100; 72; 55; 40; 33; 24; 17 та 10 кДа).

### 2.3.4. Визначення концентрації протеїнів

Концентрацію протеїнів визначали спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра Optizen-POP (Корея). за рахунок здатності протеїнів поглинати в УФ-спектрі. Вимірювали поглинання при довжині хвилі 280 нм, віднімаючи значення поглинання за 320 нм. Концентрацію протеїнів визначали формулою:  $C = E / \epsilon l$ , де  $C$  – концентрація протеїну, моль/л,  $\epsilon$  – коефіцієнт молярної екстинкції;  $l$  – довжина оптичного шляху, см. В окремих випадках концентрацію протеїнів визначали за методом Бредфорда [141, 142].

### 2.3.5. Високоєфективна рідинна хроматографія

Хроматографію проводили на Zorbax C18 SB300 9,4x250 мм, (відповідно до Agilent Zorbax HPLC Column Selection Guide for Biotechnology 2001, 5988-2092EN, з модифікаціями). Час хрозділення матеріалу складав 30 хвилин, було використано 3 лінійні градієнти:

А: 98 % -> 30% ddH<sub>2</sub>O, 0,1 % трифтороцтова кислота;

В: 1,95 % -> 71,25% ацетонітрил 100 %;

С: 0,05 % -> 3,75% ddH<sub>2</sub>O 1,7 % трифтороцтова кислота;

Температура +25 °С, швидкість елюції 1 мл/хв. Режим розділення протеїнових фракцій було поставлено та виконано згідно протоколу виробника.

### 2.3.6. Мас-спектрометрія

Мас-спектрометричний аналіз проводили на MALDI-TOF спектрометрі Voyager DE PRO фірми Applied Biosystems, USA. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight). Метод мас-спектрометрії ґрунтується на матрично активованій лазерній десорбційній іонізації з часопрольотним аналізатором. Застосовували Н<sup>+</sup>-матричну іонізацію поліпептидів за допомогою сінапінової кислоти (Sigma-Aldrich) під дією лазерного опромінення. Концентрація сінапінової кислоти у матричному реагенті становила 1 мг/мл, реактив розчиняли у розчині, що складався з однакових об'ємів ацетонітрилу (Sigma-Aldrich) та 1% водного розчину трифтороцтової кислоти (Sigma-Aldrich). Співвідношення матричного реагенту до досліджуваного зразку 3:2 (об'єм). Застосовували лінійний режим роботи часопрольотного детектору мас-спектрометра, прикладена напруга становила 25 кВ. Отримані спектри обробляли програмою Data Explorer 4.0.0.0 (Applied Biosystems) [143].

### **2.3.7. Трипсиноліз**

Для виконання трипсинолізу досліджуваного протеїну проводили гель-електрофорез, як описано вище, та вирізали з гелю зону цільового протеїну. Подрібнювали гель за присутності трипсину Trypsin Protease, MassSpectrometry Grade Proteases (Thermo Scientific, США). Гідролізат аналізували за допомогою мас-спектрометрії, як описано у п. 2.3.6.

### **2.3.8. Амінокислотний аналіз**

Амінокислотний склад фібриногенази визначали на автоматичному амінокислотному аналізаторі T-339 «Mikrotekno», Чехія, у літій-цитратному буфері в одноколонковому циклі. Гідроліз протеїну проводили в 6 М HCl у запаяних ампулах при 120°C протягом 4 годин.

### **2.3.9. Моделювання просторової структури протеїну**

Для моделювання просторової структури протеїну EMS11A (UniProt P0C6A3) використовували програму AlphaFold 3 (Google DeepMind and Isomorphic Labs collaboration, США). Додатково було використано структуру гетеродимеру дезінтегрину з отрути *Echis carinatus* (echistatin) PDB ID: 1TEJ (RCSB US Datacenter, США).

### **2.3.10. ADP-індукована агрегація тромбоцитів**

Процес агрегації тромбоцитів вивчали за допомогою агрегометра SOLAR AP2110 (Білорусь). До 200  $\mu$ л збагаченої тромбоцитами плазми крові людини у кювету агрегометра додавали 50  $\mu$ л досліджуваної фракції та 25  $\mu$ л 0,025 М CaCl<sub>2</sub>. Активацію тромбоцитів індукували додаванням 25  $\mu$ л 12,5  $\mu$ М АДФ.

### **2.3.11. Непрямий імуноферментний аналіз**

Непрямий імуноферментний аналіз (ІФА) використовували для аналізу взаємодії дезінтегринів з активованими тромбоцитами. Відмиті тромбоцити

людини в 0,004 М HEPES буфері з рН 7,4 додавали в лунки 96-лункового планшета для культивування тканин (Nunc), а потім активували 30 мкМ АДФ. Лунки тричі обережно відмивали буфером HEPES. У перший ряд лунок додавали антитіла CD61, специфічні до субодиниці ІІb тромбоцитарного рецептора ІІb/ІІІa, у другий ряд – антитіла CD61 разом з дезінтегрин (0,05 мг/мл). Проби інкубували протягом 1 год при +37°C, потім лунки тричі обережно промивали буфером HEPES, і вносили в усі лунки вторинні антитіла козячі анти-мишачі-HRP. Після 1 год інкубації активність HRP контролювали за допомогою ABTS (2,2'-азино-ди-[3-етил-бензотіазолін-6 сульфокислоти] діамонієва сіль). Оптичну густину кінцевого продукту вимірювали при 416 нм. Конкуренцію між дезінтегрином і CD61 антитілом реєстрували як різницю в сигналі, отриманому в присутності або за відсутності дезінтегрину.

### **2.3.12. Оцінка життєздатності клітин**

Життєздатність клітин оцінювали за допомогою аналізу 3-(4,5-діетілтіазол-2-іл)-2,5-діфенілтетразолійброміда (MTT). Клітини поміщали в 96-лункові планшети та інкубували з 100 мкл культурального середовища, з 1 мг/мл MTT (3-(4,5-діметилтіазол-2-іл)-2,5-діфенілтетразолій бромід (Sigma), при 37 °C. протягом 4 год з наступною сольобілізацією з диметилсульфоксидом (Sigma). Поглинання при 540 нм вимірювали за допомогою рідера Multiskan EX [144].

### **2.3.13. Визначення інтенсивності прикріплення клітин**

Для визначення інтенсивності прикріплення клітин вносили клітини у центрифужну конічну пробірку та додавали дезінтегрин в концентрації 2 мкг/мл. Витримували протягом 30 хвилин при температурі 37 °C при постійному перемішуванні та вносили клітини в лунки 96-лункового планшета. В якості контролю використовували клітини, які витримували за тих самих умов без додавання дезінтегрину. Через кожні 10 хвилин відбирали надосад та фіксували клітини, що прикріпились до дна планшета 96 %

етанолом. Після останньої часової точки (100 хв) клітини фарбували фіолетовим кристалічним, розчиняли барвник в ДМСО і проводили спектрофотометричне визначення при довжині хвилі 570 нм. Інтенсивність забарвлення відповідала кількості прикріплених клітин.

#### **2.3.14. Визначення клітинного циклу**

Для визначення розподілу клітин за фазами циклу під впливом дезінтегрину та в контрольних зразках використовували метод протокової цитофлуориметрії. Для приготування одного зразка використовували не менш ніж  $5 \times 10^5$  клітин. Клітини осаджували за допомогою центрифугування при 1000 g протягом 5 хв. Надосад відбирали та промивали клітини фізіологічним або фосфатносолевим розчином (PBS, pH 7,2). Ресуспендували клітини в 200 мкл PBS, додавали 300 мкл цитратного буфера (pH 6,8), який містив 0,1% тритону X-100. Через 1 хвилину додавали 10 мкл рибонуклеази та 10 мкл пропідію йодистого (Sigma, США) для зафарбовування ДНК. Інкубували протягом 10 хв при 37°C у темряві та 30 хв при кімнатній температурі. Центрифугували при 1000 g 10 хв та вилучали надосад. Після цього фіксували клітини додаванням 400 мкл PBS, з 0,4% формаліну та аналізували вміст ДНК в пробах. Вимірювання показників проводили не пізніше, ніж через 3 доби з використанням протокового цитофлуориметру. Для визначення кількості клітин в різних фазах клітинного циклу проводили цитофлуориметричний аналіз з використанням обладнаного аргонним лазером ( $\lambda_{\text{збуд}}=488$  нм,  $\lambda_{\text{еміс}}=585/40$  нм) протокового цитофлуориметра (Becton Dickinson, США). Проби аналізували із застосуванням програми Mod Fit LT 3.0 (BDIS, USA).

#### **2.3.15. Оцінка антипроліферативної дії на канцерогенез *in vivo***

Вивчали канцерогенез *in vivo* на щурах лінії Вістар та на мишах лінії C57BL, вводячи їм суспензію пухлинних клітин Вокер-256 (LLC-WRC256) та карциноми легень Льюїс (LLC) відповідно. Штами клітин отримано з

Клітинного банку ліній людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

LLC перевивали в концентрації  $3 \cdot 10^5$  клітин у 0,3 мл фізіологічного розчину внутрішньом'язово у праву гомілку мишей лінії C57BL. Підрахунок пухлинних клітин проводили в камері MMC-SR [145].

Протипухлинну активність оцінювали за відсотком гальмування росту пухлин за об'ємом, використовуючи формулу 2.1:

$$O_{\%} = (o_k - o_d) / o_k \cdot 100 \%, \quad (2.1)$$

де  $O_{\%}$  – гальмування росту пухлин за об'ємом, %;

$o_k$  – середній об'єм пухлин у контрольній групі,  $\text{см}^3$ ;

$o_d$  – середній об'єм пухлин у дослідній групі,  $\text{см}^3$ .

Об'єм пухлини визначали за формулою об'єму еліпсоїда (формула 2.2):

$$V = 1\frac{1}{3}\pi ab^2, \quad (2.2)$$

де  $V$  – об'єм пухлини,  $\text{см}^3$ ;

$a$  – найбільша піввісь пухлини,  $\text{см}$ ;

$b$  – найменша піввісь пухлини,  $\text{см}$ .

Кількість метастазів у легенях визначали візуально. Розмір кожного метастазу встановлювали шляхом візуального порівняння його діаметра з міліметровою шкалою. Об'єм метастазів розраховували, виходячи з припущення їхньої кулястості, за формулою об'єму кулі (формула 2.3):

$$v \approx 0,524 \cdot d^3, \quad (2.3)$$

де  $v$  – об'єм метастазу,  $\text{мм}^3$ ;

$d$  – діаметр метастазу,  $\text{мм}$ .



### **2.3.16. Статистичний аналіз даних**

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою Microsoft Excel. Всі аналізи проводили у серії з трьох повторів, і дані було встановлено стандартними помилками за допомогою “Statistica 7”. Результати представлено у вигляді  $\pm$  стандартне відхилення. Різницю між групами було проаналізовано з використанням ANOVA. Дані вважали значущими при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### Розділ 3. Дослідження агрегаційної здатності тромбоцитів за моделювання патологічних станів різного генезу

Тромбоцити є без'ядерними клітинами, які утворюються в процесі мегакаріоцитопоезу. У відповідь на стимул вони активуються та утворюють агрегати. Взаємодіючи з фібрином, який формує каркас тромбу, тромбоцити створюють тіло кров'яного згустку [146, 147].

Зважаючи на лабільність тромбоцитів, будь-які фізіологічні чи патофізіологічні зміни призводять до змін, спрямованих на гіпер-, або ж гіпоагрегацію. Тромбоцити можуть знаходитися сенсibiliзованому стані, готові агрегувати за найменшого стимулу, вони можуть частково дегранулювати, вивільняючи в кровоток ростові фактори та фактори запалення, нарешті може зазнавати змін тромбоцитопоез, призводячи до зростання чи патологічного зниження кількості тромбоцитів [148, 149]. Така дисфункція тромбоцитів може призводити до загрози внутрішньосудинного тромбоутворення або ж до кровотеч.

У клінічній лабораторній діагностиці функцію тромбоцитів вивчають, оцінюючи їхню кількість та/або об'єм [150]. Також важливими маркерами функціональної активності тромбоцитів є PDGF та PF4, які визначаються в сироватці крові імуноензимними методами [151]. Ми вважаємо, що найбільш інформативним методом, який прямо свідчить про функціональний стан тромбоцитів та їхню здатність до активації з формуванням фібринового-тромбоцитарного тромбу, є агрегатометрія.

Метод агрегатометрії ґрунтується на зміні мутності середовища у ході агрегації тромбоцитів під дією індукторів, найчастіше – ADP. Метод дозволяє визначити ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів, а також оцінити хід процесу агрегації, який імітує формування фібриново-тромбоцитарного

тромбу, зокрема виявити дезагрегацію, швидкість фібриноутворення та інші процеси, які свідчать про стабільність згустку [152].

Метою нашого дослідження був аналіз агрегаційної здатності тромбоцитів в плазмі крові лабораторних тварин за умов моделювання *in vivo* патологій різного генезу. Зокрема, створювали моделі, 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. Порівнювали ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів у експериментальних та у здорових тварин одного віку та лінії.

### 3.1. Діабет, викликаний ожирінням

Для індукції ожиріння самців щурів протягом 6 місяців утримували на дієті з високим вмістом жирів (до 60 %). Контрольну групу тварин утримували на стандартній дієті.

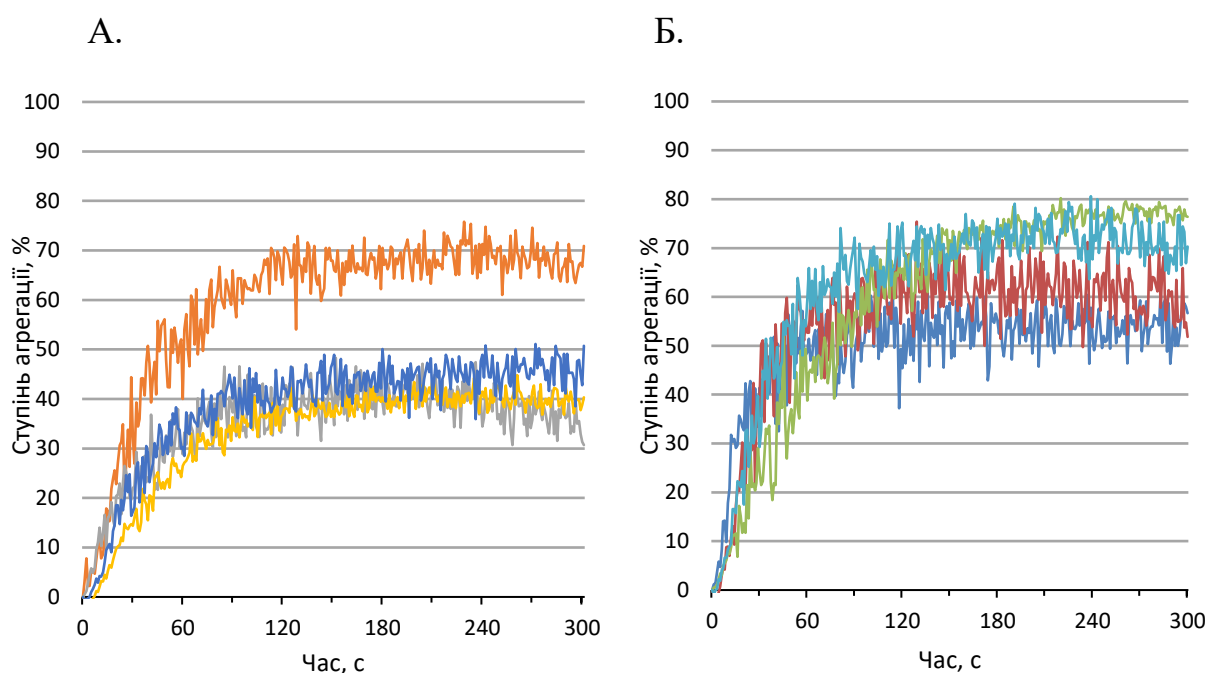


Рис. 3.1. Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів лінії Wistar контрольної групи

(А) та групи, яка була на високожировій дієті моделі ожиріння з діабетом (Б). Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювали у трьох повторях.

Було виявлено, що за розвитку інсулінорезистентності, індукованої ожирінням, спостерігається суттєве зростання реактивності тромбоцитів (рис. 3.1). Виявлено зростання ступеня агрегації тромбоцитів у дослідній групі тварин ( $67,6 \pm 9,0 \%$ ), порівняно з показником для тварин, які отримували стандартну дієту ( $45,8 \pm 12,5 \%$ ). Різниця була достовірною, відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса ( $p = 0,037$ ).

Отже, за індукованої ожирінням інсулінорезистентності, виявлено підвищену агрегаційну здатність тромбоцитів, що може свідчити про підвищений прокоагулянтний потенціал. Гіперагрегація тромбоцитів є відомим наслідком діабету, яка пов'язана зі зростанням рівня інсуліну, який безпосередньо впливає на мегакаріоцити [153].

За діабету відмічають підвищену чутливість тромбоцитів до індукторів агрегації [154]. Відповідно, застосування антиагрегантних агентів є доцільним для пацієнтів, хворих на діабет, для запобігання можливим тромботичним ускладненням [155]. Проведене порівняння ефектів терапії аспірином у таких пацієнтів дало неоднозначні результати, які не дозволяють рекомендувати аспірин як безпечний антикоагулянтний агент для всіх пацієнтів. З огляду на це, все більше уваги привертає застосування антагоністів глікопротеїнових рецепторів тромбоцитів [156].

### 3.2. Атеросклероз

Для індукції атеросклерозу у тварин зі спонтанною гіпертензією щурів протягом 2 місяців утримували на дієті з високим вмістом холестерину (3 %). Контрольну групу тварин утримували на стандартній дієті.

Існує дві основні теорії щодо механізмів виникнення атеросклерозу. Зокрема, теорія ушкодження, згідно якої порушення цілісності ендотелію є первинною подією формування атеросклеротичної бляшки, а також ліпідна теорія, яка стверджує, що тригером атерогенезу є накопичення ліпідних відкладень на поверхні судин [157].

У застосованій нами моделі атеросклероз викликали насиченням крові продуктами обміну холестерину. Високохолестерольна дієта була ефективною лише у спонтанно гіпертензивних щурів. У щурів з нормальним артеріальним тиском споживання навіть надмірних кількостей холестерину таких порушень не викликало [158]. Атеросклеротичні зміни у спонтанно гіпертензивних щурів було спричинено поєднанням двох факторів: насиченням кровотоку холестерином та високим тиском, що сприяв появі турбулентності кровотоку, активації системи зсідання крові та ушкодженню ендотелію.

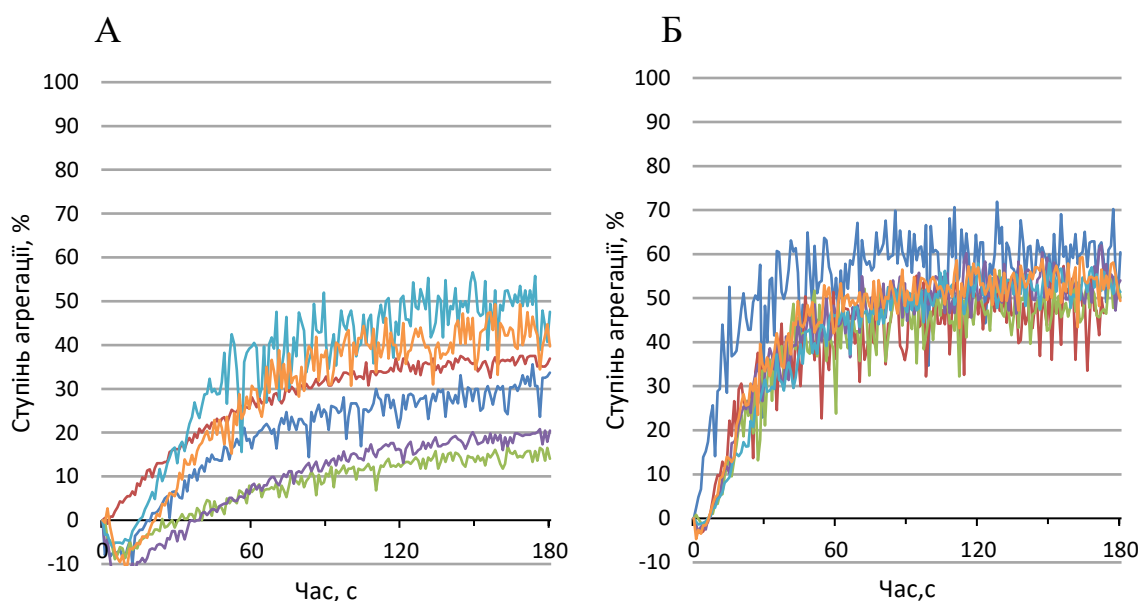


Рис. 3.2 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів (А) та групи, яка приймала багату на холестерин дієту моделі атеросклерозу (Б). Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювали у трьох повторах.

Було виявлено, що за розвитку атеросклерозу, індукованого дієтою з високим вмістом холестерину, спостерігається суттєве зростання реактивності тромбоцитів (рис. 3.2.). Виявлено зростання ступеня агрегації тромбоцитів у дослідній групі тварин ( $52,5 \pm 5,0 \%$ ), порівняно з показником для тварин, які отримували стандартну дієту ( $32,2 \pm 12,2 \%$ ). Різниця була достовірною, відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса ( $p = 0,0064$ ).

Підвищений ступінь агрегації тромбоцитів у щурів з гіпертензією та атеросклерозом може свідчити про кілька ключових аспектів. По-перше, це може вказувати на підвищену тенденцію до тромбоутворення, оскільки атеросклероз і гіпертензія сприяють активації тромбоцитів і збільшують ризик тромбоутворення [159]. По-друге, системне запалення, яке часто супроводжує ці стани, може впливати на функцію тромбоцитів, збільшуючи їх схильність до агрегації. Пошкодження ендотелію судин, яке відбувається при атеросклерозі, також може призвести до підвищення агрегації тромбоцитів через порушення регуляції балансу в системі гемостазу. Дієта з високим вмістом холестерину може посилювати запальні процеси і змінювати функцію тромбоцитів, а сама гіпертензія є фактором ризику, що призводить до механічного пошкодження судин і додатково підвищує агрегацію тромбоцитів. Підвищена агрегація тромбоцитів у таких умовах вказує на збільшений ризик тромбоутворення і можливу прогресію атеросклеротичних змін.

Таким чином, функція тромбоцитів має виключне значення у прогресії атеросклерозу [160]. Не дивно, що антиагрегантну терапію розглядають як один з головних способів запобігання тромботичним ускладненням за атеросклерозу [161]. Тому пошук нових способів інгібування агрегації тромбоцитів за атеросклерозу є важливим питанням сучасної біотехнології [162].

### 3.3. Канцерогенез

Для моделювання канцерогенезу щурам дослідної групи вводили внутрішньом'язово суспензію пухлинних клітин карциносаркоми Walker-256 (1 млн клітин/мкл). Тваринам контрольної групи вводили відповідну за об'ємом кількість буферу. Через 10 днів отримували збагачену тромбоцитами плазму крові та аналізували агрегацію тромбоцитів у щурів обох груп.

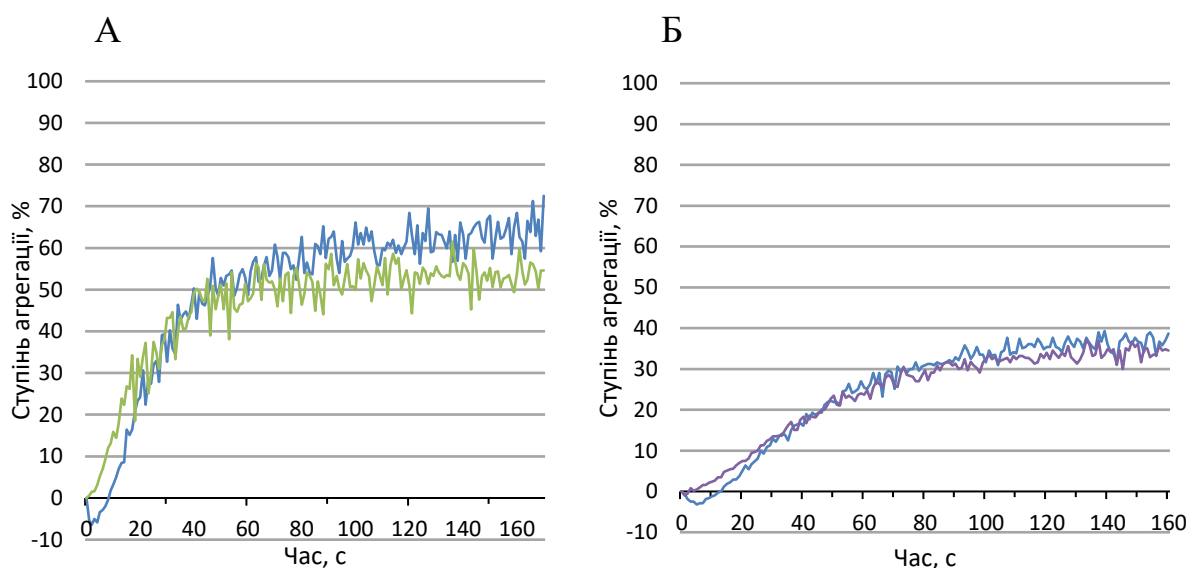


Рис. 3.3 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові контрольної групи щурів, яким вносили буфер (А), та групи, якій вносили пухлинні клітини Walker-256 (Б). Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювали у трьох повторах.

За такого моделювання онкогенезу ріст пухлини починався негайно з моменту введення суспензії життєздатних пухлинних клітин, що контрастує зі звичайним розвитком онкологічних захворювань. Однак, навантаження на організм, пов'язане з прогресією пухлини, все ж можна було оцінити.

Прогресія пухлини пов'язана з порушенням балансу в системі гемостазу в бік гіперкоагуляції, окрім того, низка компонентів системи гемостазу приймають участь у механізмах канцерогенезу [163]. Зокрема, таку роль

мають і тромбоцити, які здатні взаємодіяти з пухлинними клітинами, сприяючи метастазуванню [164]. Не дивно, що підвищена реактивність тромбоцитів у хворих пов'язана з ризиком смертності від онкологічних захворювань [165].

У щурів дослідної групи спостерігали істотне збільшення об'єму пухлини, що свідчило про стрімкий перебіг канцерогенезу. Водночас, ступінь та швидкість агрегації тромбоцитів у щурів дослідної групи було знижено порівняно з такими для контрольної групи щурів (Рис. 3.3).

Зокрема ступінь агрегації тромбоцитів знижувався з 55 % у контролі до 33 % за прогресії пухлини (результати достовірні відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса,  $p = 0,00902$ ).

Можливо, зниження агрегаційної здатності тромбоцитів пов'язано з дисемінованим внутрішньосудинним тромбоутворенням, яке часто супроводжує онкологічні захворювання на термінальній стадії [166]. З іншого боку, такий ефект може бути пов'язаний зі стрімким розвитком пухлини, який безумовно призвів до гострого запального процесу.

Слід відзначити, що у попередніх описаних моделях, де ми відзначали підвищення ступеня агрегації тромбоцитів, мова йшла про хронічний перебіг захворювання. Цікаво надалі було порівняти отримані результати з результатами у інших моделях, пов'язаних з гострим запаленням.

### **3.4. Гепатит**

Для індукції гепатиту щурам протягом 14 днів вводили диклофенак у кількості 12,5 мг/кг. Контрольній групі тварин вводили еквівалентний об'єм дистильованої води. Щурів обох груп утримували на стандартній дієті.



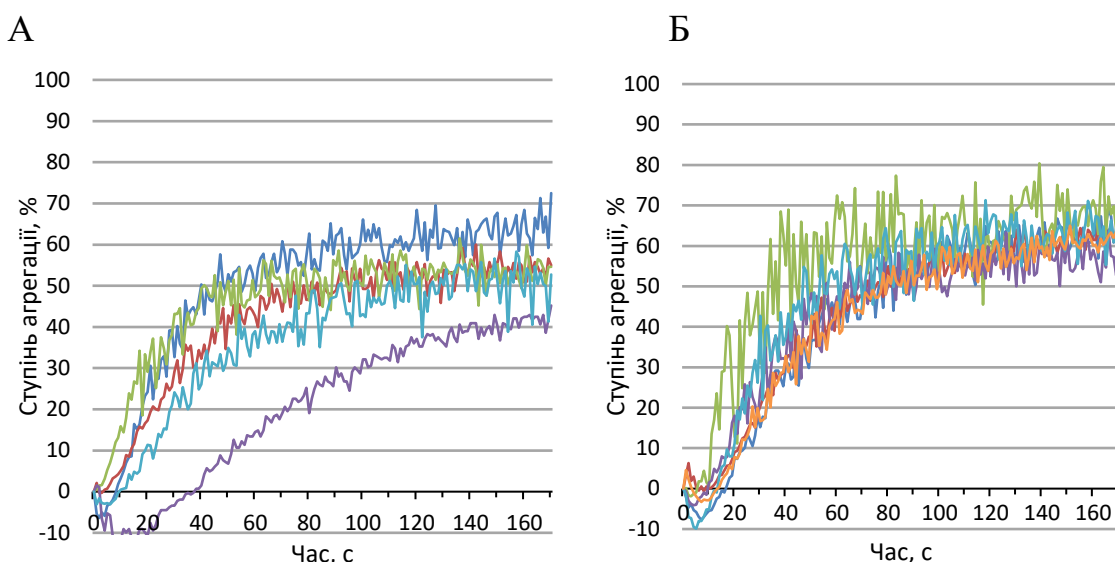


Рис. 3.4 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів лінії Wistar (А) та групи, якій вводили диклофенак натрію для створення моделі гепатиту (Б). Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювали у трьох повторах.

Було виявлено, що за розвитку диклофенак-індукованого гепатиту спостерігається суттєве зростання реактивності тромбоцитів (рис. 3.4). Виявлено чітку тенденцію до зростання ступеня агрегації тромбоцитів у дослідній групі тварин ( $62 \pm 4,2 \%$ ), порівняно з показником для тварин контрольної групи ( $51,6 \pm 7,3 \%$ ) відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса  $p = 0,01629$ .

Зростання реактивності тромбоцитів за розвитку диклофенак-індукованого гепатиту може свідчити про кілька важливих патологічних змін. Гепатит часто супроводжується системним запаленням, яке активує тромбоцити, підвищуючи їх реактивність і схильність до агрегації [167]. Також важливо відмітити, що окрім системного запалення, наслідки гепатиту проявляються у вигляді тромбоцитопенії, пов'язаної зі зниженням рівню тромбопоетину під час ушкодження клітинної маси печінки. Це призводить до зниження тромбопоезу в кістковому мозку і, як наслідок, до тромбоцитопенії в периферійній крові у пацієнтів з пізніми стадіями захворювання печінки

[168]. Крім того, токсичний ефект диклофенаку на печінку (і не тільки на неї) може порушувати функцію ендотелію судин, викликаючи апоптоз через взаємодію з про-апоптичними сигнальними шляхами та протеїнами, що також сприяє активації тромбоцитів [169]. Отже, підвищена реактивність тромбоцитів у таких умовах вказує на збільшений ризик тромбоутворення, що дозволяє розглядати застосування селективних інгібіторів агрегації тромбоцитів для полегшення симптомів перебігу хвороби.

### 3.5. Гепатоз

Для індукції гепатозу у тварин щурів протягом 7 днів вводили 250 мг/кг тетрацикліну. Контрольній групі тварин вводили еквівалентний об'єм дистильованої води. Щурів обох груп утримували на стандартній дієті [170].

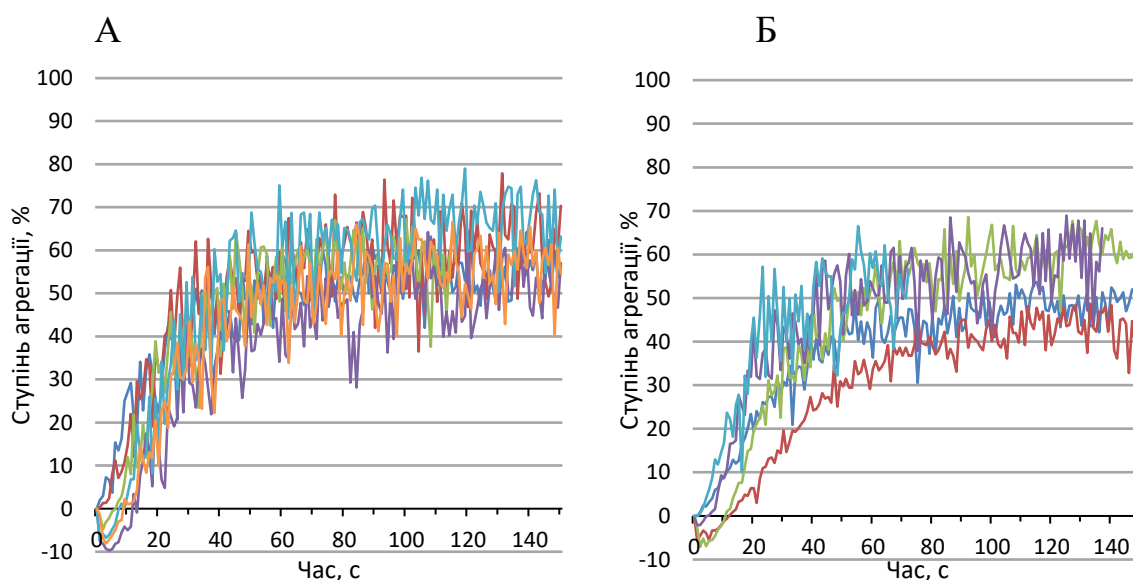


Рис. 3.5 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів лінії Wistar (А) та групи, яка отримувала задану концентрацію тетрацикліну (Б) протягом 7 днів. Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювали у трьох повторах.

Було виявлено, що за розвитку гепатозу, індукованого тетрацикліном, спостерігається незначне зниження реактивності тромбоцитів (рис. 3.5). Виявлено тенденцію до зниження ступеня агрегації тромбоцитів у дослідній групі тварин ( $51,4 \pm 5,85 \%$ ) порівняно з показником для тварин, які отримували стандартну дієту ( $59,3 \pm 5,35 \%$ ), відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса  $p = 0,04461$ ).

Привертає увагу різноспрямована дія гепатиту і гепатозу: за гепатиту спостерігали тенденцію до підвищення ступеня агрегації тромбоцитів, а за гепатозу – зниження.

Відомо, що при гепатозі спостерігається зниження кількості тромбоцитів [171]. Окрім того, порушення в метаболізмі жирів і накопичення жиру в печінці можуть впливати на функцію мегакаріоцитів та продукцію ними незрілих тромбоцитів [172]. Отже, зниження реактивності тромбоцитів у таких умовах відображає комплексний патологічний процес.

Важливо, що гепатоз у створеній нами моделі пов'язаний з розвитком гострого запального процесу. Як і у випадку використаної нами моделі канцерогенезу, відповіддю організму на гостре запалення стало зниження функції тромбоцитів.

### **3.6. LPS-індуковане запалення**

Було вирішено перевірити гіпотезу про зниження функції тромбоцитів за гострого запалення, використавши класичну модель LPS-індукованого запалення.

Для побудови моделі запалення у тварин щурам вводили LPS у концентрації 0,5 мг/кг. Контрольній групі тварин вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

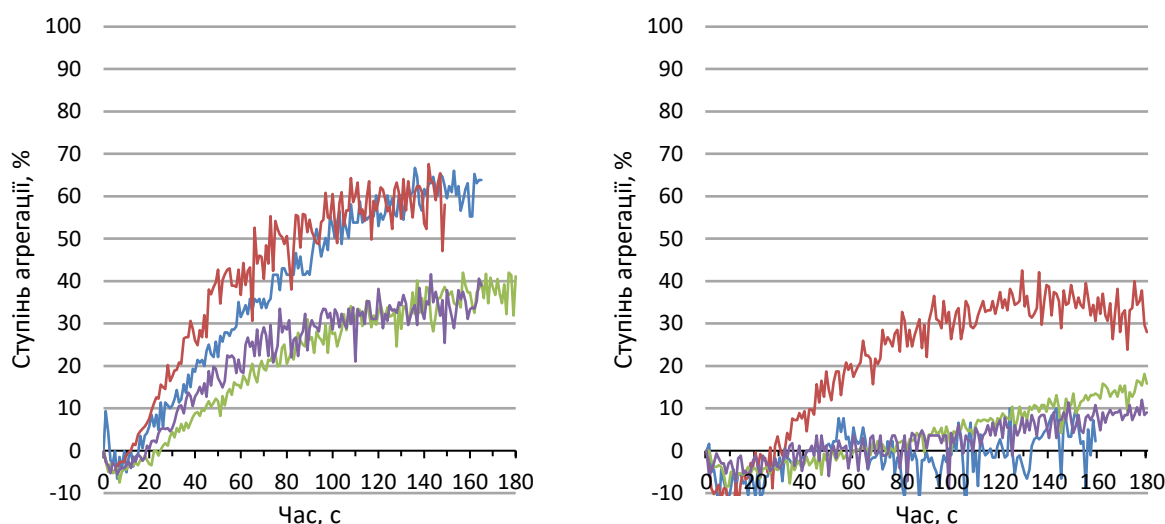


Рис. 3.6 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів лінії Wistar (А) та групи тварин, яким вводили LPS (Б). Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювали у трьох повторах.

Було виявлено, що за розвитку запалення, індукованого LPS, спостерігається значне зниження реактивності тромбоцитів (рис. 3.6). Виявлено зниження ступеня агрегації тромбоцитів у дослідній групі тварин ( $20,8 \pm 11 \%$ ), порівняно з показником для тварин, яким вводили фізіологічний розчин ( $41,6 \pm 8,2 \%$ ). Різниця була достовірною, відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса ( $p = 0.00902$ ).

LPS індукує гостре запалення завдяки активації TLR-рецепторів, запускаючи в організмі піддослідної тварини системну імунну відповідь.

Окрім того, LPS може безпосередньо діяти на тромбоцити завдяки взаємодіючи з CD14 і TLR4 на їхній поверхні [173, 174]. Одним з пояснень різкого зниження ступеня агрегації тромбоцитів (рис. 3.5), полягає у тому, що через сигнальний шлях TLR4 відбувається зростання концентрації цитозольного цАМФ, яке призводить до вивільнення іонів кальцію з щільної

трубчастої системи тромбоцитів [175]. Висока концентрація кальцію має інгібіторний вплив на процес АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів [176].

Таким чином, ми знову спостерігали зниження функції тромбоцитів за гострого запалення, що підтверджує наші попередні висновки про закономірності відповіді тромбоцитарної ланки гемостазу на запальний процес.

Окрім відносно простих моделей, пов'язаних з розвитком гострого чи хронічного запального процесу, нами було вивчено стан тромбоцитарної ланки гемостазу у моделях, пов'язаних з системним ураженням організму. Зокрема було досліджено агрегацію тромбоцитів за гострого радіаційного синдрому та за імунізації тварин пептидом S-шипа вірусу SARS-CoV-2.

### **3.7. Гострий радіаційний синдром**

Для створення моделі гострого радіаційного синдрому щурів опромінювали 6 Gy і вимірювали агрегаційну здатність тромбоцитів через 9 діб. Контрольну групу утримували в тих самих умовах, що й експериментальну, однак вона не зазнавала опромінення.

У порівнянні контрольної групи щурів та групи щурів, які зазнали опромінення, виявились незначні зміни у ступені та швидкості агрегації тромбоцитів. У дослідній групі тварин показник ступеня агрегації становив  $28,4 \pm 21,57 \%$ , а у тварин, яких не було опромінено, –  $43,4 \pm 13,1 \%$ . Відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса різниця становила  $p = 0,29627$ ). Отже променева хвороба викликала зниження функції тромбоцитів.

Більшість аналогічних досліджень, які проводили на мишах, визначали зміну показників гематологічних параметрів, у тому числі і тромбоцитів. Було показано значне зниження загального рівня кількості тромбоцитів [177, 178].

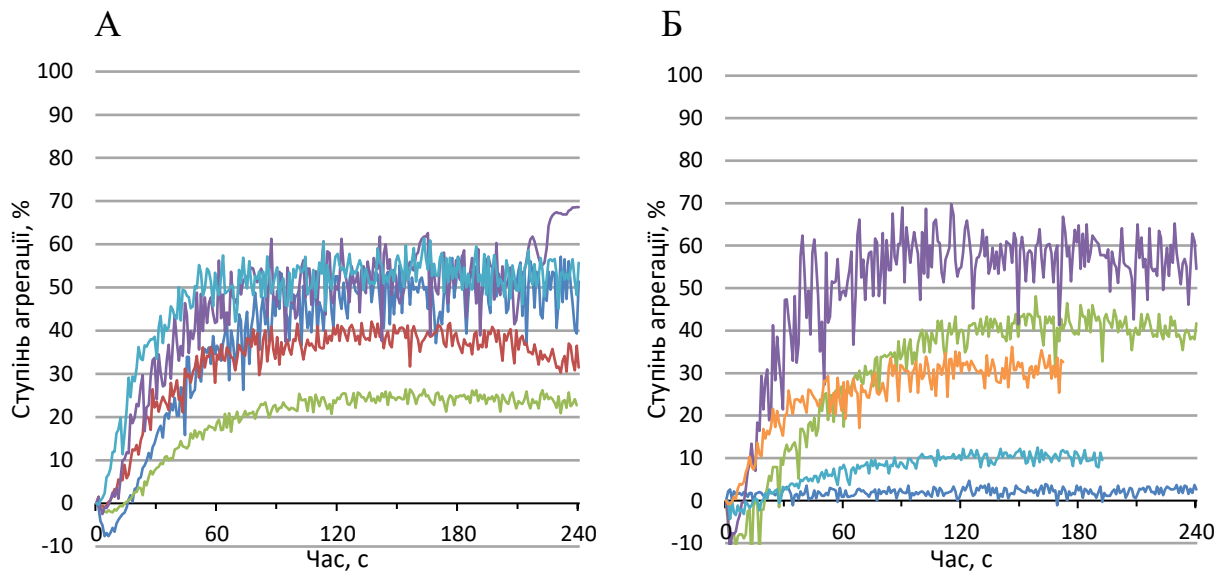


Рис. 3.7 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів лінії Wistar (А) та групи, яка отримала опромінення у 6 одиниць Гр (Б). Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювали у трьох повторах.

Імовірно, радіаційне ураження, яке ушкоджує червоний кістковий мозок, порушує тромбоцитопоез та викликає генералізоване запалення [179]. Відомості про стан системи гемостазу за променевої хвороби дозволяють припустити виникнення дисемінованого внутрішньосудинного тромбоутворення, що також призводить до зниження агрегаційної здатності тромбоцитів.

### 3.8. Інфікування SARS-CoV-2

Відомо, що інфікування SARS-CoV-2, яке викликає пандемічну хворобу COVID-19, призводить до цитокінового шторму, гострого та хронічного запалення, тромботичних ускладнень та інших процесів, до яких потенційно можуть бути залучені тромбоцити. Важливим компонентом інфікування SARS-CoV-2 є аутоімунні процеси, зокрема, було показано утворення

аутоантитіл до фрагменту шипа вірусу 674-685, яке, за даними дослідників, індукує нейрозапалення через формування аутоантитіл [180].

Для створення моделі мишам лінії C57BL/6J віком 3 місяці було введено інтраперитоніально пептид 674-685 S-шипа SARS-CoV-2 з ад'ювантом. Дослідній групі вводили еквівалентний об'єм розчину ад'ювантом.

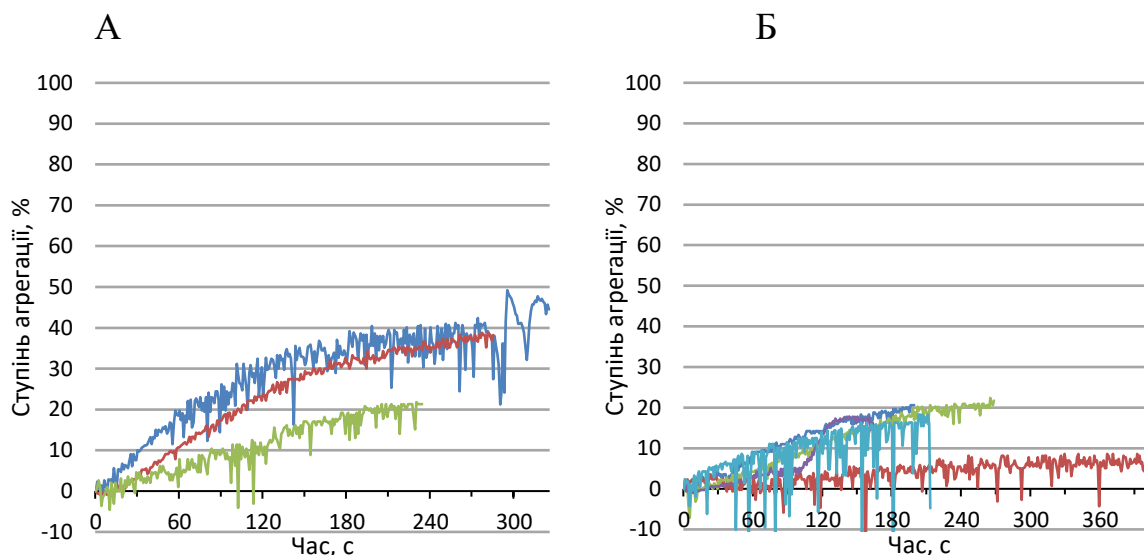


Рис 3.8 Агрегатограми АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові мишей лінії C57BL/6J, імунізованих пептидом 674-685 S-шипа SARS-CoV-2 (Б), та контрольних тварин (А). Наведено графіки типових експериментів, кожна крива відображає хід агрегації тромбоцитів окремого щура, вимірювання здійснювалися у трьох повторах.

Було виявлено, що імунна відповідь на досліджуваний пептид призводила до різкого зниження ступеня та швидкості агрегації тромбоцитів. Зокрема, ступінь агрегації знижувався до  $14,4 \pm 5,17$  %, порівняно з  $29,6 \pm 10$  % у контролі. Відповідно до статистичного тесту Краскела-Уолліса різниця була достовірною ( $p = 0,02828$ ).

Цікаво, що одним з аспектів дії SARS-CoV-2 на тромбоцити є індукування активації запрограмованих шляхів клітинної загибелі з вивільненням позаклітинних везикул, таких як мікрочастинки та екзосоми з цитоплазми

тромбоцитів. Це підтверджують маркери апоптозу та некроптозу, Casp (Caspase)3 та фосфорильований MLKL (pMLKL) відповідно [181].

Антитіла проти SARS-CoV-2 можуть також сприяти активації тромбоцитів і протромботичній відповіді. У міру прогресування інфекції кількість антитіл проти вірусу збільшується в кровообігу, а кількість і якість цих антитіл варіюється від людини до людини. Дослідження показали, що високі титри антитіл у пацієнтів з COVID-19 асоціюються з тяжкістю захворювання та підвищеною смертністю [182].

Отже, причину зниження функції тромбоцитів слід шукати у системній реакції організму на інфікування, аутоімунних процесах, у розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення, які супроводжують це захворювання. Тому з особливою обережністю слід застосовувати антитромбоцитарні препарати під час лікування COVID-19 та у пост-ковідний період. У зв'язку з цим, особливий інтерес серед інгібіторів агрегації тромбоцитів становлять антагоністи інтегринових рецепторів, що пригнічують агрегацію тромбоцитів, помірно діючи при цьому на сигнальні каскади тромбоцитів.



## Розділ 4. Отримання і характеристика антагоністів інтегринових рецепторів з отрути змій

### 4.1 Отримання дезінтегринів

#### 4.1.1. Хроматографічне фракціонування отрути *Bitis arietans*

Для фракціонування компонентів отрути гадюки шумливої (*Bitis arietans*) було використано Q-сефарозу (1x10 см), врівноважену 0,05 М трис-НСІ буфером рН 8,3. Для цього 100 мг кристалічної отрути *Bitis arietans* розчиняли у 1 мл 0,05 М трис-НСІ буфера рН 8,3. Після видалення центрифугуванням часток, що не розчинилися, отруту наносили на Q-сефарозу зі швидкістю 1 мл/хв (Рис. 4.1).

Елюцію проводили ступінчастим градієнтом 0-2,0 М NaCl. Оптичну густину вимірювали при 280 нм. Тут і далі інгібування агрегації тромбоцитів отриманими фракціями визначали за допомогою агрегатометрії, як описано у розділі 2.3.10.

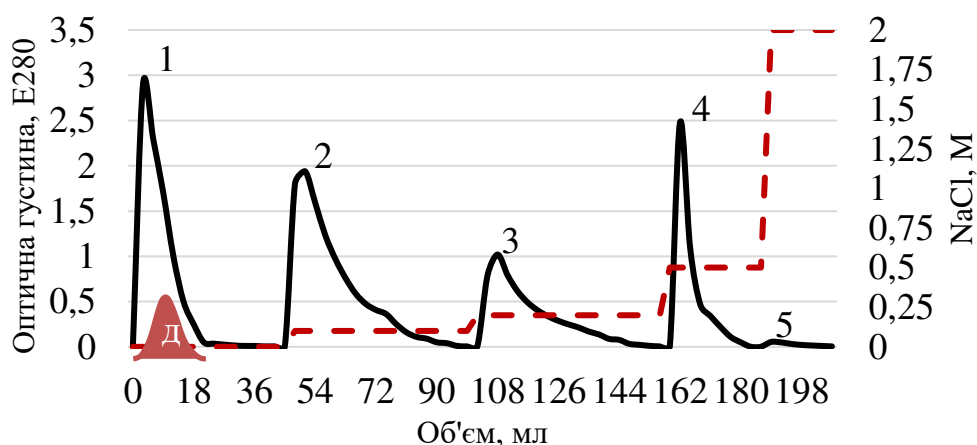


Рис. 4.1. Хроматограма фракціонування цільної отрути *Bitis arietans* за допомогою йонообмінної хроматографії на Q-Sepharose. 1 – фракція, що не зв'язалася з носієм; 2 – фракція, елююється при 0,1 М NaCl; 3 – фракція, елюювалась 0,2 М NaCl; 4 – фракція, елююється при 0,5 М NaCl; 5 – фракція, елююється при 0,2 М NaCl. Червоною зоною показано аліквоти фракції, що містили інгібітор агрегації тромбоцитів

Сорбовані протеїни елюювали ступінчастим градієнтом NaCl: 0,05 М трис-HCl буфер pH 8,3 (1), що містив 0,1 М NaCl (2), 0,2 М NaCl (3); 0,5 М NaCl (4) та 2 М NaCl (5) (Рис. 4.1.).

Таким чином, отримано чотири фракції отрути *Bitis arietans*. Склад протеїнового компоненту отриманих фракцій було визначено за допомогою електрофорезу в 10% ПААГ в системі Лемлі (Рис. 4.2).

Показано, що отримані фракції відрізняються за своїм протеїновим складом та містять протеїни у діапазоні молекулярних мас від 150 до 10 кДа.

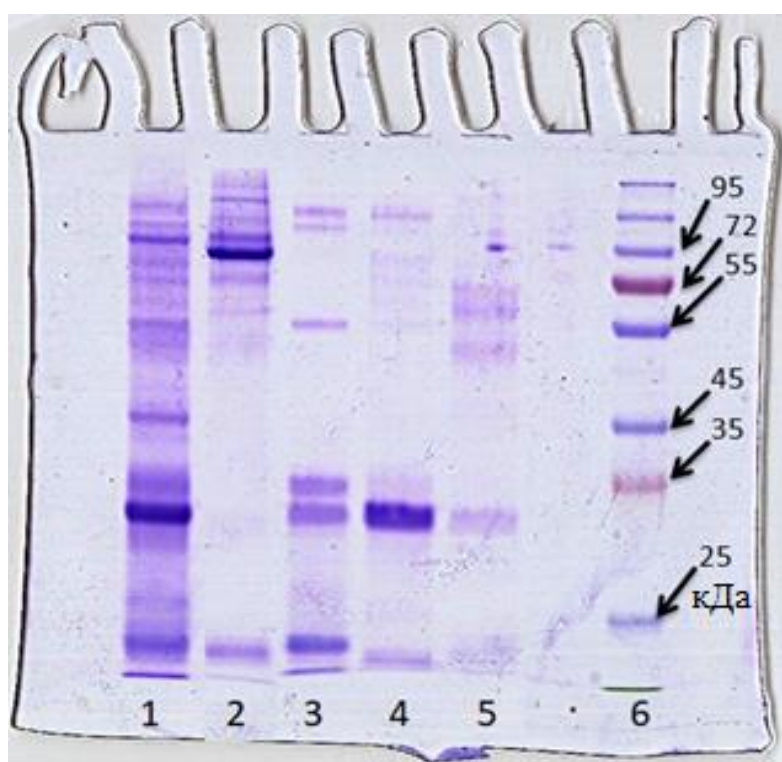


Рис. 4.2. Електрофореграма фракцій отрути *Bitis arietans*, отриманих на Q-сефарозі, у 10%-ому ПААГ, де 1 – цільна отрута, 2 - фракція, що не зв'язалася з носієм за даних умов, 3 – фракція, що елюйована за концентрації 0,1 М NaCl, 4 – фракція, що елюйована за концентрації 0,2 М NaCl, 5 – фракція, що елюйована за концентрації 0,5 М NaCl, 6 – маркери молекулярної маси протеїнів, кДа

Виявлено, що фракція, яка не зв'язувалася з носієм за даних умов, а також фракція 3, елюйована за концентрації 0,5 М NaCl, інгібували процес агрегації тромбоцитів.

Раніше було показано, що отримана фракція, яку було елюювано за концентрації 0,5 М NaCl, містить ензим, здатний гідролізувати А $\alpha$ - та В $\beta$ -ланцюги фібриногену, що і призводить до порушення процесу агрегації тромбоцитів.

Фракція, яка не зв'язувалася з носієм за даних умов, була єдиною, що виявила інгібіторну дію на процес агрегації тромбоцитів. Відтак, ми зосередилися саме на цій фракції і для її додаткової очистки провели гель-фільтрацію на Superdex-75 prepgrade. (Рис. 4.3)

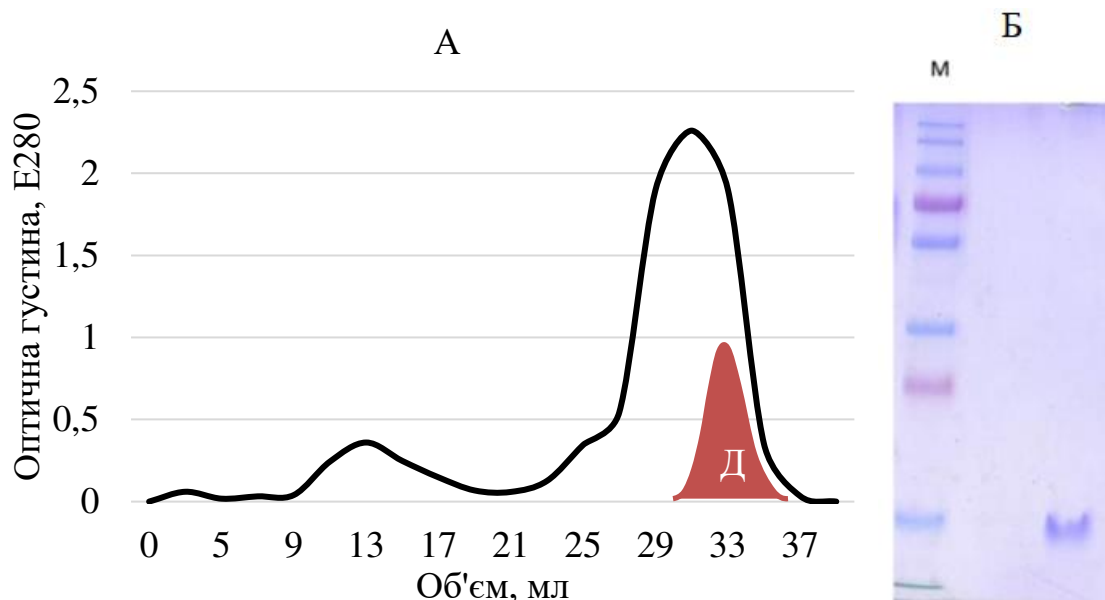


Рис. 4.3. А – Профіль елюції дезінтегрину з отрути *Bitis arietans* на Superdex-75 prepgrade, Д – фракції, що містили інгібітор агрегації тромбоцитів. Б – Електрофореграма фракцій отрути *Bitis arietans*, отриманих на Superdex-75 prepgrade, які містили інгібітор агрегації тромбоцитів. М – маркери молекулярної маси (kDa); 250, 130, 100, 70, 66, 35, 25, 15, 10.

Шляхом визначення інгібіторного ефекту на агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові було визначено фракції, що містили

дезінтегрин. Ці фракції було об'єднано, знесолено та сконцентровано за допомогою центрифуги Amicon-3.

За допомогою електрофорезу у 10%-ому ПААГ в системі Лемлі було перевірено склад отриманого матеріалу. Було виявлено низькомолекулярний компонент фракції, який відповідає молекулярній масі 18-20 кДа (Рис. 4.3).

#### 4.1.2. Хроматографічне фракціонування отрути *Calloselasma rhodostoma*

Для фракціонування отрути гладенького, або острівного, щитомордника *Calloselasma rhodostoma*, розчин отрути 90 мг у 1 мл буферу 0,025 М Tris HCl pH 7,4 нанесли Blue-Sepharose.

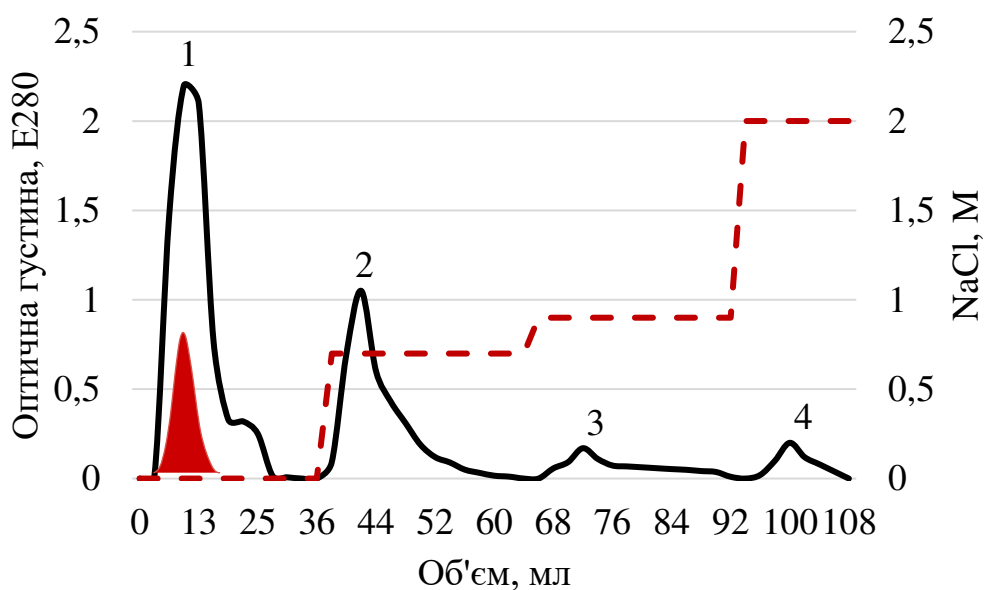


Рис. 4.4. Хроматограма фракціонування цільної отрути *Calloselasma rhodostoma* за допомогою йонообмінної хроматографії на Blue-Sepharose. 1 – не зв'язана з носієм за даних умов, та фракції; елюйовані при 0,7 М NaCl (2), 0,9 М (3), 2 М NaCl (4). Червоною зоною показано аліквоти фракції, що містили інгібітор агрегації тромбоцитів

Було використано буфер 0,025 М Tris HCl рН 7,4 і отримано наступні фракції: не зв'язана з носієм за даних умов та фракції, елюйовані при 0,7 М NaCl, 0,9 М та 2 М NaCl (Рис. 4.4).

У складі фракцій, елюйованих за іонної сили 2 М NaCl було виявили компонент, здатний ініціювати фібриноутворення. Як відомо, у змії роду *Calloselasma* у складі отрути є тромбіноподібний ензим, який отримав назву Анцистрон та був успішно застосований для визначення концентрації фібриногену в зразках плазми крові людини.

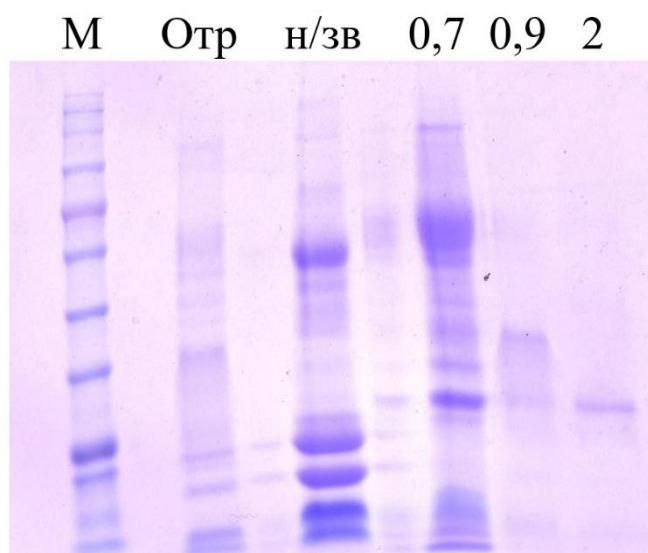


Рис. 4.5 Електрофореграма фракцій отрути *Calloselasma rhodostoma*, отриманих за допомогою йонообмінної хроматографії на Blue-Sepharose, які містили інгібітор агрегації тромбоцитів. М – маркери молекулярної маси (kDa); 250, 130, 100, 70, 66, 35, 25, 15, 10; Отр – зразок отрути, що наносили; н/зв – фракція, що не зв'язалася з носієм за даних умов; 0,7 0,9 і 2 – фракції, які було отримано відповідними концентраціями NaCl

Фракцію, що не зв'язалася з Blue-Sepharose за даних умов, було додатково очищено на Q-Sepharose. У ході хроматографії було отримано фракції з використанням концентрації NaCl 0,08, 0,15, 0,5 та 2 М (Рис. 4.6).

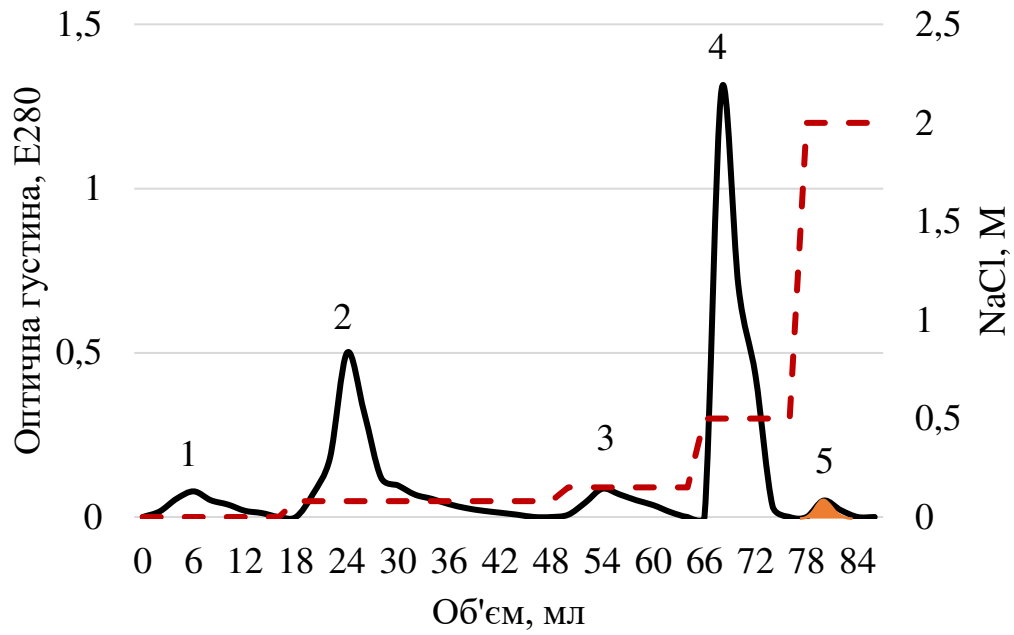


Рис. 4.6. Хроматограма додаткової очистки дезінтегрин-вмісної фракції отрути *Calloselasma rhodostoma* на Q-Sepharose. 1 – фракція, що не зв'язалася з носієм за даних умов та фракції, які було елюйовано при концентрації NaCl 0,08 (2), 0,15 (3), 0,5 (4) та 2 М (5). Червоною зоною показано аліквоти фракції, що містили інгібітор агрегації тромбоцитів

М Зразок 1 2 3 4 5

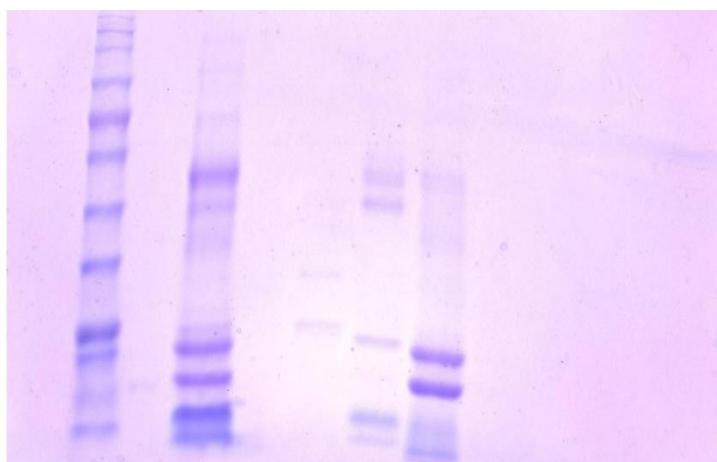


Рис. 4.7. Електрофореграма фракцій, отриманих за допомогою іонообмінної хроматографії цільної отрути *Calloselasma rhodostoma* на Q-Sepharose. М – маркери молекулярної маси; Зразок – цільна отрута; н/зв – матеріал, що не зв'язався з носієм за даних умов; 1, 2, 3, 4 – фракції, що елюювались за концентрації 0,08 М NaCl, 0,15 М NaCl, 0,5 М NaCl та 2 М NaCl відповідно;.

Отримані фракції було проаналізовано за допомогою гелі-електрофорезу в системі Лемлі. У та виявлено у складі фракції, яку елюювали за концентрації NaCl 2 М, було виявлено низькомолекулярний компонент (Рис. 4.7).

Фракцію, яка виявилася здатною інгібувати агрегацію тромбоцитів, елюювали за концентрації 2 М NaCl. Для додаткової очистки та знесолення було проведено хроматографію, що розділяє за розміром, на Superdex-G75 prepgrade (Рис. 4.8).

Нами було показано, що фракції 4 і 5 здатні інгібувати агрегацію тромбоцитів. Ці фракції було об'єднано, знесолено та сконцентровано за допомогою центрифуги Amicon-3.

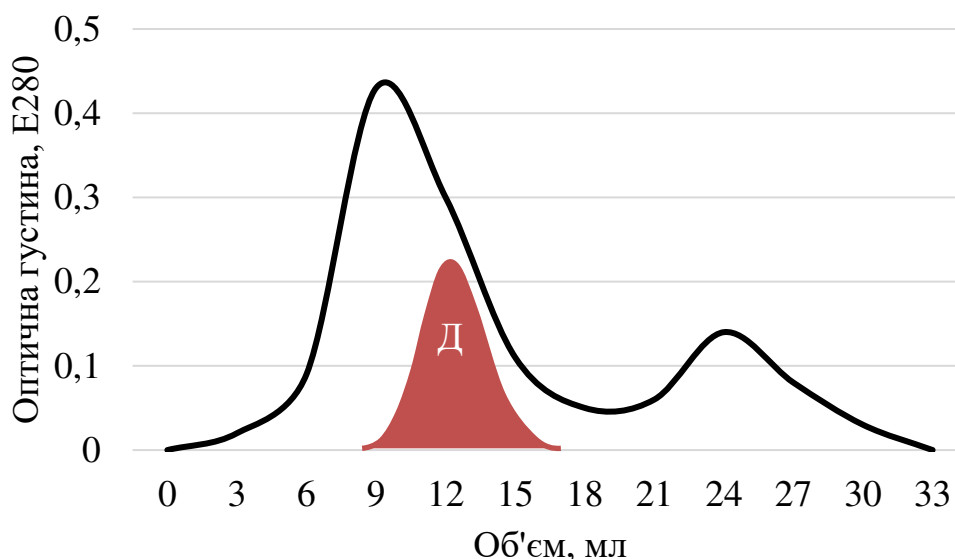


Рис. 4.8. Профіль елюції дезінтегрину з отрути *Calloselasma rhodostoma* на Superdex-G75 prepgrade. Д – фракції, що містили інгібітор агрегації тромбоцитів.

#### 4.1.3. Хроматографічне фракціонування отрути *Echis multisquamatus*

Для отримання фракції з отрути ефи багатолускової (*Echis multisquamatus*), що містить дезінтегрин, 100 мг цільної отрути, розчиненої у 1 мл буферу 0,05 М Tris HCl pH 8,9, нанесли на Q-Sepharose (1x10 см). Було використано буфер 0,05 М Tris HCl pH 8,9 й отримано наступні фракції: не зв'язана з носієм за даних умов, і ті, що було елюйовано при 0,15 М NaCl, 0,25 М NaCl, 0,5 М NaCl, 1 М NaCl.



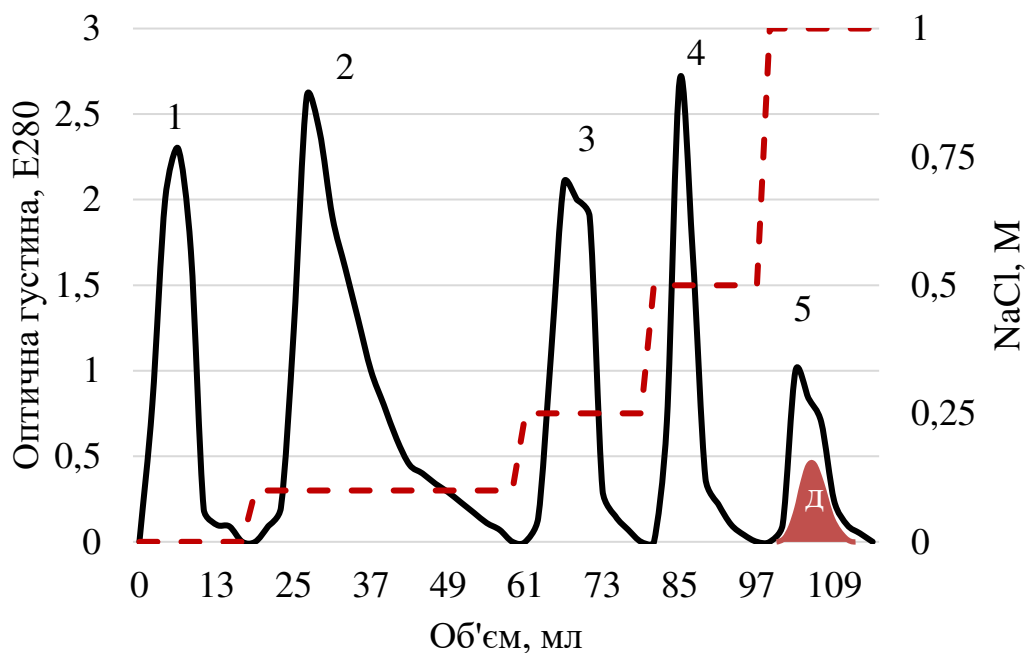


Рис. 4.9. Хроматограма фракціонування цільної отрути *Echis multisquamatus* за допомогою йонообмінної хроматографії на Q-Sepharose. 1 - фракція, що не зв'язалась з носієм за даних умов; фракції, що було елюйовано при 0,15 М NaCl (2), 0,25 М NaCl (3), 0,5 М NaCl (4), 1 М NaCl (5). Червоною зоною показано аліквоти фракції, що містили інгібітор агрегації тромбоцитів

Отримані фракції було проаналізовано за допомогою гелелектрофорезу в системі Лемлі та виявлено у складі фракції, яку елюювали за концентрації NaCl 1М, низькомолекулярний компонент (Рис. 4.10).

Фракцію, яка виявилася здатною інгібувати агрегацію тромбоцитів, елюювали за концентрації 1 М NaCl. Для додаткової очистки та знесолення було проведено хроматографію, що розділяє за розміром, на Superdex-G75 pregrade.

Ідентифіковано фракції, здатні інгібувати агрегацію тромбоцитів. Ці фракції було об'єднано, знесолено та сконцентровано за допомогою центрифуги Amicon-3.

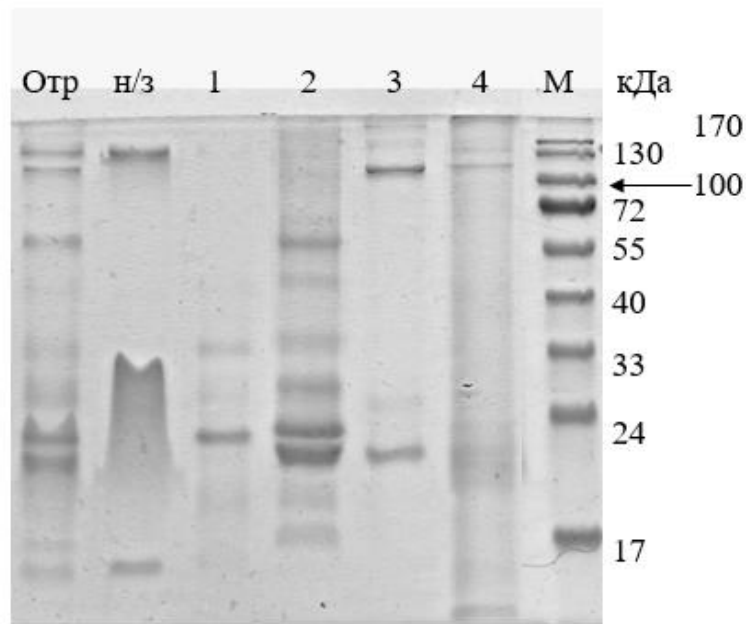


Рис. 4.10. Електрофореграма фракцій, отриманих за допомогою іонообмінної хроматографії цільної отрути *Echis multisquamatus* на Q-Sepharose. Отр – цільна отрута; н/з – матеріал, що не зв'язався з носієм за даних умов; 1, 2, 3, 4 – фракції, що елюювались за концентрації 0,15 М NaCl, 0,25 М NaCl, 0,5 М NaCl, 1 М NaCl відповідно; М – маркери молекулярної маси.

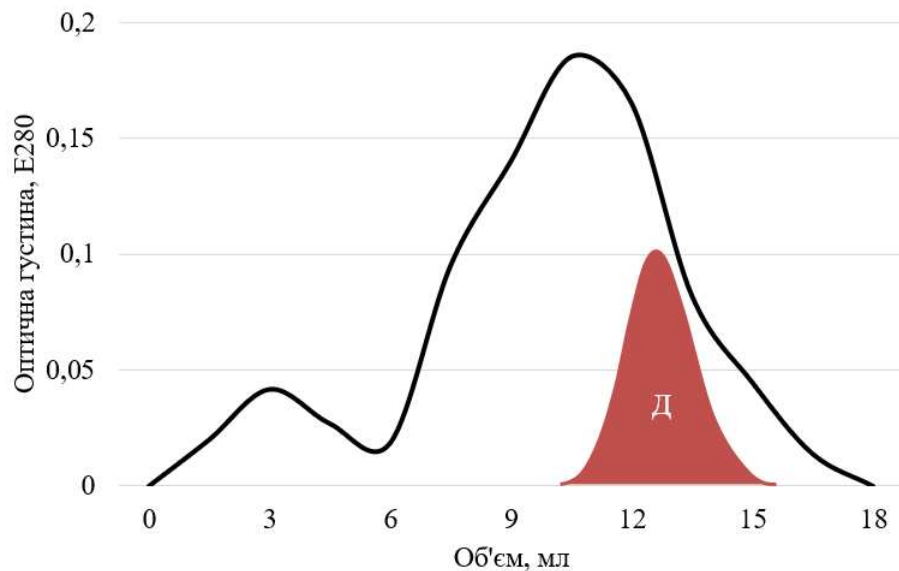


Рис. 4.11. Профіль елюції дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* на Superdex-G75 prepgrade. Д – фракції, що містили інгібітор агрегації тромбоцитів.

Таким чином, у ході роботи було розроблено хроматографічні протоколи отримання низькомолекулярних компонентів отрути змії *Bitis arietans*, *Calloselasma rhodostoma* та *Echis multisquamatus*. Очищено та ідентифіковано протеїнові компоненти кожної з отрут, здатні інгібувати агрегацію тромбоцитів. Наступним кроком стала їхня характеристика та поглиблений аналіз їхньої дії на тромбоцити.

## 4.2. Характеристика дезінтегринів

### 4.2.1. Дія на тромбоцити

Дезінтегрин з отрути *Bitis arietans* помірно інгібував агрегацію тромбоцитів, діючи передусім на другу хвилю агрегації (Рис. 4.12).

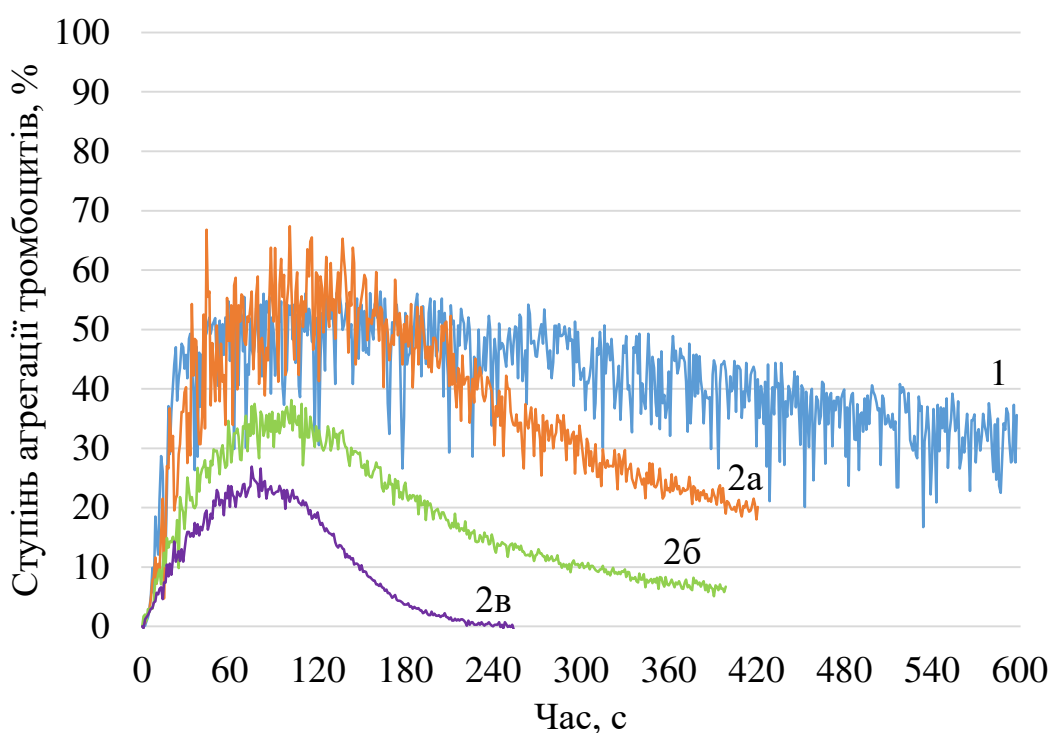


Рис 4.12. Агрегатограма ADP-індукованої агрегації тромбоцитів за інгібіторної дії дезінтегрину з отрути *Bitis arietans* у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини. 1 – контроль, 2а – концентрація фракції 0,025 мг/мл, 2б – 0,125 мг/мл, 2в – 0,250 мг/мл.

За концентрації 0,15 мг/мл дезінтегрин з отрути *Calloselasma rhodostoma* повністю інгібував здатність тромбоцитів агрегувати під дією АДФ. Водночас, концентрації нижче 0,025 мг/мл інгібіторної дії не мали (Рис. 4.13.).

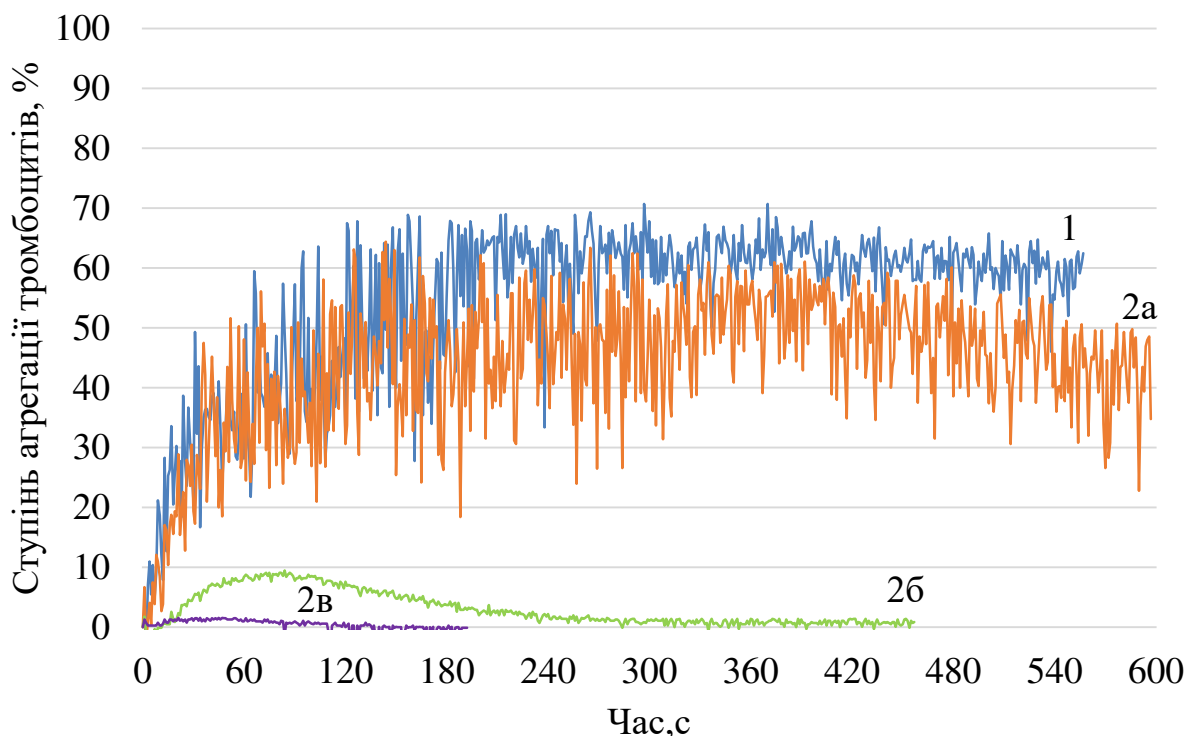


Рис. 4.13. Агрегатограма ADP-індукованої агрегації тромбоцитів за інгібіторної дії дезінтегрину з отрути *Calloselasma rhodostoma* у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини. 1 – контроль; 2 – 0,025 мг/мл; 3 – 0,1 мг/мл; 4 – 0,15 мг/мл.

Інгібіторну дію отриманого дезінтегрину визначали за допомогою агрегатометрії та оцінювали концентраційну залежність інгібіторного ефекту на агрегацію тромбоцитів.

Було показано, що дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* виявляв інгібіторну активність у широкому діапазоні концентрацій від 0,025 до 0,2 мг/мл, при цьому повного інгібування агрегації тромбоцитів не було досягнуто (Рис. 4.14.).

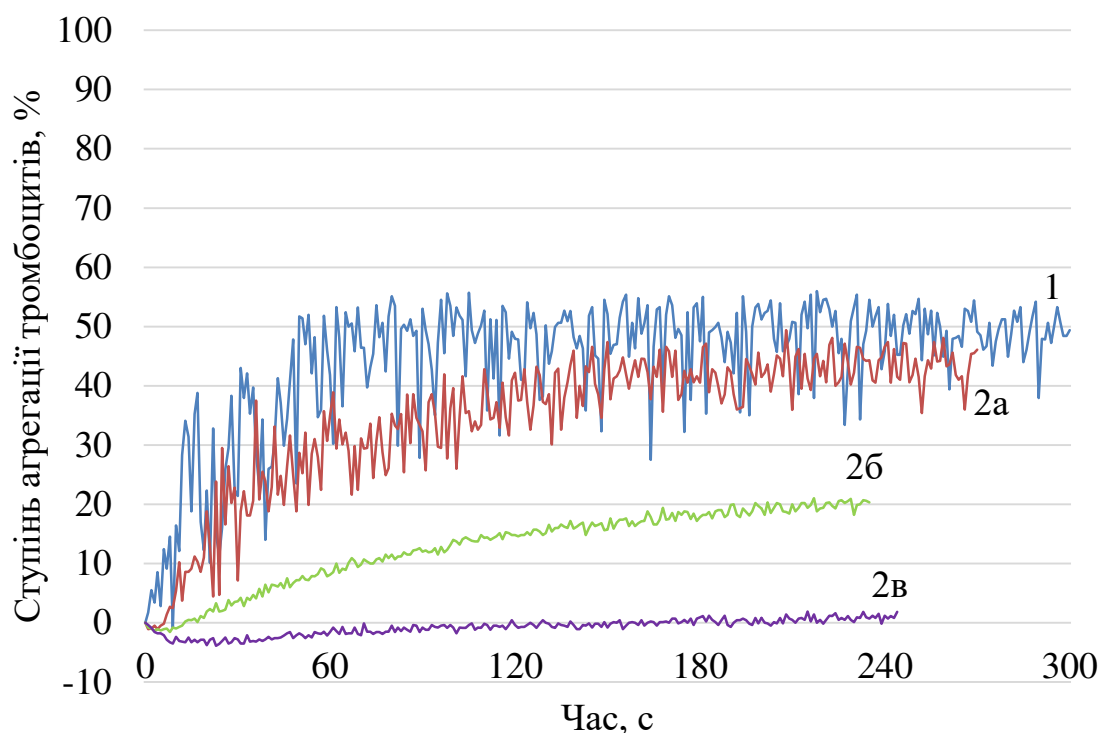


Рис 4.14. Агрегатограми концентраційної залежності інгібіторної дії дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини. 1 – контроль, 2 – концентрація фракції 0,025 мг/мл, 3 – 0,100 мг/мл, 4 – 0,200 мг/мл.

Таким чином, було виявлено, що всі три низькомолекулярні протеїни досліджуваних отрут мали здатність інгібувати агрегацію тромбоцитів, а за високої концентрації – повністю запобігати агрегації тромбоцитів. При цьому, найбільш ефективним інгібітором виявився протеїн з отрути *Echis multisquamatus*.

Для подальшої характеристики інгібіторного ефекту протеїнів на тромбоцити було досліджено їхню здатність взаємодіяти з GPIIb/IIIa-рецептором тромбоцитів. Зокрема, тромбоцити людини, позбавлені компонентів плазми крові, іммобілізували в лунках 96-лункового планшету та вивчали зв'язування з ними моноклонального анти-GPIIb антитіла за присутності досліджуваних протеїнів. У разі, коли протеїни взаємодіяли з

рецепторами, а отже, конкурували з антитілом, сигнал анти-мишачих кон'югованих антитіл зменшувався.

Така постановка експерименту не лише дозволяла довести, що досліджувані протеїни мали спорідненість до GРІІbIIIa-рецепторів, але і давала змогу порівняти ефективність взаємодій кожного з протеїнів за рівної концентрації.

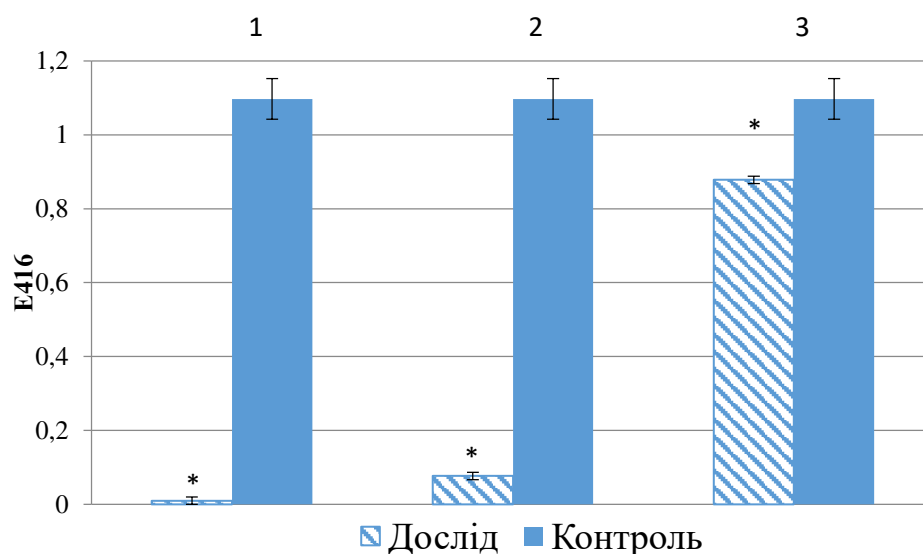


Рис. 4.15. Імуноензимний аналіз зв'язування анти-GRPIIb з активованими тромбоцитами в присутності дезінтегринів. Дані представляють середні значення  $\pm$  стандартна похибка (дані 3 типових експериментів, виконаних по 5 разів),  $p < 0,05$  порівняно з контролем. 1 – *Echis multisquamatus*; 2 – *Bitis arietans*; 3 – *Calloselasma rhodostoma*.

Було показано, що всі три досліджувані протеїни були дезінтегринами – тобто, володіли здатністю зв'язуватися з GРІІbIIIa-рецептором тромбоцитів (рис. 4.15). Саме з цим і пов'язано їхню інгібіторну дію на агрегацію тромбоцитів. Окрім того, дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* виявився найефективнішим, у зв'язку з чим надалі його було обрано як основу для потенційного терапевтичного агенту, для чого було необхідно його ідентифікувати, а також ґрунтовно дослідити його дію на процеси агрегації тромбоцитів та проліферацію пухлин клітин більш детально.

#### 4.2.2. Високоєфективна рідинна хроматографія та мас-спектрометричний аналіз дезінтегринів

Отримані дезінтегрини було проаналізовано за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометричного аналізу. Пробопідготовку здійснювали за допомогою високоєфективної рідинної хроматографії (HPLC), який також дозволяв визначати однорідність фракції (Рис. 4.16, 4.18, 4.20).

Фракцію дезінтегрину з отрути *Bitis arietans* було очищено за допомогою HPLC та проаналізовано за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії [183]. Виявлено 2 поліпептиди з масою 13,7 та 9,0 кДа. Піки зі співвідношенням маси до заряду 6,8 та 4,5 відповідають їхнім молекулам з  $\frac{1}{2}$  заряду (Рис. 4.17).

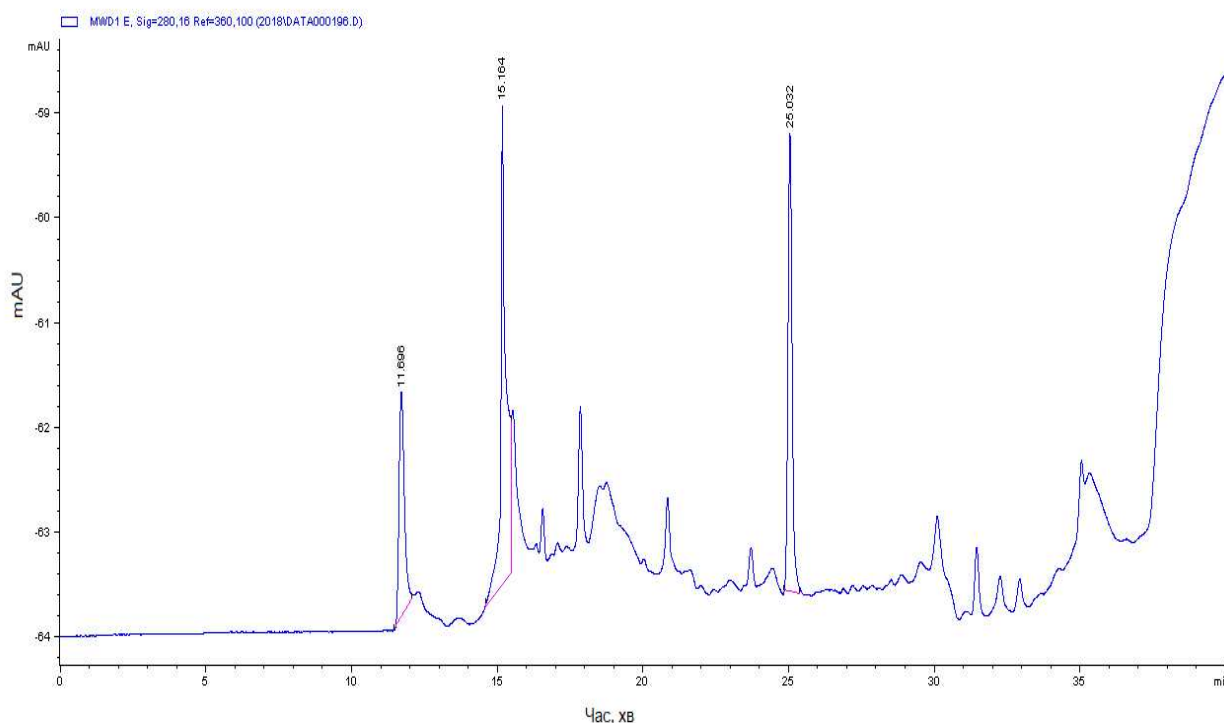


Рис. 4.16. Розділення фракції отрути *Bitis arietans*, яка містила дезінтегрин, за допомогою високоєфективної рідинної хроматографії на Zorbax C18 SB300 у градієнті ацетонітрилу та трифтороцтової кислоти.

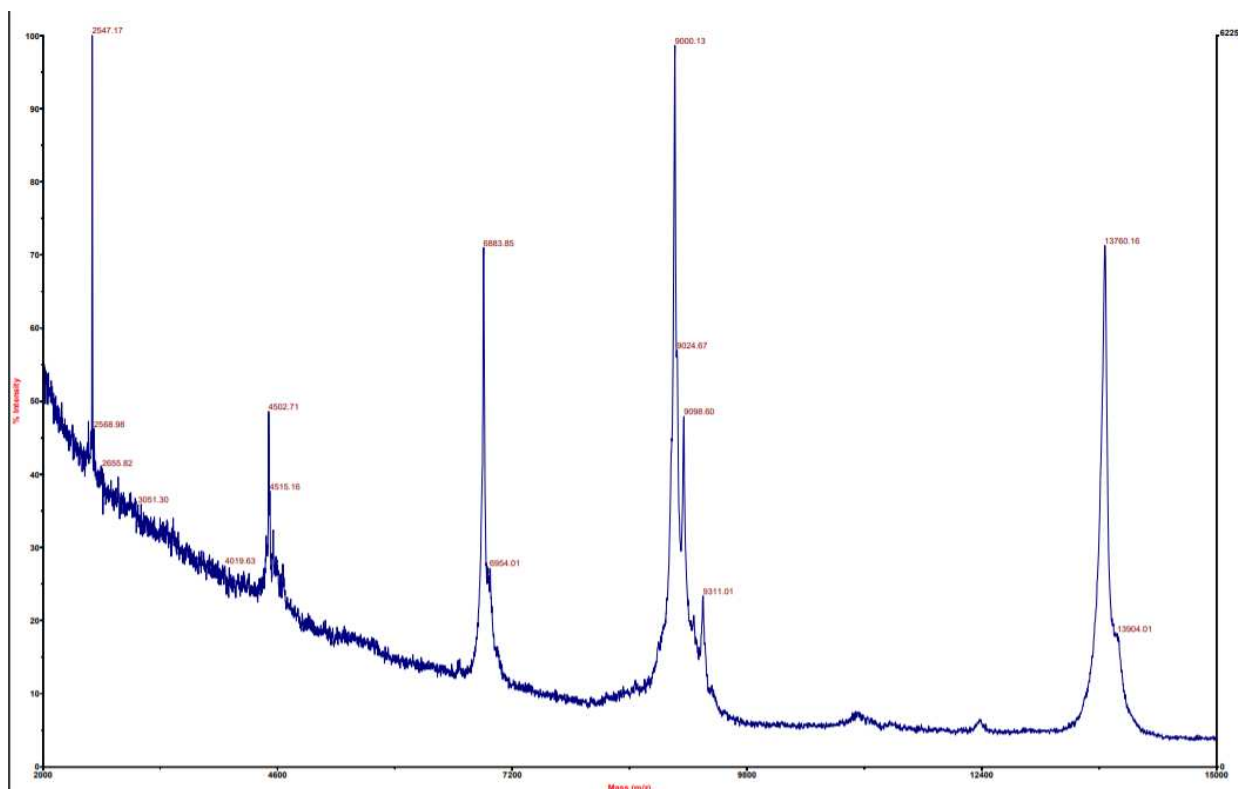


Рис. 4.17. Мас-спектрометричний аналіз дезінтегрину з отрути *Bitis arietans*.

Аналогічно було очищено та ідентифіковано молекулярні маси дезінтегринів з отрут *Calloselasma rhodostoma* (рис. 4.18, 4.19) та *Echis multisquamatus* (рис. 4.20, 4.21).

Проведений мас-спектрометричний аналіз дозволив виявити у складі фракції отрути *Calloselasma rhodostoma* протеїновий компонент з молекулярною масою 13.116 Da.

Зразок дезінтегрину, отриманий з отрути *Echis multisquamatus*, містив у своєму складі протеїновий компонент з молекулярною масою 14887 Da.

Таким чином, завдяки поєднанню методу високоефективної рідинної хроматографії та мас-спетрометрії було визначено точні молекулярні маси отриманих дезінтегринів з отрут *Bitis arietans*, *Calloselasma rhodostoma* та *Echis multisquamatus*, які становили 13,7 (ізоформа 9 кДа), 13.1 kDa та 14,9 kDa



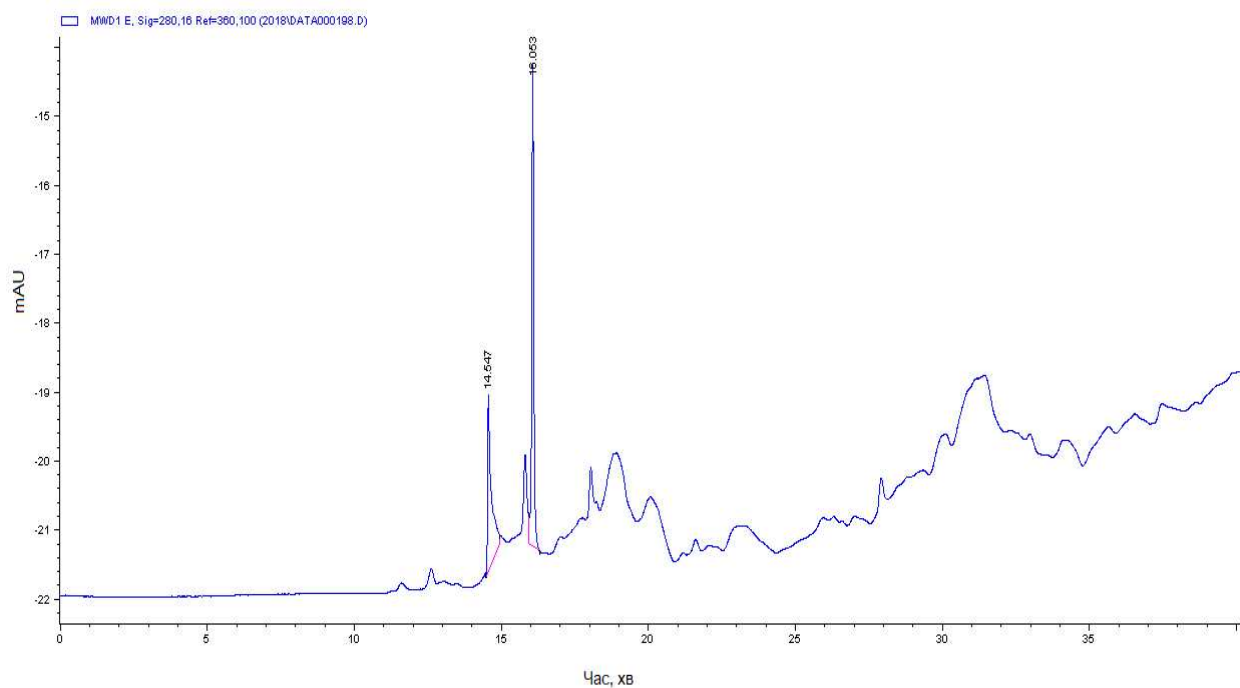


Рис. 4.18. Розділення фракції отрути *Calloselasma rhodostoma*, яка містила дезінтегрин, за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії на Zorbax C18 SB300 у градієнті ацетонітрилу та трифтороцтової кислоти.

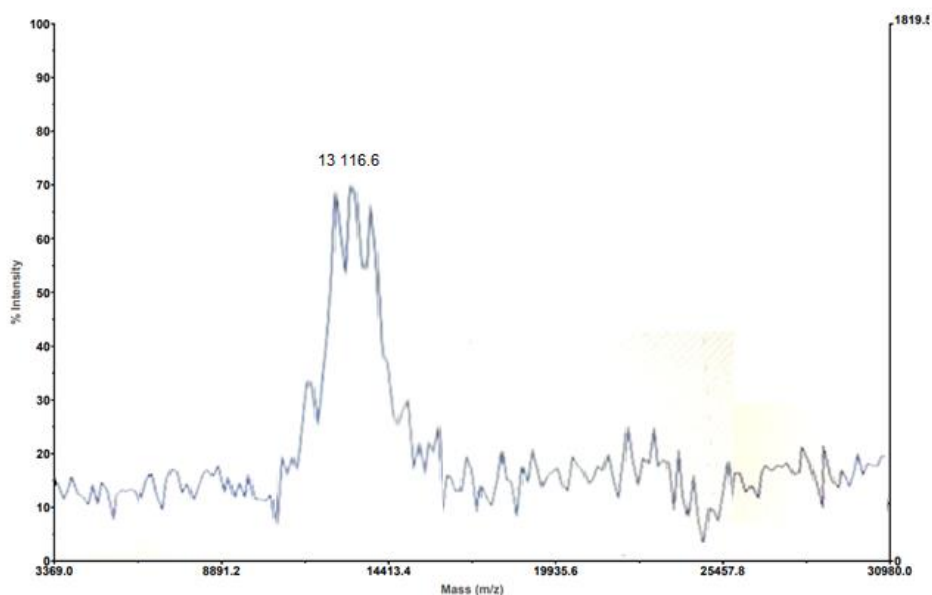


Рис. 4.19. Мас-спектрометричний аналіз дезінтегрину з отрути *Calloselasma rhodostoma*.

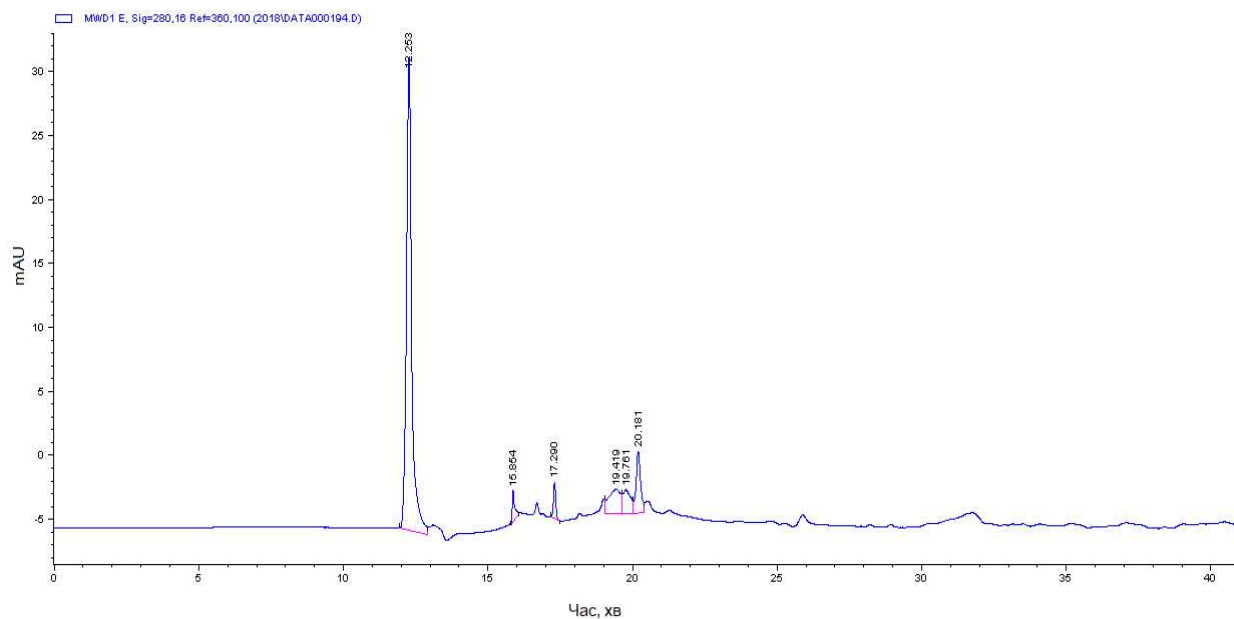


Рис. 4.20. Підготовка для мас-спектрометрії фракції отрути *Echis multisquamatus*, яка містила дезінтегрин, за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії на Zorbax C18 SB300 у градієнті ацетонітрилу та трифтороцтової кислоти.

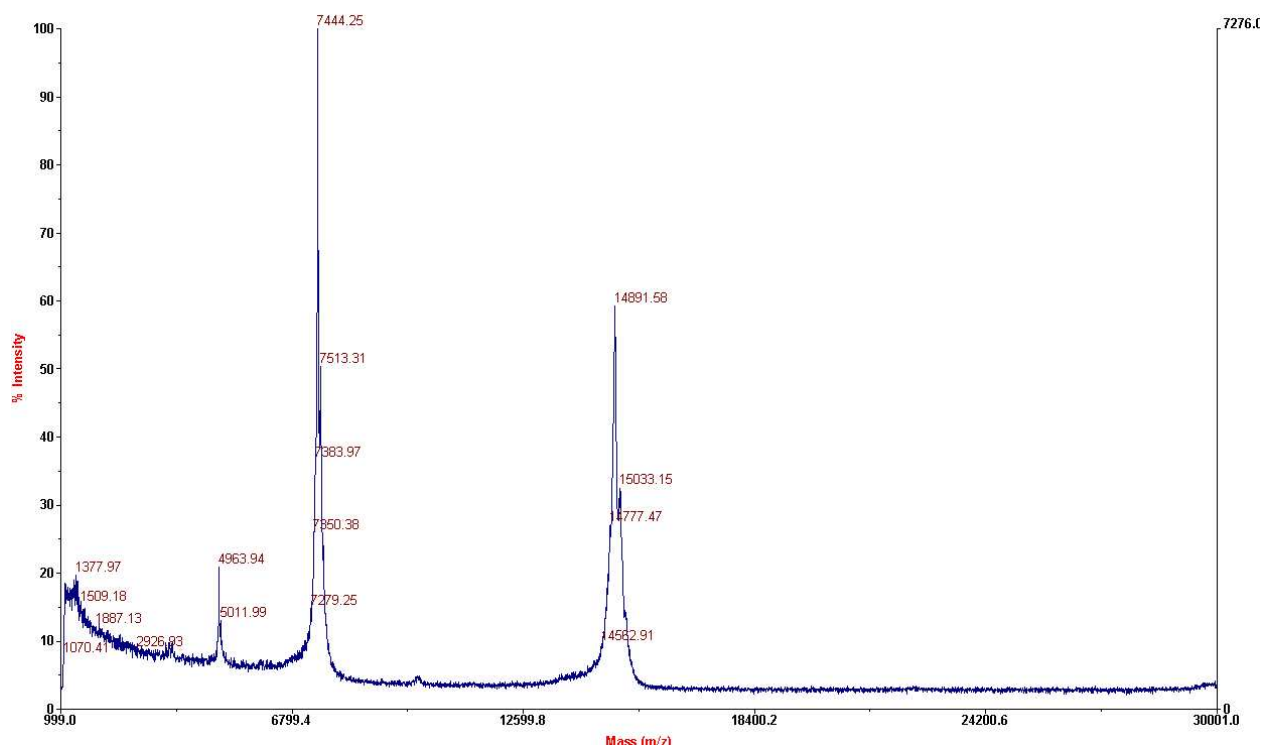


Рис. 4.21. Мас-спектрометричний аналіз дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*.

## Розділ 5. Ідентифікація дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*

Був проведений амінокислотний аналіз зразку протеїну з отрути *Echis multisquamatus* у розрахунку на 100 мг зразку. Для гідролізу було взято 3,3 мг протеїну, об'єм гідролізату – 5 мл.

Таблиця 5.1.

Амінокислотний склад дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*

Амінокисл.	Кількість Мк/моль	Кількість мг	% по Мк/моль	% по мг
Лізин	18,900	2,7594	6,26	7,28
Гістидин	8,338	1,2924	2,76	3,41
Аргінін	14,751	2,5667	4,89	6,77
Асп. Кисл.	47,349	6,2975	15,69	16,61
Треонін	10,868	1,2932	3,60	3,41
Серин	19,122	2,0078	6,34	5,30
Глут. Кисл.	21,439	3,1515	7,10	8,31
Пролін	29,077	3,3438	9,63	8,82
Гліцин	29,328	2,1996	9,72	5,80
Аланін	17,078	1,5200	5,66	4,01
Цистеїн	39,960	4,7952	13,24	12,65
Валін	10,376	1,2140	3,44	3,20
Метіонін	2,305	0,3434	0,76	0,91
Ізолейцин	5,637	0,7384	1,87	1,95
Лейцин	8,820	1,1554	2,92	3,05
Тирозин	11,250	2,0363	3,73	5,37
Фенілаланін	7,252	1,1966	2,40	3,16
<b>Сума</b>	<b>301,851</b>	<b>37,9114</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

Здійснений аналіз показав високий вміст цистеїну в досліджуваному зразку (Таблиця 5.1), що є характерним для дезінтегринів з отрути змії. Водночас, залишок аспарагінової кислоти є обов'язковою компонентою фрагментів RGD, KGD та MLD, які є ключовими у взаємодіях з GPIIb/IIIa.

Для ідентифікації дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* було необхідно здійснити мас-спектрометричний аналіз його триптичних фрагментів. Молекулярна маса дезінтегрину, виявлена за допомогою мас-спектрометрії в нативних умовах, складала 14,9 kDa (рис. 4.21).

Орієнтовна молекулярна маса, визначена за допомогою гел'єлектрофорезу, також знаходиться у цьому діапазоні (15-18 kDa). Водночас, внесення до проби  $\beta$ -меркаптоетанолу призводило до виявлення протеїну на рівні 7 kDa (рис. 5.1), що може свідчити про існування у структурі нативної молекули дисульфідних зв'язків, які розриваються у відновлених умовах.

На підтвердження цього припущення можна згадати високу кількість залишків цистеїну в протеїні. Імовірно, маємо справу з димерним протеїном, який у нативних умовах ідентифікується як 14-kDa молекула, а у відновлених – як її субодиниця з масою 7 kDa.

Протеїн було екстраговано з відповідної ділянки гелю. Окремо аналізували протеїн за присутності та у відсутності  $\beta$ -меркаптоетанолу. Після проведення трипсинолізу триптичні фрагменти було ідентифіковано за допомогою мас-спектрометрії. Цей метод дозволяє порівняти триптичні фрагменти досліджуваного протеїну з триптичними фрагментами протеїнів, амінокислотна послідовність яких уже є у базі BLAST (basic local allingment search tool).

Проведений аналіз гомології дозволив встановити найбільш подібні протеїни (таблиця 5.2, таблиця 5.3).

Для додаткової характеристики отриманого препарату нами було використано метод двомірного електрофорезу, що поєднує ізоелектричне фокусування з класичним електрофорезом, що розділяє суміші протеїнів за молекулярною масою.

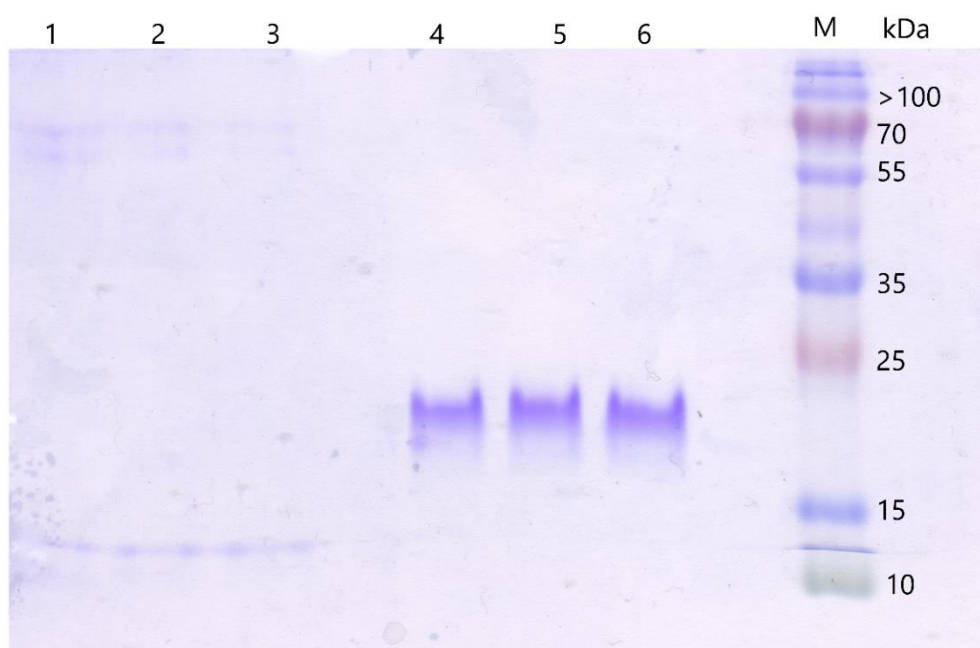


Рис. 5.1. Електрофореграма дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*. М – маркери молекулярної маси (kDa); 1-3 – за присутності  $\beta$ -меркаптоетанолу; 4-6 – за відсутності  $\beta$ -меркаптоетанолу.

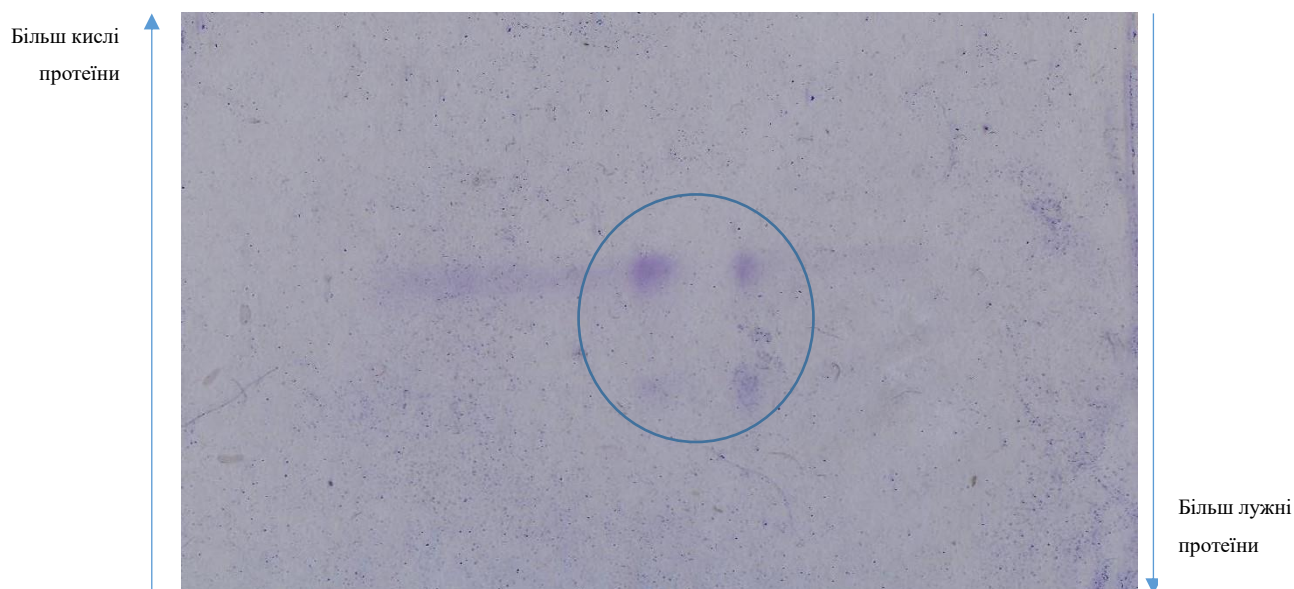


Рис. 5.2. 2D-лектрофорез зразку дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*, отриманий за відсутності  $\beta$ -меркаптоетанолу.

Проведений аналіз показав, що отриманий дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* має дві ізоформи, які відрізняються за ізоелектричною точкою, але обидві вони знаходяться у нейтральних значеннях рН (рис. 5.2).

Таблиця 5.2.

Порівняння гомології триптичних фрагментів дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* з іншими дезінтегринами отрути змій. Зразок отримано за присутності  $\beta$ -меркаптоетанолу.

Гомологія, %	Код протеїну	Назва протеїну
88,05	P81631	Дезінтегрин EC3B <i>Echis carinatus</i>
86,76	P0C6A3	Дезінтегрин EMS11A <i>Echis multisquamatus</i>
73,85	P83043	Дезінтегрин CC8A <i>Cerastes cerastes</i>
73,44	P0C6A7	Дезінтегрин VB7B <i>Vipera berus berus</i>
56,64	P82465	Дезінтегрин EC6 $\alpha$ -субодиниця <i>Echis carinatus sochureki</i>

Таблиця 5.3.

Порівняння гомології триптичних фрагментів дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* з іншими дезінтегринами отрут змій. Зразок отримано за відсутності  $\beta$ -меркаптоетанолу.

Гомологія, %	Код протеїну	Назва протеїну
86,76	P0C6A3	Дезінтегрин EMS11A <i>Echis multisquamatus</i>
84,62	P83043	Дезінтегрин CC8A <i>Cerastes cerastes</i>
53,03	P82465	Дезінтегрин EC6 $\alpha$ -субодиниця <i>Echis carinatus sochureki</i>
35,65	Q3BER4	Дезінтегрин EO5A <i>Echis ocellatus</i>
29	P0C6B0	Дезінтегрин VLO5B <i>Macrovipera lebetina obtusa</i>

Проведений аналіз підтвердив припущення про те, що досліджуваний дезінтегрин є димером двох ідентичних або близьких за структурою субодиниць, оскільки висока ступінь гомології виявлена до одних і тих же протеїнів для обох проб.

Зокрема, виявлено гомологію понад 85 % з дезінтегрином EMS11A *Echis multisquamatis*. Про цей протеїн відомо, що він має молекулярну масу близько 7 кДа. Імовірно, ми виявили його димерну форму, у якій субодиниці сполучено дисульфідними зв'язками.

Володіючи отриманою інформацією, ми отримали можливість спрогнозувати просторову структуру гомодимерної молекули дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* за методом, описаним у розділі 2.3.9 (рис. 5.3).

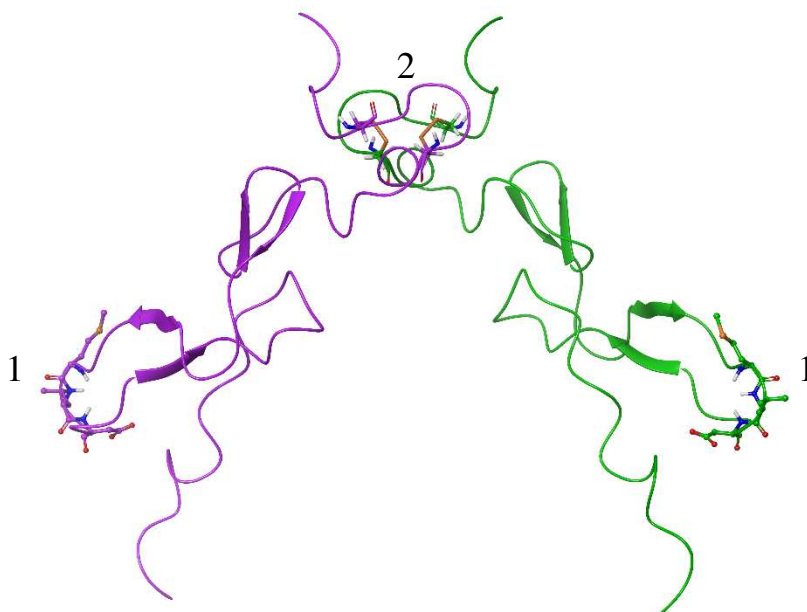


Рис. 5.3. Передбачена просторова структура дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis*. Мономери структури виділені різними кольорами. 1 – послідовність (MLD), яка відповідає за зв'язування з інтегриновими рецепторами, 2 – два дисульфідних містка (Cys7-Cys12) між мономерами.

Результати трипсинолізу та відповідна гомологія показала, що отриманий нами дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatis* є майже ідентичним до

EMS11A (UniProt P0C6A3). Структуру мономерної молекули EMS11A було передбачено за допомогою AlphaFold 3. Додатково було використано кристалографічну структуру гетеродимеру дезінтегрину з отрути *Echis carinatus* (echistatin) з роздільною здатністю 1,9 Å (PDB ID: 1TEJ). Підготовку цих структур проводилась наступним чином: були додані відсутні атоми H, побудовані дисульфідні зв'язки, оптимізовано водневі зв'язки і проведено мінімізацію енергії. Після чого мономер EMS11A було накладено на структуру гетеродимеру, після чого було побудовано дисульфідні зв'язки між двома молекулами. На останньому етапі було використано енергетичну мінімізацію для релаксації геометрії.



## Розділ 6. Антиагрегантна дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*

### 6.1. Антиагрегантна дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* *ex vivo*

Досі антиагрегантну активність дезінтегринів ми досліджували на збагаченій тромбоцитами плазмі крові умовно здорових донорів. Для перевірки доцільності використання дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* як прототипу антитромботичного агенту нами було досліджено його здатність інгібувати агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові жінок з ускладненою вагітністю [184]. Ми проаналізували ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у плазмі крові 13 жінок. Потім до кожного зі зразків плазми крові було додано 0,075 мг/мл дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*. У всіх випадках відбувалося зменшення ступеня агрегації тромбоцитів, у середньому, вдвічі (Рис. 6.1).

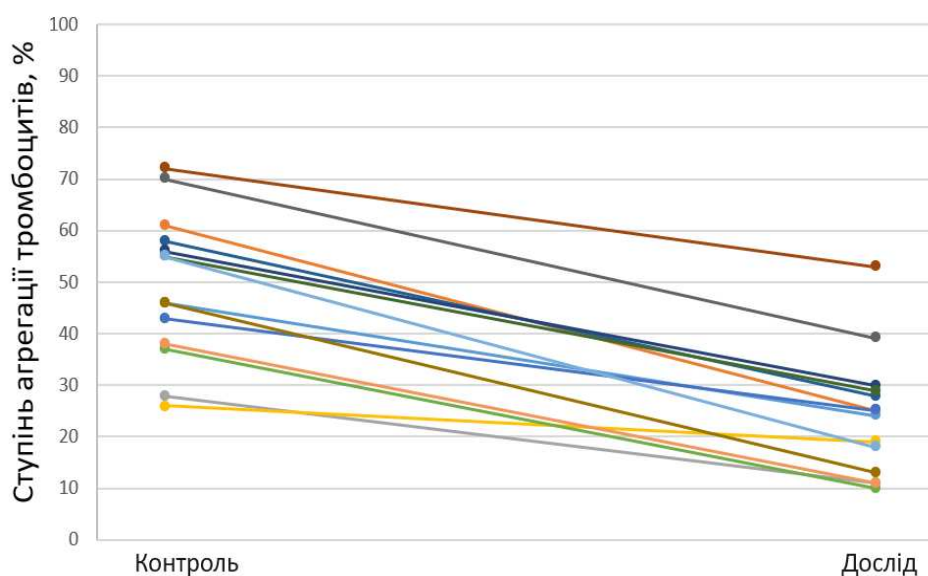


Рис. 6.1. Порівняння ступеню агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові вагітних жінок (n = 13) за відсутності (контроль) та за присутності дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*.

Важливо, що досліджуваний дезінтегрин виявився ефективним у всіх зразках, які ми вивчали. Окрім того, застосування зразків збагаченої тромбоцитами плазми крові вагітних жінок дозволило перевірити, наскільки ефективною є інгібіторна дія дезінтегрину за умов прийому антикоагулянтів та за аспіринорезистентності.

Зокрема, було перевірено досліджуваний дезінтегрин у збагаченій тромбоцитами плазмі крові пацієнтки, яка приймала аспірин. Було показано, що дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatis* знижував ступінь агрегації тромбоцитів на тлі адміністрації аспірину вдвічі (Рис. 6.2).

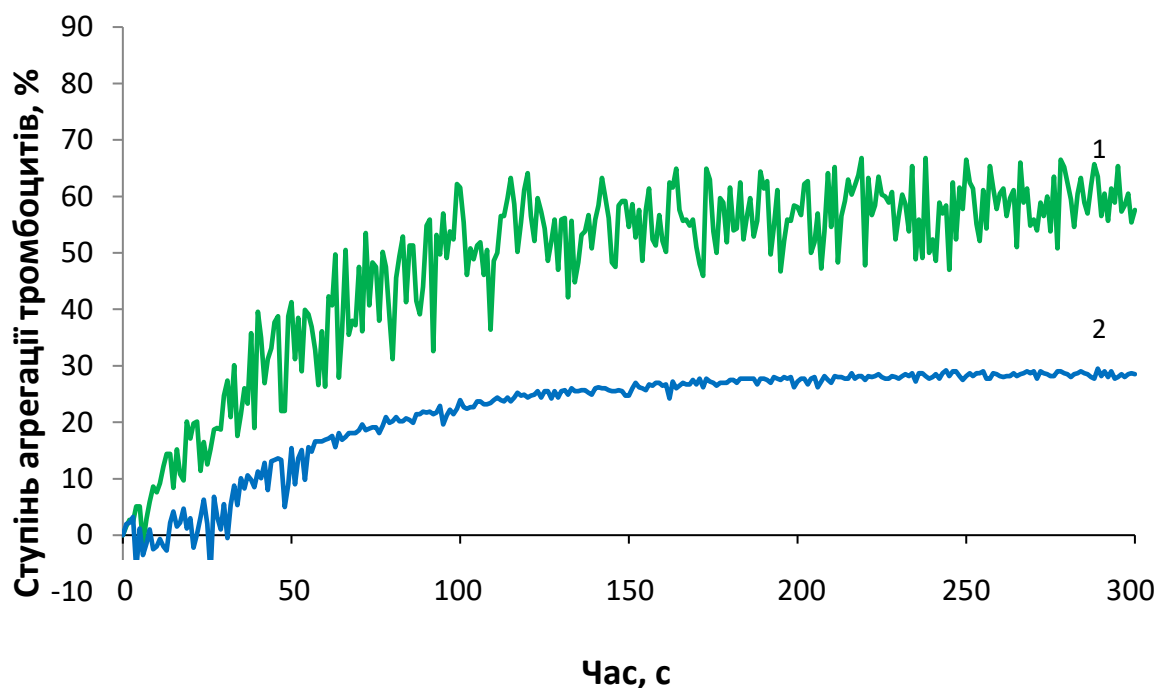


Рис. 6.2. Дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові вагітної жінки на фоні адміністрації аспірину. 1 – контроль; 2 – дослід.

Так само дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatis* ефективно пригнічував агрегацію тромбоцитів і на фоні адміністрації гепарину, зокрема знижував ступінь агрегації тромбоцитів на 70 % (Рис. 6.3).

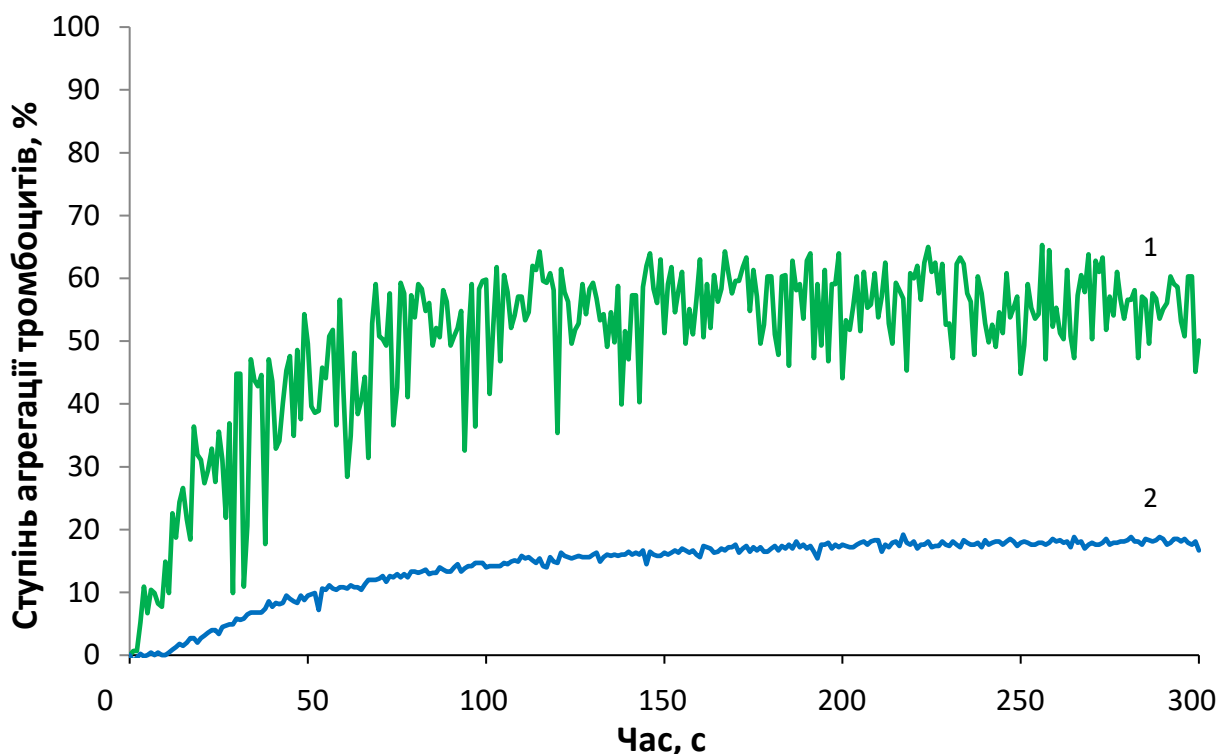


Рис. 6.3. Дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові вагітної жінки на фоні адміністрації низькомолекулярного гепарину. 1 – контроль; 2 – дослід.

Важливою проблемою, зокрема і під час вагітності, є аспіринорезистентність. Зокрема, 20 % людей є нечутливими до антиагрегантної дії аспірину. Оскільки діагностику аспіринорезистентності, як правило, не проводять, важливим є пошук антикоагулянтів, які б не залежали від генетичних особливостей пацієнтів [185].

Нами було проаналізовано дію дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* на агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові вагітної, яка мала діагностовану нечутливість до аспірину. Показано, що дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatis* знижує ступінь та швидкість ADP-індукованої агрегації тромбоцитів (Рис. 6.4). Отже, його можна розглядати як потенційну платформу для створення антиагрегантного препарату, придатного до застосування за умов аспіринорезистентності.

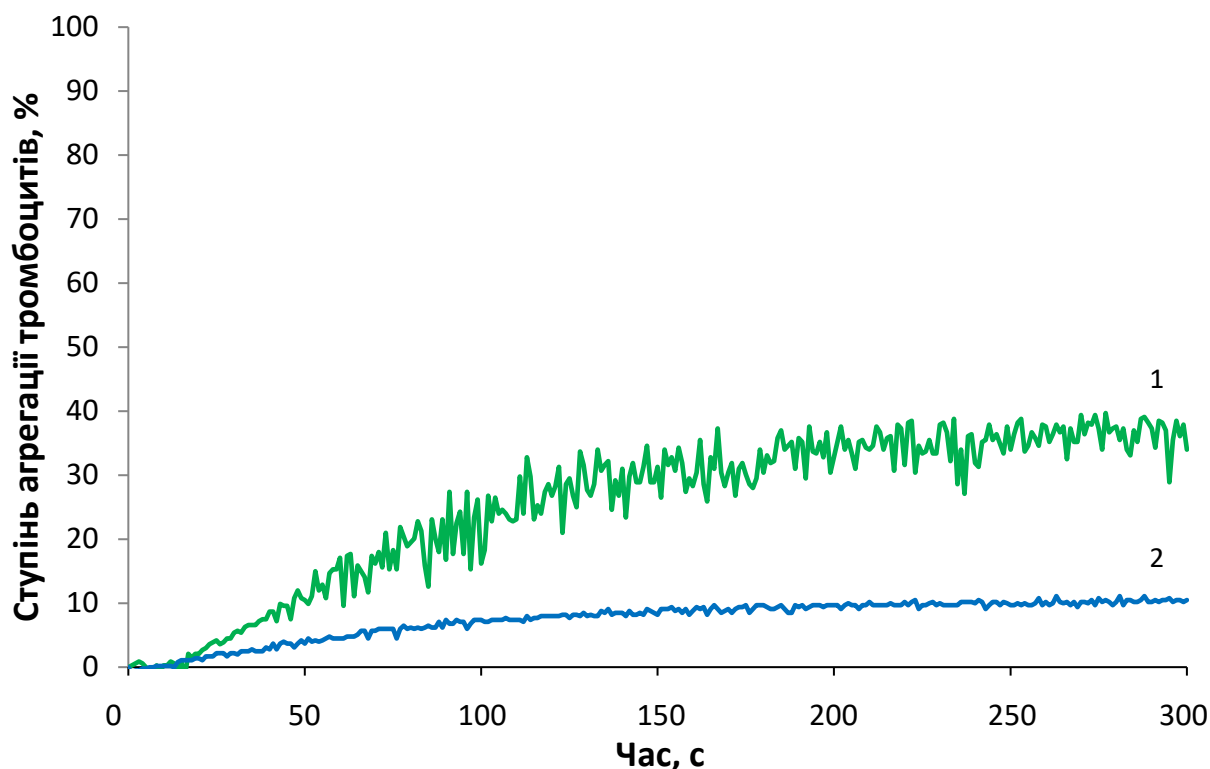


Рис. 6.4. Дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові вагітної жінки на фоні адміністрації низькомолекулярного аспіринорезистентності. 1 – контроль; 2 – дослід.

## 6.2. Антиагрегантна дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* за умов внутрішньовенного введення щурам *in vivo*

Наступним етапом досліджень була перевірка можливості застосування дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* для зниження прокоагулянтного потенціалу тромбоцитів *in vivo*. Для цього білим щурам лінії Вістар вводили розчин дезінтегрину у хвостову вену в кількості 0,750 мг/кг маси тіла. Контрольним тваринам вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину. Через 30 хв забирали кров пункцією серця та вивчали ADP- та колаген-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові [186].

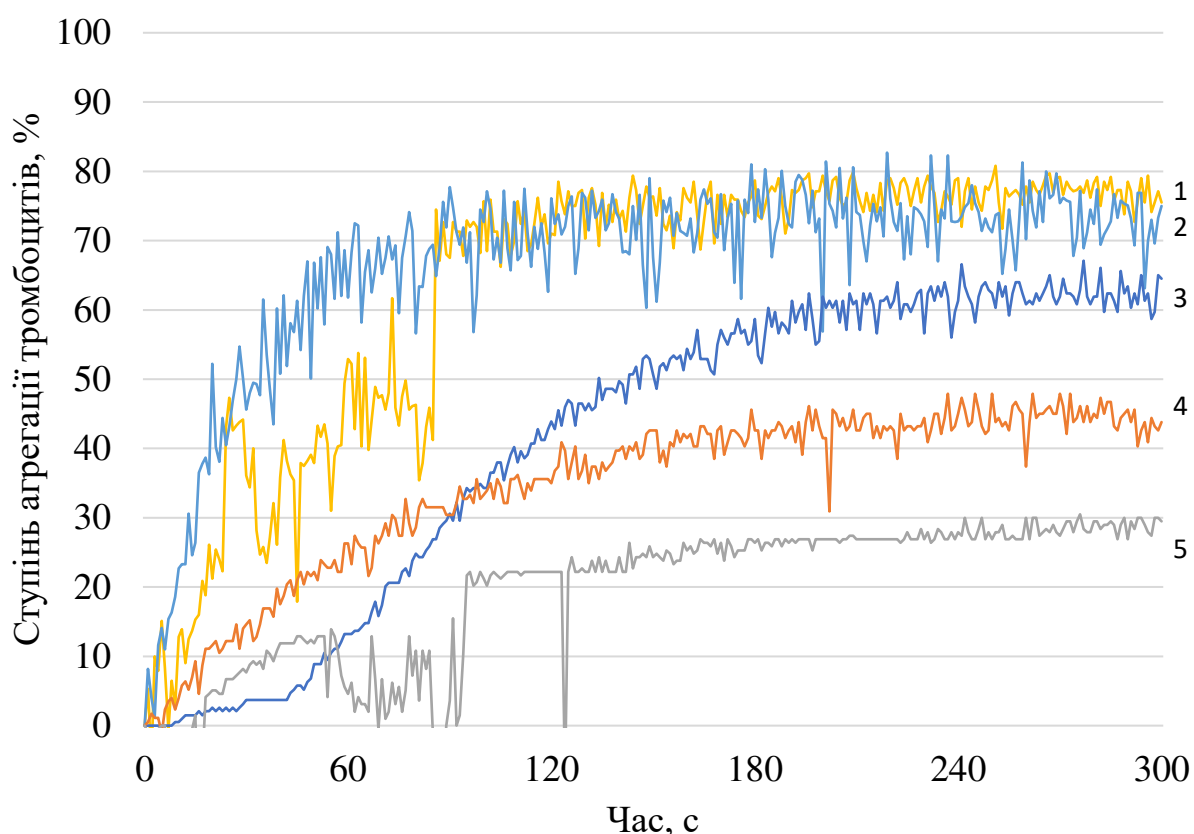


Рис. 6.5. Дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* на ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів за умов внутрішньовенного введення. 1, 2 – контрольні щури; 3, 4, 5 – за умов введення 0,750 мг/кг дезінтегрину.

Показано зниження швидкості агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів після внутрішньовенного введення дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis*. Зокрема, швидкість ADP-індукованої агрегації було знижено в 3-5 разів (Рис. 6.5). Також було знижено ступінь та подовжено lag-період колаген-індукованої агрегації тромбоцитів (Рис. 6.6).

Таким чином, досліджуваний дезінтегрин забезпечував ефективну антиагрегантну дію і за умов введення *in vivo*.

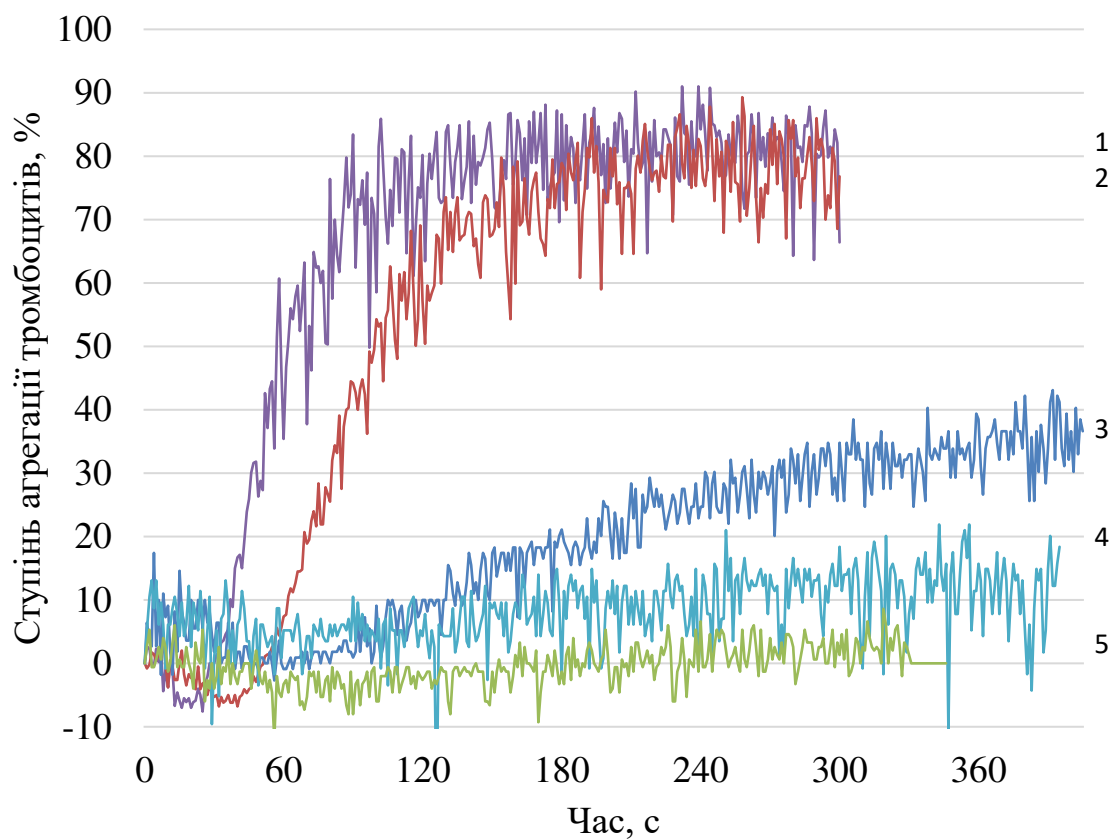


Рис. 6.6. Дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatis* на колаген-індуковану агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові щурів за умов внутрішньовенного введення. 1, 2 – контрольні щури; 3, 4, 5 – за умов введення 0,750 мг/кг дезінтегрину.

## Розділ 7. Антипроліферативна дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*

### 7.1. Антипроліферативна дія на пухлинні клітини в культурі

Оскільки інтегринові взаємодії є ключовими для прикріплення пухлинних клітин, було вирішено перевірити здатність отриманого дезінтегрину пригнічувати проліферативну активність пухлинних клітин у культурі. Для дослідження було використано клітини лінії карциноми легень Льюїс (LLC), та HeLa. Також було використано клітини лінії BV-2 (мікроглії миші) та МАЕС (клітин ендотелію аорти миші).

Дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* застосовували у концентрації 0,08-2 мкг/мл. Проліферативну активність клітин визначали за допомогою МТТ-тесту, обчислювали значення IC50 для кожної з досліджуваних культур клітин. Зафіксовано показники IC50, які мали близькі значення для всіх досліджуваних ліній клітин (3-7 мкг/мл), проте для HeLa цей показник був найнижчим (Рис. 7.1).

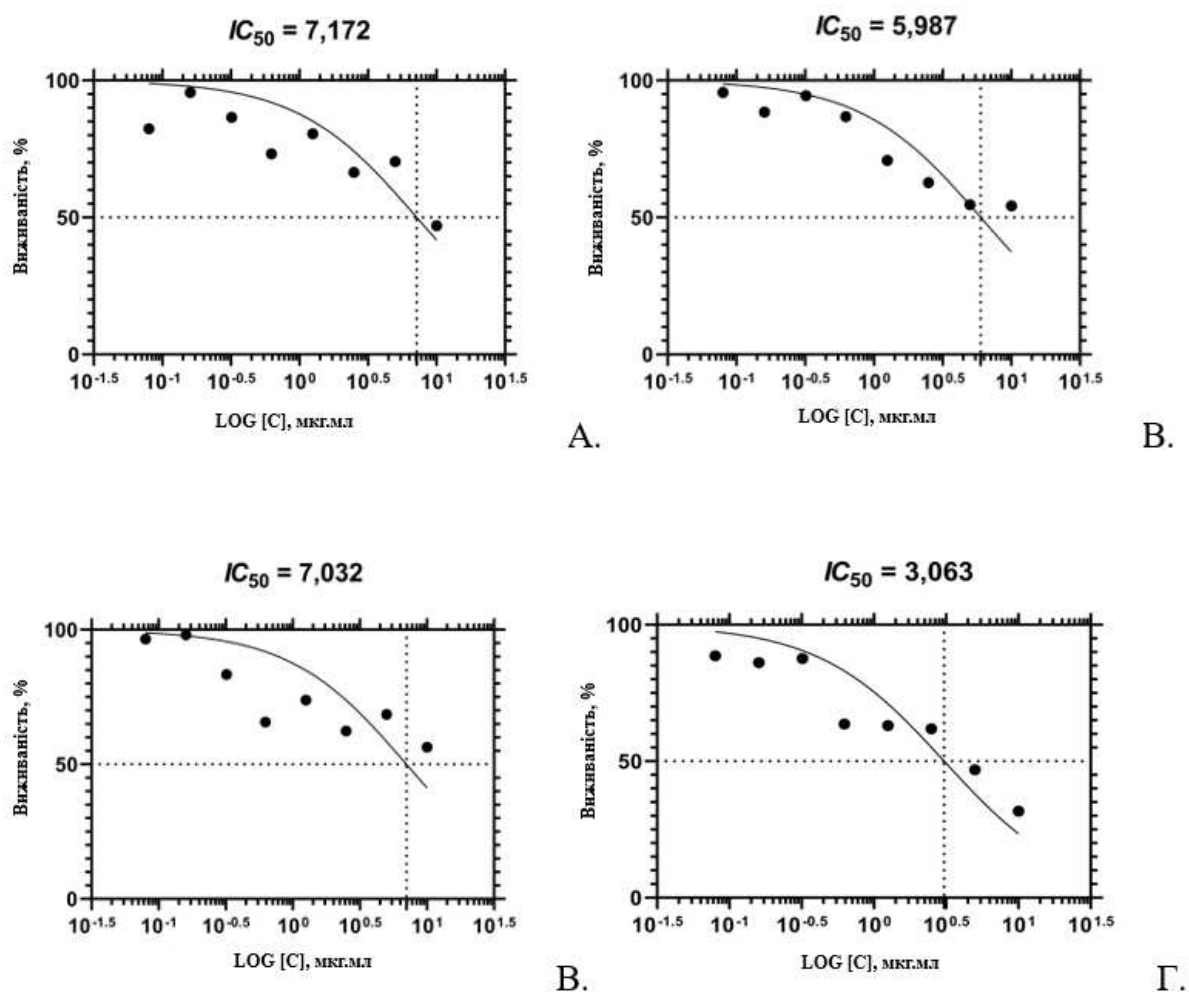


Рис. 7.1. Дані МТТ-тесту, визначені за впливу дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* в діапазоні концентрацій 0.008-2 мкг/мл, на клітини первинної культури карциноми легені Льюїс LLC (А), BV-2 (Б), МАЕС (В) та HeLa (Г).

Іншим важливим показником впливу дезінтегрину на клітини досліджуваних ліній було пригнічення субстрат-залежного росту. Так, понад 50 % клітин лінії HeLa не були прикріплені до дна планшету за концентрацій дезінтегрину 0.25-2 мкг/мл (Рис. 7.2А). Відсоток прикріплених клітин лінії МАЕС не зазнавав значних змін та знаходився в межах 80 % у дослідженому діапазоні концентрацій (Рис. 7.2Б).



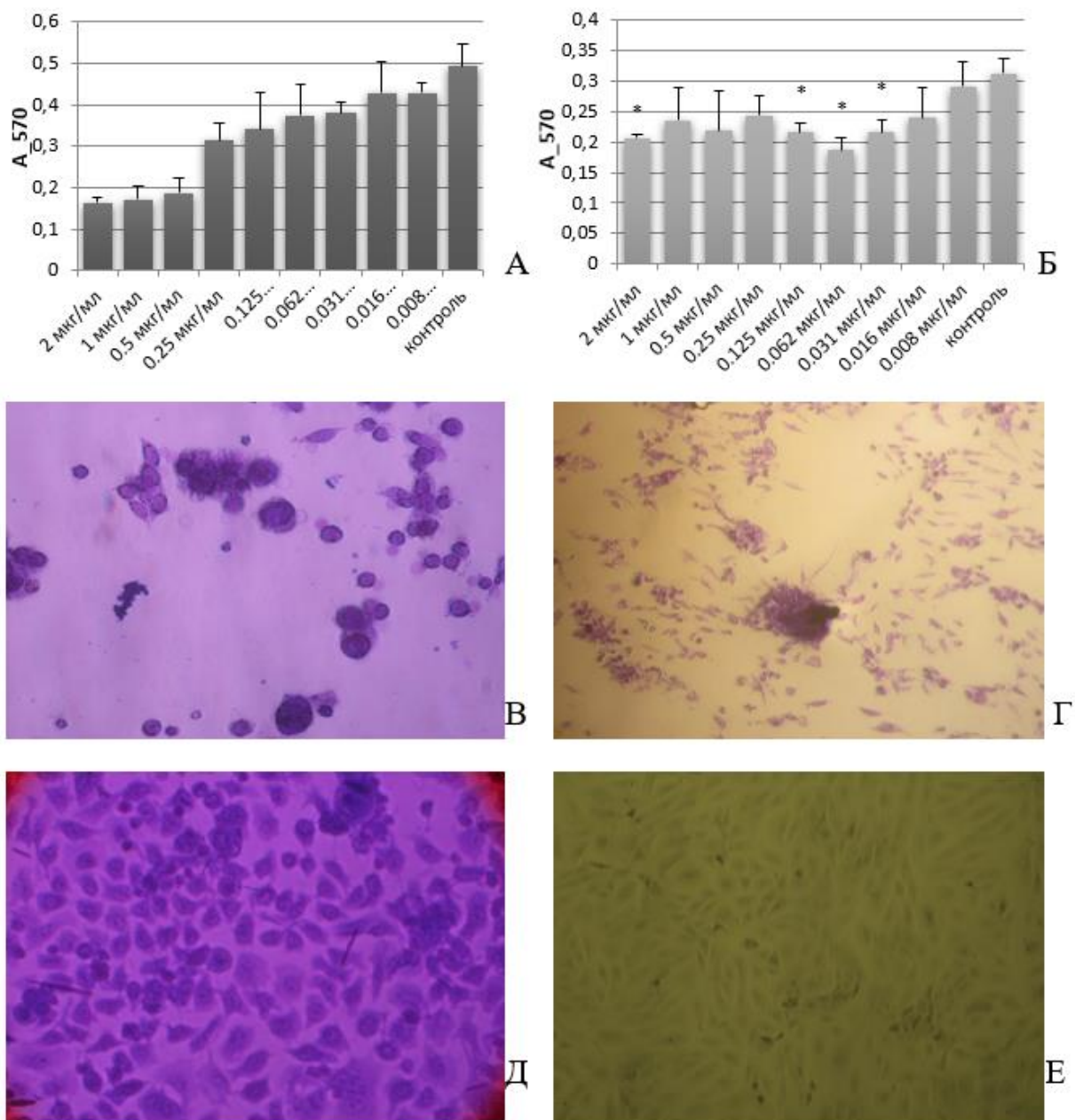


Рис. 7.2. Показники сумарної адгезії клітин HeLa (А) та МАЕС (Б) за впливу дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* при інкубації протягом доби. Зовнішній вигляд клітин лінії HeLa (збільшення x100) та МАЕС (збільшення x200) за культивування протягом доби з 2 мкг/мл дезінтегрину (В і Г відповідно) та у контролі (Д і Е відповідно).

\*- $P < 0.05$ , проти контролю.

Пряме дослідження швидкості прикріплення клітин до субстрату за дії дезінтегрину проводили з використанням первинної культури

перещеплюваної карциноми легень Льюїс (LLC). Інтенсивність прикріплення клітин за присутності дезінтегрину була достовірно нижчою, порівняно з відповідним контролем (Рис. 7.3). Таким чином, дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* достовірно інгібував прикріплення пухлинних клітин до поверхні.

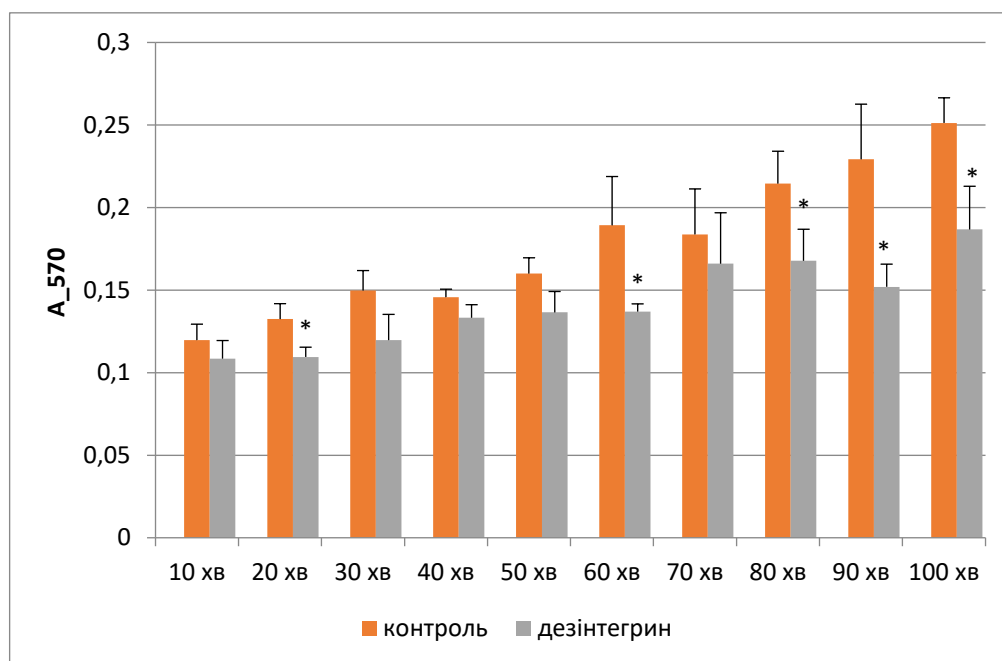


Рис. 7.3. Швидкість прикріплення клітин за впливу дезінтегрину на клітини LLC протягом 100 хвилин \*-P<0.05, проти контролю

Також вивчали дію досліджуваного дезінтегрину на фази клітинного циклу. Для цього клітини інкубували з дезінтегрином протягом 2 діб в умовах повного поживного середовища, що містило 10 % ЕТС.

Для клітин мікроглії миші лінії BV-2 виявлено суттєві відмінності в клітинному циклі, зокрема зниження вмісту клітин в G2/M+S в 1,3 рази (Таблиця 7.1).

Дезінтегрин незначно збільшував вміст клітин лінії МАЕС в фазі G0/G1. Також спостерігали зменшення кількості клітин в проліферативному пулі (Таблиця 7.2).

Таблиця 7.1.

Розподіл клітин мікроглії BV-2 за фазами циклу за присутності дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*

№ зразку	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	G2/M+S+ (%)
Контроль	24,92	28,07	47,01	75,08
Дезінтегрин	36,67*	22,26*	41,07*	63,33*

\*-P<0.05, проти контролю; # -P<0.05, проти умов культивування за умов повного поживного середовища. C-57 Black

Таблиця 7.2

Розподіл клітин ендотелію лінії МАЕС за фазами циклу під впливом дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*

№ зразку	G0/G1 (%)	G2/M (%)	S (%)	G2/M+S+ (%)
Контроль/FBS	43,70	15,61	40,69	56,30
Дезінтегрин/FBS	49,12*	18,32	32,55	50,87

\*-P<0.05, проти контролю; # -P<0.05, проти умов культивування за умов повного поживного середовища.

Для інтерпретації даних слід розуміти, що клітини у фазі G0/G1 перебувають у стані спокою (G0) або у фазі першого інтервалу (G1). Фаза G0 – стан спокою, коли клітини не діляться, а перебувають у тимчасовій або постійній зупинці циклу. Фаза G1 – період підготовки до синтезу ДНК: клітина росте, накопичує енергію та синтезує необхідні протеїни.

Частка клітин у фазі синтезу (S) свідчить про реплікацію ДНК. Це критична стадія підготовки до поділу, оскільки тут подвоюється генетичний матеріал.

Клітини у фазі G2/M знаходяться у фазі другого інтервалу (G2) та мітозу (M). G2 – це період після завершення синтезу ДНК, коли клітина перевіряє цілісність геному, завершує підготовку до поділу. M (мітоз) – клітина ділиться на дві дочірні.

G2/M+S – це сукупний відсоток клітин у фазах G2, M та S. Цей параметр показує загальну частку клітин, які активно діляться або готуються до поділу.

Отримані результати свідчать про зміни у розподілі клітин, за умов впливу дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*, між різними фазами у порівнянні з контролем. Зокрема, спостерігали підвищення частки клітин у фазі G0/G1, що вказує на затримку клітин у стані спокою або на ранніх етапах підготовки до поділу. Водночас, відзначено зниження частки клітин у фазах G2/M та S, що свідчить про зменшення кількості клітин, які активно реплікують ДНК та проходять мітотичний поділ. Сумарний показник G2/M+S (%) також зменшився, що вказує на загальне зниження проліферативної активності клітин.

Отримані результати можуть свідчити про антипроліферативну дію дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*, яка, ймовірно, реалізується через затримку клітин у фазі G0/G1 та гальмування переходу до фаз активного поділу. Це узгоджується з даними літератури щодо впливу антагоністів інтегринів на регуляцію клітинного циклу та можливих механізмів їх протипухлинної дії.

Таким чином, проведені дослідження вказують на пригнічення виживаності, проліферації та прикріплення клітин за присутності дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*. Ці ефекти були більше виражені у випадку клітин з трансформованим фенотипом та свідчать про перспективність застосування дезінтегрину як основи для створення антипроліферативного препарату.

## **7.2. Протипухлинна та антиметастатична дія дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus in vivo***

### **7.2.1. Протипухлинна дія *in vivo***

Для оцінки протипухлинної дії дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus in vivo* перевивали клітини лінії карциносаркоми Уокера W-256 щурам лінії Вістар та спостерігали за динамікою росту пухлини. Дослідній групі вводили

інтраперитонально дезінтегрин у дозі 0,750 мг/кг маси тіла кожні 3 дні з моменту початку експерименту.

Для цього вивчали зміни об'єму пухлини у щурів контрольної та дослідної груп на 9-ту, 11-ту, 14-ту доби після перещеплення. Визначення діаметр пухлини у двох напрямках та розраховували об'єм пухлини, гальмування росту пухлини та індекс ефективності впливу чинника.

При порівнянні отриманих результатів відмічали тенденцію до зменшення об'єму пухлини у щурів дослідної групи упродовж спостереження та достовірне зменшення об'єму пухлини на фоні застосування дезінтегрину на 11-ту добу росту (Таблиця 7.3). Гальмування росту пухлини, яке є одним з критеріїв ефективності впливу досліджуваної речовини, було відмічене в період інтенсивного росту пухлини і складало на 9-ту добу після перещеплення 18,7 %, а на 11-ту добу – 36,2 %. Розрахунок індексу ефективності, як показника чутливості пухлини до впливу досліджуваних речовин, становив 1,23 (9 доба) і 1,56 (11 доба).

Таблиця 7.3.

Вплив дезінтегрину на динаміку показників росту пухлини у щурів

Група контролю (n=5)				Група досліді (n=5)		
Доба після перещеплення	Довжина, см	Ширина, см	Об'єм, см <sup>3</sup>	Довжина, см	Ширина, см	Об'єм, см <sup>3</sup>
9 доба	4,94±0,7	3,62±0,5	46,04±16,6	4,46±0,6	3,68±0,3	37,42±11,7
11 доба	5,66±0,5	4,76±0,6	78,02±21,0 [21,3 :63,5]	4,78±0,7	4,18±0,5	49,92±19,2* [25,3 :56,2]
14 доба	4,05±0,2	4,75±0,2	39,0±5,7 [42,6 :96,1]	4,65±0,4	4,85±0,4	52,3±4,1 [26,0 :66,0]

Проведені дослідження засвідчили, що застосування дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* призводило до гальмування росту карциносаркоми Уокера W-256 на 9-ту на 11-ту добу після перещеплення

пухлини щурам. Виявлений гальмівний ефект був помірний, та менший, ніж очікуваний ефект при застосуванні протипухлинних засобів. З точки зору механізму дії дезінтегринів, слід було б очікувати зменшення якості прикріплення клітин, яке за умов перевивання пухлини не є вирішальним. Тому надалі було вирішено досліджувати метастазування пухлинних клітин за умов введення пухлиноносіям дезінтегрину, що за нашим припущенням точніше відповідало призначенню потенційного препарату на його основі.

### 7.2.2. Антиметастатична дія *in vivo*

Клітини лінії карциноми легень Льюїс (LLC) перевивали мишам-самцям лінії C57BL. Дослідній групі вводили інтраперитонально дезінтегрин у дозі 15 мг/кг маси тіла щодня з моменту початку експерименту. Гальмування росту пухлини дезінтегрином на 20 день дослідження становило 58,13 %, але на 28 день дослідження гальмування росту пухлини за об'ємом вже становило 39,23 % (Таблиця 7.4). Подібна тенденція відповідала тому, що ми спостерігали у випадку експериментів на щурах (див. розділ 7.2.1).

Таблиця 7.4

Об'єм і гальмування росту пухлини в мишей-самців лінії C57BL із перевитою LLC і за умов застосування дезінтегрину на 20 та 28 день дослідження

Доба дослідження	Об'єм пухлини ( $M \pm m$ , см <sup>3</sup> )		Гальмування росту пухлини, %
	в контролі	в досліді	
20 доба	5,35±0,28	2,24±0,06 *	58,13
28 доба	7,01± 0,21	4,26± 0,20 *	39,23

Після забою тварин на 28 добу досліджень оцінювали кількість метастазів у легенях дослідних мишей та обчислювали гальмування метастазування у відсотках за кількістю та об'ємом (Таблиця 7.5).

Таблиця 7.5

Утворення й зростання метастазів у легенях мишей-самців лінії C57BL  
із перевитою LLC і за умов введення дезінтегрину

Дослідна група	Кількість метастазів, (M ± m, шт.)	Гальмування за кількістю метастазів, %	Об'єм метастазів, (M ± m, мм <sup>3</sup> )	Гальмування за об'ємом метастазів, %
LLC	4,6±0,46	-	6,2±1,31	-
LLC + дезінтегрин	1,0±0,35*	78,26	0,02±0,02*	99,68

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  у порівнянні з відповідним показником групи LLC.

Виявлено майже повну відсутність метастазів у мишей за умов введення дезінтегрину, що свідчить про антиметастатичну дію досліджуваної сполуки.

## Розділ 8. Заключення

Виконання роботи дозволило отримати, охарактеризувати, ідентифікувати та апробувати *in vitro*, *ex vivo* та *in vivo* дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus*, як основу для створення антикоагулянтного та антиметастатичного препарату. Принципову схему досліджень наведено на рисунку 8.1.

Аналіз агрегаційної здатності тромбоцитів за патологічних станів різного генезу у тварин дозволив виявити гіперагрегацію за гепатиту, діабету II типу, атеросклерозу, канцерогенезу (пов'язані з хронічним запаленням) та гіпоагрегацію за гепатозу, гострої променевої хвороби, LPS-індукованого запалення (пов'язані з гострим запальним процесом). Окремо досліджували агрегацію тромбоцитів за умов введення тваринам пептиду, що імітує імуногенний фрагмент S-шипа SARS-CoV-2. Така постановка експерименту імітувала гостру стадію коронавірусної хвороби. Виявлено гіпоагрегацію тромбоцитів, що є важливим внеском до розуміння патологічної дії хвороби на стан системи гемостазу (I).

Виявивши патологічні стани, за яких необхідне зниження прокоагулянтної функції тромбоцитів, ми перейшли до другого етапу досліджень – пошуку перспективних інгібіторів агрегації тромбоцитів з отрути змій.

Було розроблено хроматографічні протоколи та отримано електрофоретично чисті препарати дезінтегринів з отрут *Echis multisquamatus*, *Bitis arietans* та *Calloselasma rhodostoma*. Було доведено, що отримані поліпептиди зв'язуються саме з GPIIb/IIIa-рецептором тромбоцитів та завдяки цьому ефективно інгібують їх агрегацію (II).

Дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* було обрано для подальших досліджень як найбільш ефективний ( $IC_{50} = 1,5 \text{ мкМ}$ ). Проведені мас-



спектрометричні та біоінформатичні дослідження дозволили запропонувати модель його просторової структури (III).

Дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* показав свою ефективність як інгібітор агрегації тромбоцитів у плазмі крові людини незалежно від стану системи гемостазу або препаратів, які приймали пацієнти. Також дезінтегрин ефективно інгібував агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові донорів з діагностованою аспіринорезистентністю, що робить його перспективною платформою для розробки антиагрегантного агента. Ефективне інгібування агрегації тромбоцитів дезінтегрином показано також і за умов введення лабораторним тваринам *in vivo* (IV).

Оскільки дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* блокував взаємодії, опосередковані інтегриновими рецепторами, було вирішено застосувати його для пригнічення проліферації клітин *in vitro* та процесів канцерогенезу *in vivo*. Було показано зниження проліферативної активності та адгезії клітин у культурі за дії дезінтегрину. Виявлено пригнічення туморогенезу та майже повне блокування метастазування за умов перевивання пухлини лабораторним тваринам *in vivo* (V).

Таким чином, робота представляє собою завершений цикл пошукових робіт, який починається з вибору патологічних станів, за яких необхідне інгібування функції тромбоцитів, продовжується скринінгом отрути змій, як джерела потенційних антиагрегантних агентів, повною характеристикою та ідентифікацією поліпептидів – антагоністів інтегринових рецепторів; та завершується успішною апробацією найефективнішого дезінтегрину *in vivo*.

Окремою 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.

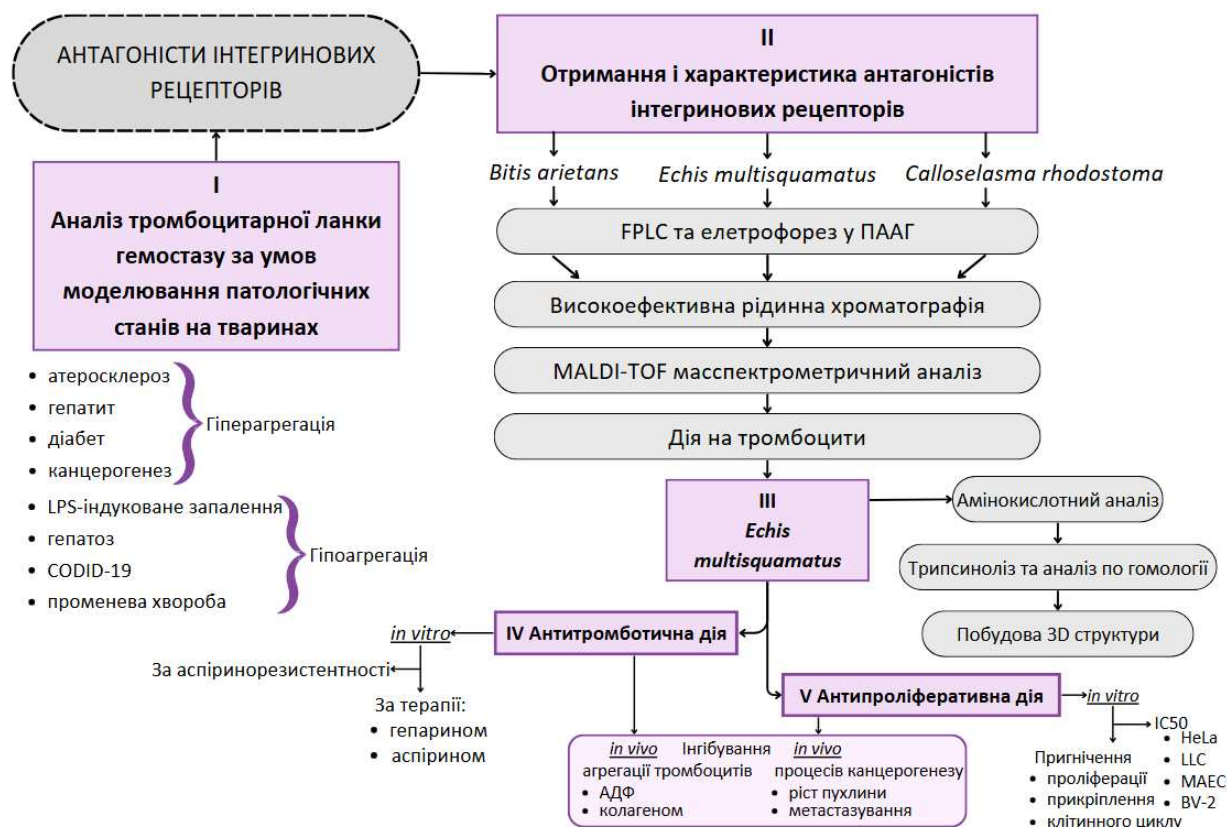


Рис. 8.1. Принципова схема дисертаційної роботи, яка відображає основні етапи дослідження: дослідження агрегаційної здатності тромбоцитів за моделювання патологічних станів різного генезу (I), отримання і характеристика антагоністів інтегринових рецепторів з отрути змій (II), ідентифікацію дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* (III), антиагрегантну дію дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* (IV), антипроліферативну дію дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* (V).

## Висновки

Доведено, що застосування антагоністів інтегринових рецепторів ефективно пригнічує інтегін-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*.

1. Виявлено зниження агрегаційної здатності тромбоцитів за гепатозу, COVID-19, гострого запалення шляхом моделювання патологічних станів, пов'язаних з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення, на тваринах. Показано збільшення прокоагулянтного потенціалу тромбоцитарної ланки гемостазу за діабету, атеросклерозу та гепатиту, що потребує корекції інгібіторами агрегації тромбоцитів.

2. Отримано електрофоретично чисті препарати інгібіторів агрегації тромбоцитів з отрути *Echis multisquamatus*, *Calloselasma rhodostoma* та *Bitis arietans*. Охарактеризовано їх дію на агрегацію тромбоцитів, доведено, що вони здатні безпосередньо взаємодіяти з GPIIb/IIIa-рецепторами тромбоцитів, що підтверджує приналежність до класу дезінтегринів.

3. Ідентифіковано дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus* та запропоновано модель його просторової структури поєднанням методів мас-спектрометрії та комп'ютерного моделювання.

4. Доведено ефективне зниження агрегації тромбоцитів за внутрішньосудинного введення дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* щурам *in vivo*.

5. Показано *ex vivo* ефективне інгібування агрегації тромбоцитів дезінтегрином з отрути *Echis multisquamatus* у збагаченій тромбоцитами плазмі осіб з аспіринорезистентністю, під час терапії гепарином та аспірином.

6. Показано пригнічення проліферативної активності клітин лінії карциноми легень Льюїс, клітин мікроглії миші (BV-2), МАЕС та HeLa під дією дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus*.

7. Показано гальмування пухлинного росту та пригнічення метастазування за умов перевивання щурам та мишам клітин LLC у випадку застосування дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* як протипухлинного агента.

### Список використаних джерел

1. Чорновіл, О. (2020). Сучасний погляд на функцію системи гемостазу. *Український медичний журнал*. Retrieved from [umj.com.ua](http://umj.com.ua)
2. Gale A. J. (2011). Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicologic pathology*, 39(1), 273–280. <https://doi.org/10.1177/0192623310389474>
3. Heemskerk, J. W. M., Mattheij, N. J. A., & Cosemans, J. M. E. M. (2013). Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/jth.12045>
4. Song J. (2022). Advances in laboratory assessment of thrombosis and hemostasis. *Blood research*, 57(S1), 93–100. <https://doi.org/10.5045/br.2022.2022048>
5. Bonar, R. A., Lippi, G., & Favaloro, E. J. (2017). Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1646, 3–27. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_1)
6. Favaloro, E. J., Gosselin, R. C., Pasalic, L., & Lippi, G. (2023). Hemostasis and Thrombosis: An Overview Focusing on Associated Laboratory Testing to Diagnose and Help Manage Related Disorders. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2663, 3–38. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3175-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3175-1_1)
7. Malý, M. A., Tomasov, P., Hájek, P., et al. (2007). The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. *Physiological Research*, 56(6), 685–695.
8. Davie, E. W., & Ratnoff, O. D. (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, 145(3638), 1310–1312. <https://doi.org/10.1126/science.145.3638.1310>
9. Furie, B., & Furie, B. C. (1992). Molecular and cellular biology of blood coagulation. *New England Journal of Medicine*, 326(12), 800–806. <https://doi.org/10.1056/NEJM199203193261205>

10. Heemskerk, J. W. M., Mattheij, N. J. A., & Cosemans, J. M. E. M. (2013). Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/jth.12045>
11. Maurizio Tomaiuolo, Lawrence F. Brass, Timothy J. Stalker. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis *Interv Cardiol Clin*. 2017; 6(1): 1–12. doi:10.1016/j.iccl.2016.08.001
12. Chapin, J. C., & Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood reviews*, 29(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.003>
13. Favalaro EJ, Pasalic L, Lippi G. Autoimmune Diseases Affecting Hemostasis: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 25;23(23):14715. doi: 10.3390/ijms232314715]
- 14 Löwenberg EC, Meijers JC, Levi M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med*. 2010;68(6):242-51
15. 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>
16. Davies, P. F. and Tripathi, S. C. (1993). Mechanical stress mechanisms and the cell: An endothelial paradigm. *Circulation Research*, pp. 239–245.
17. Prevost, N., Woulfe, D., Tognolini, M. and Brass, L. F. (2003). Contact-dependent signaling during the late events of platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, pp. 1613–1627.
18. Cattaneo, M. (2003). Inherited platelet-based bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, pp. 1628–1636.
19. 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>

20. Savage, B., Almus-Jacobs, F. and Ruggeri, Z. M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, 94(5), pp. 657–666.
21. Gawaz, M., Langer, H. and May, A. E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, pp. 3378–3384.
22. Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome biology*, 8(5), 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>
23. Springer, T. A. and Wang, J. H. (2004). The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. *Advances in Protein Chemistry*, 68, pp. 29–63.
24. Guerra-Espinosa, C., Jiménez-Fernández, M., Sánchez-Madrid, F., & Serrador, J. M. (2024). ICAMs in Immunity, Intercellular Adhesion and Communication. *Cells*, 13(4), 339. <https://doi.org/10.3390/cells13040339>
25. Kondo, N., Ueda, Y., & Kinashi, T. (2022). LFA1 Activation: Insights from a Single-Molecule Approach. *Cells*, 11(11), 1751. <https://doi.org/10.3390/cells11111751>
26. Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J. H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C. D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J. H., & Springer, T. A. (2003). Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, 112(1), 99–111. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01257-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01257-6)
27. Klaus, T., Hieber, C., Bros, M., & Grabbe, S. (2024). Integrins in Health and Disease-Suitable Targets for Treatment?. *Cells*, 13(3), 212. <https://doi.org/10.3390/cells13030212>
28. Mezu-Ndubuisi, O. J., & Maheshwari, A. (2021). The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric research*, 89(7), 1619–1626. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01177-9>
29. Fagerholm, S. C., Guenther, C., Lloret Asens, M., Savinko, T., & Uotila, L. M. (2019). Beta2-Integrins and Interacting Proteins in Leukocyte Trafficking,

Immune Suppression, and Immunodeficiency Disease. *Frontiers in immunology*, 10, 254. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00254>

30. Armstrong, P. C. and Peter, K. (2012). GPIIb/IIIa inhibitors: From bench to bedside and back to bench again. *Thrombosis and Haemostasis*, 107(5), pp. 808–814.

31. Falati, S., Gross, P., Merrill-skoloff, G., Furie, B. C. and Furie, B. (2002). Real time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nature Medicine*, 8(10), pp. 1175–1180.

32. Di, Q., Cheng, Z., Kim, W., Liu, Z., Song, H., Li, X., Nan, Y., Wang, C., & Cheng, X. (2013). Impaired cross-activation of  $\beta 3$  integrin and VEGFR-2 on endothelial progenitor cells with aging decreases angiogenesis in response to hypoxia. *International journal of cardiology*, 168(3), 2167–2176. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.01.240>

33. Yougbaré, I., Lang, S., Yang, H., Chen, P., Zhao, X., Tai, W. S., Zdravic, D., Vadasz, B., Li, C., Piran, S., Marshall, A., Zhu, G., Tiller, H., Killie, M. K., Boyd, S., Leong-Poi, H., Wen, X. Y., Skogen, B., Adamson, S. L., Freedman, J., ... Ni, H. (2015). Maternal anti-platelet  $\beta 3$  integrins impair angiogenesis and cause intracranial hemorrhage. *The Journal of clinical investigation*, 125(4), 1545–1556. <https://doi.org/10.1172/JCI77820>

34. Yang, H., Reheman, A., Chen, P., Zhu, G., Hynes, R. O., Freedman, J., Wagner, D. D., & Ni, H. (2006). Fibrinogen and von Willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 4(10), 2230–2237. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02116.x>

35. Desgrosellier, J. S., & Cheresch, D. A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer*, 10(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>

36. Danhier, F., Le Breton, A., & Pr  at, V. (2012). RGD-based strategies to target  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin in cancer therapy and diagnosis. *Molecular pharmaceutics*, 9(11), 2961–2973. <https://doi.org/10.1021/mp3002733>



37. Doolittle, E., Peiris, P. M., Doron, G., Goldberg, A., Tucci, S., Rao, S., Shah, S., Sylvestre, M., Govender, P., Turan, O., Lee, Z., Schiemann, W. P., & Karathanasis, E. (2015). Spatiotemporal Targeting of a Dual-Ligand Nanoparticle to Cancer Metastasis. *ACS nano*, 9(8), 8012–8021. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01552>

38. Shi, S., Zhou, M., Li, X., Hu, M., Li, C., Li, M., Sheng, F., Li, Z., Wu, G., Luo, M., Cui, H., Li, Z., Fu, R., Xiang, M., Xu, J., Zhang, Q., & Lu, L. (2016). Synergistic active targeting of dually integrin  $\alpha\beta3$ /CD44-targeted nanoparticles to B16F10 tumors located at different sites of mouse bodies. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 235, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.050>

39. Yu, X., Gao, D., Gao, L., Lai, J., Zhang, C., Zhao, Y., Zhong, L., Jia, B., Wang, F., Chen, X., & Liu, Z. (2017). Inhibiting Metastasis and Preventing Tumor Relapse by Triggering Host Immunity with Tumor-Targeted Photodynamic Therapy Using Photosensitizer-Loaded Functional Nanographenes. *ACS nano*, 11(10), 10147–10158. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04736>

40. Calvete J. J. (2013). The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 62, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.005>

41. Integrin structure, activation, and interactions. Campbell ID, Humphries MJ. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(3):a004994. doi: 10.1101/cshperspect.a004994

42. Almeida, G. O., de Oliveira, I. S., Arantes, E. C., & Sampaio, S. V. (2023). Snake venom disintegrins update: insights about new findings. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 29, e20230039. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0039>

43. Clissa, P. B., Della-Casa, M. S., Zychar, B. C., & Sanabani, S. S. (2024). The Role of Snake Venom Disintegrins in Angiogenesis. *Toxins*, 16(3), 127. <https://doi.org/10.3390/toxins16030127>

44. Vasconcelos, A. A., Estrada, J. C., David, V., Wermelinger, L. S., Almeida, F. C. L., & Zingali, R. B. (2021). Structure-Function Relationship of the Disintegrin Family: Sequence Signature and Integrin Interaction. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 783301. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.783301>
45. Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., Monleón, D., Esteve, V., Celda, B., Juárez, P., & Sanz, L. (2005). Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 45(8), 1063–1074. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.024>
46. Calvete, J. J., Moreno-Murciano, M. P., Theakston, R. D., Kisiel, D. G., & Marcinkiewicz, C. (2003). Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *The Biochemical journal*, 372(Pt 3), 725–734. <https://doi.org/10.1042/BJ20021739>
47. Walsh, E. M., & Marcinkiewicz, C. (2011). Non-RGD-containing snake venom disintegrins, functional and structural relations. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 58(4), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.004>
48. Gabriela de Oliveira Almeida, Isadora Sousa de Oliveira, Eliane Candiani Arantes, and Suely Vilela Sampaio. Snake venom disintegrins update: insights about new findings J Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 2023, 29:e20230039. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0039>
49. Phillips, D. R., & Scarborough, R. M. (1997). Clinical pharmacology of eptifibatide. *The American journal of cardiology*, 80(4A), 11B–20B. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(97\)00572-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(97)00572-9)
50. Scarborough, R. M., Rose, J. W., Naughton, M. A., Phillips, D. R., Nannizzi, L., Arfsten, A., Campbell, A. M., & Charo, I. F. (1993). Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *The Journal of biological chemistry*, 268(2), 1058–1065.
51. Jang, Y. J., Jeon, O. H., & Kim, D. S. (2007). Saxatilin, a snake venom disintegrin, regulates platelet activation associated with human vascular endothelial

cell migration and invasion. *Journal of vascular research*, 44(2), 129–137.  
<https://doi.org/10.1159/000098519>

52. Koh, C. Y. and Kini, R. M. (2012). From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. *Toxicon*, pp. 497–506.

53. Zhang, L. and Wei, L. J. (2007). ACTX-8, a cytotoxic l-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. *Life Sciences*, 80(13), pp. 1189–1197.

54. Torii, S., Yamane, K., Mashima, T., Haga, N., Yamamoto, K., Fox, J. W., Naito, M. and Tsuruo, T. (2000). Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. *Biochemistry*, 39(12), pp. 3197–3205.

55. Naumann, G. B., Silva, L. F., Silva, L., Faria, G., Richardson, M., Evangelista, K., Kohlhoff, M., Gontijo, C. M. F., Navdaev, A., De Rezende, F. F., Eble, J. A. and Sanchez, E. F. (2011). Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1810(7), pp. 683–694.

56. Ahn, M. Y., Lee, B. M. and Kim, Y. S. (1997). Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(6), pp. 911–919.

57. Gebrim, L. C., Marcussi, S., Menaldo, D. L., de Menezes, C. S. R., Nomizo, A., Hamaguchi, A., Silveira-Lacerda, E. P., Homsí-Brandeburgo, M. I., Sampaio, S. V., Soares, A. M. and Rodrigues, V. M. (2009). Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals*, 37(4), pp. 222–229.

58. Debnath, A., Saha, A., Gomes, Antony, Biswas, S., Chakrabarti, P., Giri, B., Biswas, A. K., Gupta, S. Das and Gomes, Aparna (2010). A lethal cardiotoxic-cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. *Toxicon*, 56(4), pp. 569–579.

59. Das, T., Bhattacharya, S., Halder, B., Biswas, A., Das Gupta, S., Gomes, Antony and Gomes, Aparna (2011). Cytotoxic and antioxidant property of a purified fraction (NN-32) of Indian *Naja naja* venom on Ehrlich ascites carcinoma in BALB/c mice. *Toxicon*, 57(7–8), pp. 1065–1072.

60. Sun, L. K., Yoshii, Y., Hyodo, A., Tsurushima, H., Saito, A., Harakuni, T., Li, Y. P., Kariya, K., Nozaki, M. and Morine, N. (2003). Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicology in Vitro*, 17(2), pp. 169–177.

61. Karthikeyan, R., Karthigayan, S., Sri Balasubashini, M., Somasundaram, S. T. and Balasubramanian, T. (2008). Inhibition of Hep2 and HeLa cell proliferation in vitro and EAC tumor growth in vivo by *Lapemis curtus* (Shaw 1802) venom. *Toxicon*, 51(1), pp. 157–161.

62. Yang, R. Sen, Tang, C. H., Chuang, W. J., Huang, T. H., Peng, H. C., Huang, T. F. and Fu, W. M. (2005). Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon*, 45(5), pp. 661–669.

63. Gomes, Antony, Choudhury, S. R., Saha, A., Mishra, R., Giri, B., Biswas, A. K., Debnath, A. and Gomes, Aparna (2007). A heat stable protein toxin (drCT-I) from the Indian Viper (*Daboia russelli russelli*) venom having antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activities. *Toxicon*, 49(1), pp. 46–56.

64. Lin, K. L., Su, J. C., Chien, C. M., Chuang, P. W., Chang, L. Sen and Lin, S. R. (2010). Down-regulation of the JAK2/PI3K-mediated signaling activation is involved in Taiwan cobra cardiotoxin III-induced apoptosis of human breast MDA-MB-231 cancer cells. *Toxicon*, 55(7), pp. 1263–1273.

65. Nunes, E. S., Souza, M. A. A., Vaz, A. F. M., Silva, T. G., Aguiar, J. S., Batista, A. M., Guerra, M. M. P., Guarnieri, M. C., Coelho, L. C. B. B. and Correia, M. T. S. (2012). Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon*, 59(7–8), pp. 667–671.

66. Nolte, S., de Castro Damasio, D., Baréa, A. C., Gomes, J., Magalhães, A., Mello Zischler, L. F. C., Stuelp-Campelo, P. M., Elífilio-Esposito, S. L., Roque-

Barreira, M. C., Reis, C. A. and Moreno-Amaral, A. N. (2012). BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. *Toxicon*, 59(1), pp. 81–85.

67. Global Cancer Observatory. Access mode: <https://gco.iarc.fr/en>

68. Kantser-register of Ukraine. Access mode: [www.health.gov.ua](http://www.health.gov.ua)

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

70. Chekhun V.F. Retro- and prospective analysis of achievements and problems in "tumor-organism" relationship investigations. Thematic issue "Oncology. Hematology. Chemotherapy". 2022; № 6 (79). Health-ua.com (specialized medical portal). Access mode: <https://health-ua.com/article/72133-retro-taprospektivnij-analz-dosyagnen-problem-uvivchenn-vzamovdnosin-puhlin>.

71. Diagnostic immunopathology. Second edition. Editors R.B. Colvin, A.K. Bhan, R.T. McCluskey. New York: Raven Press, 1994. 820 p.

72. Mendes, N., Dias Carvalho, P., Martins, F., Mendonça, S., Malheiro, A. R., Ribeiro, A., Carvalho, J., & Velho, S. (2020). Animal Models to Study Cancer and Its Microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, 1219, 389–401. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-34025-4\\_20..](https://doi.org/10.1007/978-3-030-34025-4_20..)

73. Postevka I.D., Ivashchuk O.I., Davydenko I.S., Bodiaka V.Yu. (2016). Model of tumorous affection of the mammary gland. *Clinical and experimental pathology*, XV, 4(58):88-91. (In Ukrainian)..

74. Gür T., Demir H., Cetin Kotan M. (2011) Tumor markers and biochemical parameters in colon cancer patients before and after chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12, 3147-3150.

75. Veceric Z., Cerar A. (2004). Comparison of wistar vs. fischer rat in the incidence of 1,2-dimethylhydrazine induced intestinal tumours. *Radiology and Oncology*, 38(1), 227-234.

76. Carlson, A. L., Carrazco-Carrillo, J., Loder, A., Elkhadragy, L., Schachtschneider, K. M., & Padilla-Benavides, T. (2022). The Oncopig as an Emerging Model to Investigate Copper Regulation in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(22), 14012. <https://doi.org/10.3390/ijms232214012>
77. Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T., & Patnaik, A. (2018). Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer discovery*, 8(11), 1358–1365. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0044>
78. Zhou, Y., Xia, J., Xu, S., She, T., Zhang, Y., Sun, Y., Wen, M., Jiang, T., Xiong, Y., & Lei, J. (2023). Experimental mouse models for translational human cancer research. *Frontiers in immunology*, 14, 1095388. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1095388>.
79. Liu, Y., Wu, W., Cai, C., Zhang, H., Shen, H., & Han, Y. (2023). Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 160. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01419-2>
80. Chen, D., An, X., Ouyang, X., Cai, J., Zhou, D., & Li, Q. X. (2019). In Vivo Pharmacology Models for Cancer Target Research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1953, 183–211. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7_12)
81. Gargiulo G. (2018). Next-Generation in vivo Modeling of Human Cancers. *Frontiers in oncology*, 8, 429. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00429>
82. Rytsyk O. B., Fira, L. S., & Lykhatskyi, P. H. (2021). Reseveratrol as a cytoprotective action for induced carcinogenesis in rats. *Medical and Clinical Chemistry*, (1), 13–20. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2021.i1.12103>
83. Ma S. (2023). Experimental models for preclinical cancer research. *Experimental cell research*, 429(1), 113643. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113643>
84. Langdon S. P. (2012). Animal modeling of cancer pathology and studying tumor response to therapy. *Current drug targets*, 13(12), 1535–1547. <https://doi.org/10.2174/138945012803530152>

85. Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>

86. Korinek V. (2020). Special Issue: Animal Modeling in Cancer. *Genes*, 11(9), 1009. <https://doi.org/10.3390/genes11091009>

87. Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy*, 8, 1911–1921. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>

88. Lu, L & Chan, Ruby & Miro X.M., Luo & Wu, William & Shin, Youngmin & Cho, Chi. (2014). Animal models of gastrointestinal inflammation and cancer. *Life sciences*. 108(1), 1-6. 10.1016/j.lfs.2014.04.036.

89. Irving, A. A., Yoshimi, K., Hart, M. L., Parker, T., Clipson, L., Ford, M. R., Kuramoto, T., Dove, W. F., & Amos-Landgraf, J. M. (2014). The utility of Apc-mutant rats in modeling human colon cancer. *Disease models & mechanisms*, 7(11), 1215–1225. <https://doi.org/10.1242/dmm.016980>

90. Mishra, R., Rajsiglová, L., Lukáč, P., Tenti, P., Šima, P., Čaja, F., & Vannucci, L. (2021). Spontaneous and Induced Tumors in Germ-Free Animals: A General Review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(3), 260. <https://doi.org/10.3390/medicina57030260>

91. Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J. H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y., & Uchino, J. (1991). Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. *The Journal of clinical investigation*, 87(5), 1858–1861. <https://doi.org/10.1172/JCI115208>

92. Kemp C. J. (2015). Animal Models of Chemical Carcinogenesis: Driving Breakthroughs in Cancer Research for 100 Years. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(10), 865–874. <https://doi.org/10.1101/pdb.top069906>

93. Nohmi, T., Masumura, K. & Toyoda-Hokaiwado, N. Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis (2017). *Genes and Environment*, 39, 11. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0072-6>
94. Nagini S. (2012). Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World journal of gastrointestinal oncology*, 4(7), 156–169. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v4.i7.156>
95. Vera, M. C., Pisani, G. B., Biancardi, M. E., Bottai, H., Alvarez, M.deL., & Quintana, A. B. (2015). Comparison of two chemical models to induce hepatic preneoplasia in male Wistar rats. *Annals of hepatology*, 14(2), 259–266.
96. García-Alegría, A. M., Gómez-Álvarez, A., Anduro-Corona, I., Burgos-Hernández, A., Ruíz-Bustos, E., Canett-Romero, R., González-Ríos, H., López-Cervantes, J. G., Rodríguez-Martínez, K. L., & Astiazaran-Garcia, H. (2020). Genotoxic Effects of Aluminum Chloride and Their Relationship with N-Nitroso-N-Methylurea (NMU)-Induced Breast Cancer in Sprague Dawley Rats. *Toxics*, 8(2), 31. <https://doi.org/10.3390/toxics8020031>
97. Shao, Z., Wen, Q., Zhu, T., Jiang, W., Kang, Y., Xu, C., & Wang, S. (2018). Preventative effect of celecoxib in dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian cancer in rats. *Archives of gynecology and obstetrics*, 298(5), 981–989. <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4898-y>
98. Philinska O.M., Yablonska S.V., Linchak O.V., Burlaka A.P., Ostrovska G.V., Rybalchenko T.V. (2010). The influence of maleimide derivative on the development oxidative stress of liver in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*, 8, 185-190. <http://jnas.nbuv.gov.ua/article/UJRN-0000114721> (In Ukrainian).
99. Perse, M., & Cerar, A. (2005). The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat - experimental colorectal carcinogenesis. *Radiology and Oncology*, 39(1), 61-70.
100. Ilhan, N., Bektas, I., Susam, S., & Ozercan, I. H. (2022). Protective effects of rosmarinic acid against azoxymethane-induced colorectal cancer in rats. *Journal*



of *biochemical and molecular toxicology*, 36(2), e22961.  
<https://doi.org/10.1002/jbt.22961>

101. Stearns, V., & Gelmann, E. P. (1998). Does tamoxifen cause cancer in humans?. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16(2), 779–792. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.2.779>

102. Geurts, A. M., Cost, G. J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J. C., Choi, V. M., Jenkins, S. S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Ménoret, S., Anegón, I., Davis, G. D., ... Buelow, R. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5939), 433. <https://doi.org/10.1126/science.1172447>

103. Mashimo, T., Takizawa, A., Voigt, B., Yoshimi, K., Hiai, H., Kuramoto, T., & Serikawa, T. (2010). Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PloS one*, 5(1), e8870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008870>

104. Tong, C., Li, P., Wu, N. L., Yan, Y., & Ying, Q. L. (2010). Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 467(7312), 211–213. <https://doi.org/10.1038/nature09368>

105. Mashimo T. (2014). Gene targeting technologies in rats: zinc finger nucleases, transcription activator-like effector nucleases, and clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Development, growth & differentiation*, 56(1), 46–52. <https://doi.org/10.1111/dgd.12110>

106. Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Ohnishi, T., Naito, A., Ota, T., Ando, A., Ochiya, T., & Tsuda, H. (2002). Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogene are highly susceptible to N-nitrosomethylbenzylamine induction of esophageal tumorigenesis. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 93(7), 744–751. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2002.tb01315.x>

107. Hokaiwado, N., Asamoto, M., Futakuchi, M., Ogawa, K., Takahashi, S., & Shirai, T. (2007). Both early and late stages of hepatocarcinogenesis are enhanced in Cx32 dominant negative mutant transgenic rats with disrupted gap junctional

intercellular communication. *The Journal of membrane biology*, 218(1-3), 101–106.  
<https://doi.org/10.1007/s00232-007-9053-9>

108. Fukamachi, K., Tanaka, H., Hagiwara, Y., Ohara, H., Joh, T., Iigo, M., Alexander, D. B., Xu, J., Long, N., Takigahira, M., Yanagihara, K., Hino, O., Saito, I., & Tsuda, H. (2009). An animal model of preclinical diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinomas. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 636–641. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.019>

109. Rolstad B. (2001). The athymic nude rat: an animal experimental model to reveal novel aspects of innate immune responses?. *Immunological reviews*, 184, 136–144. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1840113.x>

110. Miyasaka, Y., Wang, J., Hattori, K., Yamauchi, Y., Hoshi, M., Yoshimi, K., Ishida, S., & Mashimo, T. (2022). A high-quality severe combined immunodeficiency (SCID) rat bioresource. *PloS one*, 17(8), e0272950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272950>

111. Geraldelli, D., Ribeiro, M. C., Medeiros, T. C., Comiran, P. K., Martins, K. O., Oliveira, M. F., Oliveira, G. A., Dekker, R. F. H., Barbosa-Dekker, A. M., Alegranci, P., & Queiroz, E. A. I. F. (2020). Tumor development in rats and cancer cachexia are reduced by treatment with botryosphaeran by increasing apoptosis and improving the metabolic profile. *Life sciences*, 252, 117608. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117608>

112. Bennani-Baiti, N., & Walsh, D. (2011). Animal models of the cancer anorexia-cachexia syndrome. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 19(9), 1451–1463. <https://doi.org/10.1007/s00520-010-0972-0>

113. Donohoe, C. L., Ryan, A. M., & Reynolds, J. V. (2011). Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology research and practice*, 2011, 601434. <https://doi.org/10.1155/2011/601434>

114. Moreira, V. M., Almeida, D., da Silva Franco, C. C., Gomes, R. M., Palma-Rigo, K., Prates, K. V., Tófolo, L. P., Malta, A., Francisco, F. A., Pavanello, A., Previante, C., da Silva Silveira, S., Ribeiro, T. A., Martins, I. P., de Moraes, A.

M. P., Matusso, C. C. I., Saavedra, L. P. J., de Barros Machado, K. G., Fabbri Corá, T., Gongora, A., ... de Freitas Mathias, P. C. (2019). Moderate exercise training since adolescence reduces Walker 256 tumour growth in adult rats. *The Journal of physiology*, 597(15), 3905–3925. <https://doi.org/10.1113/JP277645>

115. Cho-Chung, Y. S. (1974). In vivo inhibition of tumor growth by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate derivatives. *Cancer Research*, 34, 3492–3496.

116. Hanson, R. N., Franke, L. A., & Kaplan, M. (1990). Radioiodinated ligands for the estrogen receptor: tissue distribution of 17 alpha-[125I]iodovinylestradiol derivatives in normal and tumor-bearing adult female rats. *International journal of radiation applications and instrumentation. Part B, Nuclear medicine and biology*, 17(2), 239–245. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(90\)90153-r](https://doi.org/10.1016/0883-2897(90)90153-r)

117. Amaral, L. A. d., Souza, G. H. O. d., Santos, M. R., Said, Y. L. V., Souza, B. B. d., Oliveira, R. J., ... & Santos, E. F. d. (2019). Walker-256 tumor: experimental model, implantation sites and number of cells for ascitic and solid tumor development. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180284>

118. Orel V.E., Mytrelyas T., Celepy M., Golovko., Dynnik O., Nikolov K., Romanov A., Rykhalsky A., Varne C., Yarochnenko O., Orel I., Suprunyuk D., Shchepotin I. (2014). Guerin's carcinoma visualization during magnetic nanotherapy. *Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery*, 2, 1-11.

119. Zaporozhan V. M., Marynyuk G. S., Novikov M. Yu. (2012). Guerin's carcinoma at the background of hypo- and hyperthyreoid states in the laboratory rats. *The Odessa National Medical Journal*; 6, 51-54. (In Ukrainian).

120. Zinchenko V A., Orel V.E., Belov Yu.A., Dzyatkovska N.M., Danko M.Y., Romanov A.V., Morozov O. B., Prydatko O. Yu. (2005). Nonlinear kinetics of tumor volumes and spatial chaos of sarcoma 45 cell shapes after the treatment by mechanically modified doxorubicin, 40 MHz irradiation and their combination. *Biopolymers and Cell*, 21(1), 64-69. (In Ukrainian).

121 Voloshchuk T.P., Potskovskii Yu.V., Potopalskii A.I., Vorobyeva I.I. (2003). Effect of thioTEPA modified DNA forms and their monomeric components of varying alkylation degree on synthesis of nucleic acids in tumor cells. *Biopolymers and Cell*, 19(6), 513-519.

122. Pournajaf, S., Afsordeh, N., & Pourgholami, M. H. (2023). *In vivo* C6 glioma models: an update and a guide toward a more effective preclinical evaluation of potential anti-glioblastoma drugs. *Reviews in the neurosciences*, 35(2), 183–195. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2023-0067>

123. Lyubich L.D., Lisianyi M.I. (2015). Effect of progenitor neural cells supernatant on lymphocytes cytotoxic function in rats with glioma. *Fiziologichnei Zhurnal*, 61(4), 63-70. (In Ukrainian).

124. Steiniger, S. C., Kreuter, J., Khalansky, A. S., Skidan, I. N., Bobruskin, A. I., Smirnova, Z. S., Severin, S. E., Uhl, R., Kock, M., Geiger, K. D., & Gelperina, S. E. (2004). Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *International journal of cancer*, 109(5), 759–767. <https://doi.org/10.1002/ijc.20048>

125. Zavadskaya T.S., Trompak O.O., Taranets L.P. (2013). Fotolon-mediated photodynamic therapy of experimental gliomas. *Photobiology and experimental photomedicine*, 10(1, 2): 81-88. (In Ukrainian).

126. Park, J., Kong, C., Shin, J., Park, J. Y., Na, Y. C., Han, S. H., Chang, J. W., Song, S. H., & Chang, W. S. (2023). Combined Effects of Focused Ultrasound and Photodynamic Treatment for Malignant Brain Tumors Using C6 Glioma Rat Model. *Yonsei medical journal*, 64(4), 233–242. <https://doi.org/10.3349/ymj.2022.0422>

127. Cook, G. J., & Pardee, T. S. (2013). Animal models of leukemia: any closer to the real thing?. *Cancer metastasis reviews*, 32(1-2), 63–76. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9405-5>

128. Hechler, B., Dupuis, A., Mangin, P. H., & Gachet, C. (2019). Platelet preparation for function testing in the laboratory and clinic: Historical and practical

aspects. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, 3(4), 615–625.  
<https://doi.org/10.1002/rth2.12240>

129. Онопченко О. В., Косякова Г. В., Горідько Т. М. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, № 5. – С. 88–96

130. Collier GR, Chisholm K, Sykes S, Dryden PA, O'Dea K. More severe impairment of oral than intravenous glucose tolerance in rats after eating a high fat diet. *J Nutr.* 1985; 115(11): 1471-1476.

131. Meneses A, Perez-Garcia G, Ponce-Lopez T, Tellez R, Gallegos-Cari A, Castillo C. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. *Rev Neurosci.* 2011; 22(3):365-71. DOI: 10.1515/RNS.2011.024

132. Aparecida do Amaral L, Santos MR, Oliveira de Souza GH. Walker-256 tumor: experimental model, implantation sites and number of cells for ascitic and solid tumor development. *Brazilian Archives Biology and Technology* 2019; 62 (12): e19180284

133. R C McKenzie, A Oran, C A Dinarello, D N Sauder. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits subcutaneous B16 melanoma growth in vivo. *Anticancer Res.* 1996 Jan-Feb;16(1):437-41

134. Serdyukov, Y. K., Lytvynenko, O. N., & Gryshchenko, V. A. Pathological anatomical and histological changes are in liver of rats at a medicamentous hepatitis. *Ukrainian Journal of Modern Toxicological Aspects* 2008, 2, 63–65.

135. Gryshchenko, V., Danchenko, O., Musiyshuk, V. Modification of Modeling Method of Toxic Dystrophy of Liver in Rats. In: Nadykto, V. (eds) *Modern Development Paths of Agricultural Production*. Springer, Cham 2019 DOI 10.1007/978-3-030-14918-5\_67.

136. Skrzypczak-Wiercioch, A., & Sałat, K. (2022). Lipopolysaccharide-Induced Model of Neuroinflammation: Mechanisms of Action, Research Application and Future Directions for Its Use. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(17), 5481. <https://doi.org/10.3390/molecules27175481>

137. Skok M.V. Alpha subunit composition of nicotinic acetylcholine receptors in the rat autonomic ganglia neurons as determined with subunit-specific anti-

alpha(181-192) peptide antibodies / M.V. Skok, L.P. Voitenko, S.V. Voitenko [et al.] // *Neuroscience*. – 1999. – Vol. 93, no 4. – P. 1427–1436. – Mode of access: [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00160-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00160-8).

138. Brunelle J.L. One-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE) / J.L. Brunelle, R. Green // *Methods Enzymol.* – 2014. – Vol. 541. – P. 151-159. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>.

139. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680–685.

140. 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>

141. Ku, H. K., Lim, H. M., Oh, K. H., Yang, H. J., Jeong, J. S., & Kim, S. K. (2013). Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: comparison with two calculation models. *Analytical biochemistry*, 434(1), 178–180. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.045>

142. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;86:193-200.

143. Chapman, J. R. (2000). *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*. *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*.

144. Gao, W., Chen, S. R., Wu, M. Y., Gao, K., Li, Y. L., Wang, H. Y., Li, C. Y. and Li, H. (2016). Methylprednisolone exerts neuroprotective effects by regulating autophagy and apoptosis. *Neural Regeneration Research*, 11(5), pp. 823–828.

145. Song, H. K., & Hwang, D. Y. (2017). Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory animal research*, 33(2), 119–123. <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.119>

146. Periyah, M. H., Halim, A. S., & Mat Saad, A. Z. (2017). Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 11(4), 319–327.
147. Korolova, D. S., Stohnii, Y. M., Gryshchuk, V. I., Zhuk, S. I., Us, I. V., Chernyshenko, T. M., Kostiuchenko, 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. <https://doi.org/10.15407/ubj93.02.062>
148. Yagmur, E., Frank, R. D., Neulen, J., Floege, J., & Mühlfeld, A. S. (2015). Platelet Hyperaggregability is Highly Prevalent in Patients With Chronic Kidney Disease: An Underestimated Risk Indicator of Thromboembolic Events. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 21(2), 132–138. <https://doi.org/10.1177/1076029613490828>
149. Vinholt, P. J., Hvas, A. M., Nielsen, C., Söderström, A. C., Sprogø, U., Fialla, A. D., & Nybo, M. (2018). Reduced platelet activation and platelet aggregation in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Platelets*, 29(5), 520–527. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1349308>
150. Ye, Q., Wang, X., Xu, X., Chen, J., Christiani, D. C., Chen, F., Zhang, R., & Wei, Y. (2024). Serial platelet count as a dynamic prediction marker of hospital mortality among septic patients. *Burns & trauma*, 12, tkae016. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkae016>
151. Peterson, J. E., Zurakowski, D., Italiano, J. E., Jr, Michel, L. V., Connors, S., Oenick, M., D'Amato, R. J., Klement, G. L., & Folkman, J. (2012). VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis*, 15(2), 265–273. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9259-z>
152. Koltai, K., Kesmarky, G., Feher, G., Tibold, A., & Toth, K. (2017). Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical

Implications. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1803. <https://doi.org/10.3390/ijms18081803>

153. Carrizzo, A., Izzo, C., Oliveti, M., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Di Pietro, P., Calabrese, M., De Simone, E., Sciarretta, S., Frati, G., Migliarino, S., Damato, A., Ambrosio, M., De Caro, F., & Vecchione, C. (2018). The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2968. <https://doi.org/10.3390/ijms19102968>

154. Colwell JA, Nair RM, Halushka PV, Rogers C, Whetsell A, Sagel J. Platelet adhesion and aggregation in diabetes mellitus. *Metabolism*. 1979 Apr;28(4 Suppl 1):394-400. doi: 10.1016/0026-0495(79)90044-1. PMID: 122293.

155. Colwell JA, Halushka PV, Sarji KE, Sagal J. Rationale for antiplatelet agents in diabetic vascular disease. *Adv Exp Med Biol*. 1978;102:243-54. doi: 10.1007/978-1-4757-1217-9\_16. PMID: 356561.

156. Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. *Int J Endocrinol*. 2011;2011:742719. doi: 10.1155/2011/742719. Epub 2011 Aug 21. PMID: 21869886; PMCID: PMC3159301.

157. Gaggini M, Gorini F, Vassalle C. Lipids in Atherosclerosis: Pathophysiology and the Role of Calculated Lipid Indices in Assessing Cardiovascular Risk in Patients with Hyperlipidemia. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 21;24(1):75. doi: 10.3390/ijms24010075. PMID: 36613514; PMCID: PMC9820080.

158. Tumanovska LV, Swanson RJ, Serebrovska ZO, Portnichenko GV, Goncharov SV, Kysilov BA, Moibenko OO, Dosenko VE. Cholesterol enriched diet suppresses ATF6 and PERK and upregulates the IRE1 pathways of the unfolded protein response in spontaneously hypertensive rats: Relevance to pathophysiology of atherosclerosis in the setting of hypertension. *Pathophysiology*. 2019 Sep-Dec;26(3-4):219-226. doi: 10.1016/j.pathophys.2019.05.005. Epub 2019 May 29. PMID: 31202527.



159. Mi Y, Yan S, Lu Y, Liang Y, Li C. Venous thromboembolism has the same risk factors as atherosclerosis: A PRISMA-compliant systemic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Aug;95(32):e4495. doi: 10.1097/MD.0000000000004495. PMID: 27512866; PMCID: PMC4985321.

160. Wang L, Tang C. Targeting Platelet in Atherosclerosis Plaque Formation: Current Knowledge and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 21;21(24):9760. doi: 10.3390/ijms21249760. PMID: 33371312; PMCID: PMC7767086.

161. Gonzalez ER. Antiplatelet therapy in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin Ther*. 1998;20 Suppl B:B18-41. doi: 10.1016/s0149-2918(98)80028-3. PMID: 9589829.

162. Huseynov A, Reinhardt J, Chandra L, Dürschmied D, Langer HF. Novel Aspects Targeting Platelets in Atherosclerotic Cardiovascular Disease-A Translational Perspective. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 27;24(7):6280. doi: 10.3390/ijms24076280. PMID: 37047253; PMCID: PMC10093962.

163. Moik F, Ay C. Hemostasis and cancer: Impact of haemostatic biomarkers for the prediction of clinical outcomes in patients with cancer. *J Thromb Haemost*. 2022 Dec;20(12):2733-2745. doi: 10.1111/jth.15880. Epub 2022 Sep 27. PMID: 36106749; PMCID: PMC9827869.

164. Xu XR, Zhang D, Oswald BE, Carrim N, Wang X, Hou Y, Zhang Q, Lavalle C, McKeown T, Marshall AH, Ni H. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016 Dec;53(6):409-30. doi: 10.1080/10408363.2016.1200008. Epub 2016 Jul 22. PMID: 27282765.

165. Li M, Gui J, Wang H, An J, Wu R, Liu X, Wu B, Xiao H. Prognostic Value of Platelet Aggregation Function in Patients with laryngeal Carcinoma. *Int J Gen Med*. 2023 Nov 24;16:5559-5566. doi: 10.2147/IJGM.S428122. PMID: 38034899; PMCID: PMC10683666.

166. Levi M. Disseminated Intravascular Coagulation in Cancer: An Update. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Jun;45(4):342-347. doi: 10.1055/s-0039-1687890. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31041800.

167 Zanetto A, Campello E, Bulato C, Gavasso S, Farinati F, Russo FP, Tormene D, Burra P, Senzolo M, Simioni P. Increased platelet aggregation in patients with decompensated cirrhosis indicates higher risk of further decompensation and death. *J Hepatol.* 2022 Sep;77(3):660-669. doi: 10.1016/j.jhep.2022.03.009. Epub 2022 Mar 29. PMID: 35364225.

168 Peck-Radosavljevic M. (2017). Thrombocytopenia in chronic liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 37(6), 778–793. <https://doi.org/10.1111/liv.13317>

169 Amanullah, A., Upadhyay, A., Dhiman, R., Singh, S., Kumar, A., Ahirwar, D. K., Gutti, R. K., & Mishra, A. (2022). Development and Challenges of Diclofenac-Based Novel Therapeutics: Targeting Cancer and Complex Diseases. *Cancers*, 14(18), 4385. <https://doi.org/10.3390/cancers14184385>

170 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. <https://doi.org/10.1002/ame2.12301>

171. Birnbaum JA, Herman HS, Gao Q, Koenigsberg M, Sigal SH. The Prognostic Significance of the Platelet Count in Alcoholic Hepatitis. *Gastro Hep Adv.* 2022 Aug 29;2(1):8-15. doi: 10.1016/j.gastha.2022.07.022. PMID: 39130158; PMCID: PMC11308416.

172. de Jonckheere B, Kollotzek F, Münzer P, Göb V, Fischer M, Mott K, Coman C, Troppmair NN, Manke MC, Zdanyte M, Harm T, Sigle M, Kopczynski D, Bileck A, Gerner C, Hoffmann N, Heinzmann D, Assinger A, Gawaz M, Stegner D, Schulze H, Borst O, Ahrends R. Critical shifts in lipid metabolism promote megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. *Nat Cardiovasc Res.* 2023 Sep;2:835-852. doi: 10.1038/s44161-023-00325-8. Epub 2023 Aug 31. Erratum in:

Nat Cardiovasc Res. 2023 Dec;2(12):1327. doi: 10.1038/s44161-023-00389-6. PMID: 38075556; PMCID: PMC7615361.

173. Galgano, L., Guidetti, G. F., Torti, M., & Canobbio, I. (2022). The Controversial Role of LPS in Platelet Activation In Vitro. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10900. <https://doi.org/10.3390/ijms231810900>

174. Vallance, T. M., Zeuner, M. T., Williams, H. F., Widera, D., & Vaiyapuri, S. (2017). Toll-Like Receptor 4 Signalling and Its Impact on Platelet Function, Thrombosis, and Haemostasis. *Mediators of inflammation*, 2017, 9605894. <https://doi.org/10.1155/2017/9605894>

175. Martyanov, A. A., Maiorov, A. S., Filkova, A. A., Ryabykh, A. A., Svidelskaya, G. S., Artemenko, E. O., Gambaryan, S. P., Panteleev, M. A., & Sveshnikova, A. N. (2020). Effects of bacterial lipopolysaccharides on platelet function: inhibition of weak platelet activation. *Scientific reports*, 10(1), 12296. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69173-x>

176. Li, Z. L., Chen, X. M., Yang, L. C., Deng, X. L., Fu, S. H., Cai, L. L., Zhou, Y., Chen, J., Bai, J., & Cong, Y. L. (2010). *Zhonghua yi xue za zhi*, 90(22), 1547–1550.

177. Chuanqing Zhong, Xiaojing Huang, Shu Zhang, Yanna Cheng, Guangxiang Cao, Fengshan Wang, (2017). The radiation protection role of heparin-SOD conjugate in irradiated mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(4) 1-9.

178. Osman Vefa Gul, Aycan Sengul, Hikmettin Demir (2024). Effects of radiation at different dose rates on hematologic parameters in rats. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 17(2) 100873.

179. Lambert, M. P., Xiao, L., Nguyen, Y., Kowalska, M. A., & Poncz, M. (2011). The role of platelet factor 4 in radiation-induced thrombocytopenia. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 80(5), 1533–1540. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.03.039>

180. Lykhmus O, Kalashnyk O, Koval L, Krynina O, Komisarenko S, Skok M. Immunization with 674-685 fragment of SARS-Cov-2 spike protein induces

neuroinflammation and impairs episodic memory of mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022 Sep 24;622:57-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.07.016. Epub 2022 Jul 8. PMID: 35843095; PMCID: PMC9263688.

181. Koupenova, M., Corkrey, H. A., Vitseva, O., Tanriverdi, K., Somasundaran, M., Liu, P., Soofi, S., Bhandari, R., Godwin, M., Parsi, K. M., Cousineau, A., Maehr, R., Wang, J. P., Cameron, S. J., Rade, J., Finberg, R. W., & Freedman, J. E. (2021). SARS-CoV-2 Initiates Programmed Cell Death in Platelets. *Circulation research*, 129(6), 631–646. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.121.319117>

182. Garcia-Beltran, W. F., Lam, E. C., Astudillo, M. G., Yang, D., Miller, T. E., Feldman, J., Hauser, B. M., Caradonna, T. M., Clayton, K. L., Nitido, A. D., Murali, M. R., Alter, G., Charles, R. C., Dighe, A., Branda, J. A., Lennerz, J. K., Lingwood, D., Schmidt, A. G., Iafrate, A. J., & Balazs, A. B. (2021). COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell*, 184(2), 476–488.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.015>

183. 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. <https://doi.org/10.15407/ubj94.05.007>

184. Platonov, O. M., & Us, I. V. (2023). *Ex vivo* study of the action of integrin receptors antagonist from *Echis multisquamatis* 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>

185. 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. <https://doi.org/10.30841/2708-8731.6.2022.267676>

186. Zhelavskyi, M. A., Platonov, O. M., Kucheryavyi, Y. P., & Stohnii, Y. M. (2023). Aprobation of platelet aggregation inhibitor from *Echis multisquamatis*

snake venom *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. *Biotechnologia Acta*, 16(5), 55–60.

<https://doi.org/10.15407/biotech16.05.055>

### 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, вчитка рукопису;

Гришук О. О. – редагування, вчитка 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 вчитка рукопису;

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

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

*Гришук 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;

Ребрів 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;*

*Грищук В. І. – написання огляду, редагування та вчитка рукопису*

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

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

*Чернищенко Т. М. – дослідження, методологія;*

*Костюченко О. П. – дослідження, методологія;*

*Клименко К. П. – дослідження, методологія;*

*Платонов О. М. – дослідження, візуалізація;*

*Іващенко О. І. – дослідження;*

*Чернищенко В. О. – ресурси, інтерпретація результатів, концептуалізація, вчитка 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.**, Kucheryavyi, 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.