

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу

Олега ПЛАТОНОВА

«АНТИТРОМБОТИЧНА ТА АНТИПРОЛІФЕРАТИВНА ДІЯ АНТАГОНІСТА ІНТЕГРИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ»,

яка подається на здобуття наукового ступеня

доктора філософії

у галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія

Інтегринові рецептори - це велика родина трансмембранних гетеродимерів, утворених шляхом нековалентного з'єднання α - і β -субодиниць, які разом утворюють 24 різних види рецепторів. Окрім своєї класичної ролі в розвитку та тканинній організації, інтегрини суттєво регулюють імунні функції, опосередковуючи адгезію, міграцію та передачу сигналів між клітинами та позаклітинним матриксом. Інтегрини беруть участь у регуляції проліферації, інвазії, міграції та ангіогенезу пухлинних клітин; вони також сприяють агрегації імунних клітин для опосередкованої елімінації пухлин. Важлива роль інтегринів у прогресуванні онкологічних захворювань дала цінні підказки для діагностики та цілеспрямованого лікування онкологічних захворювань. Крім того, багато інгібіторів інтегринів були досліджені в клінічних випробуваннях з метою пошуку ефективних схем лікування та зменшення побічних ефектів. Через складність механізму прогресування онкологічних захворювань, опосередкованого інтегринами, відкритим лишається питання застосування терапії, спрямованої на інтегринові рецептори, у дослідженні та розробці імунотерапії онкологічних захворювань.

Інтегрини відіграють важливу роль у регуляції процесів функціонування макрофагів, включаючи активацію, адгезію, міграцію, фагоцитоз, прозапальні та протизапальні ефекти. Порушення регуляції інтегринів призводить до імунозалежних захворювань, таких як розсіяний склероз, артрит, рак, а також деяких захворювань, пов'язаних із взаємодією інтегринів імунних клітин з їхніми рецепторами, зокрема хвороб Альцгеймера та Паркінсона, легневих патологій (таких як астма та хронічна обструктивна хвороба легень) та атеросклерозу. При аутоімунних захворюваннях, таких як розсіяний склероз та запальні

захворювання кишечника, надмірно активний інтегрин-опосередкований трансфер призводить до надмірної лейкоцитарної інфільтрації та пошкодження тканин. Інтегрини також модулюють пухлинно-асоційоване запалення і можуть бути захоплені пухлинними клітинами для створення імуносупресивного мікросередовища. Ретроспективний аналіз показує, що інтегрини є як факторами, що сприяють розвитку патології, так і перспективними мішенями для втручання.

Таким чином, дисертаційна робота Олега ПЛАТОНОВА, яка стосується вивчення інтегрин-опосередкованих взаємодій у процесах агрегації тромбоцитів та проліферації пухлинних клітин як *in vitro*, так і *in vivo*, є актуальною та має теоретичне і практичне значення.

В огляді літератури (перший розділ дисертаційної роботи) представлена основна інформація по гемостазу та одних з його основних компонентів, що допомагає при пошкодженні – тромбоцитах; описується важливість як інтегринових рецепторів та їх взаємодій у підтримці функціонування міжклітинних взаємодій, описана структурна та функціональна різноманітність дезінтегринів. Згадуються препарати на основі дезінтегринів, які були апробовані на моделях пухлинного росту *in vivo*, йдеться про дезінтегрини з отрути змій. Вагома частина першого розділу приділяється також опису різноманіття моделей канцерогенезу, їх особливостям та характеристиці.

В другому розділі описані пункти матеріалів та методів, що є обов'язковими пунктами для дисертаційної роботи, й, варто відмітити, пунктів доволі багато. Перераховано 8 моделей та висновки біоетичних комісій й описано 16 використаних методів.

Третій розділ присвячений згаданим тваринним моделям, суть яких полягає у дослідженні агрегаційної здатності тромбоцитів за патологічних станів різного генезу. Патології, при яких було виміряно та проаналізовано агрегаційну здатність тромбоцитів, наступні: діабет, викликаний ожирінням; атеросклероз, канцерогенез; гепатит; гепатоз; LPS-індуковане запалення; гострий радіаційний синдром; імунізація фрагментом S-шипа SARS-CoV-2. Після аналізу робиться висновок, що при патологіях, які пов'язані з підвищенням агрегаційним

потенціалом тромбоцитів, необхідним є застосування високоспецифічного інгібітора агрегації тромбоцитів.

Четвертий розділ присвячено отриманню з цільної отрути дезінтегринів та їх характеристиці за допомогою агрегатометрії в збагаченій тромбоцитами плазмі крові умовно здорових донорів. Було отримано фракції, що мали інгібіторний ефект на процес агрегації тромбоцитів, з отрути *Bitis arietans*, *Calloselasma rhodostoma* та *Echis multisquamatus*, було електрфоретично підтверджено чистоту протеїнів після додаткових хроматографічних очисток. Також було зроблено MALDI-TOF мас-спектрометричний аналіз. Результат аналізу показав, що у фракціях з отрути *Bitis arietans*, *Calloselasma rhodostoma* та *Echis multisquamatus*, які мали інгібіторний ефект на процес агрегації тромбоцитів, є компоненти 13,7 та 9 kDa; 13,1; та 14,9 kDa відповідно. Імуноензимний аналіз зв'язування анти-GPIIb з активованими тромбоцитами в присутності дезінтегринів підтвердив, що всі досліджувані протеїни володіли здатністю зв'язуватися з GPIIb/IIIa-рецептором тромбоцитів. Для більш детальної характеристики було обрано дезінтегрин з отрути *Echis multisquamatus*, який показав себе найефективнішим.

П'ятий розділ присвячений ідентифікації обраного дезінтегрину для його більш детальної характеристики. Здійснений амінокислотний аналіз показав високий вміст цистеїну в досліджуваному зразку, що є характерним для дезінтегринів з отрути змії. Окрім цього аналізу був здійснений 2D електрофорез та аналіз по гомології методом трипсинолізу, що дали змогу знайти структуру вже існуючого в базі даних дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* та, взявши її за основу, побудувати теоретичну модель 3D структури.

Шостий розділ містить результати досліджень здатності дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* інгібувати агрегацію тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові жінок з ускладненою вагітністю та за умов внутрішньовенного введення щурам *in vivo*. Дезінтегрин виявився ефективним у всіх зразках збагаченій тромбоцитами плазмі крові жінок з ускладненою вагітністю, в тому числі й за умов прийому антикоагулянтів та за

аспіринорезистентності. У *in vivo* моделі також було виявлено ефективну антиагрегантну дію.

Сьомий розділ, найбільш цікавий, складається з перевірки антипроліферативної дії дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* у культурі *in vitro* та у двох – щурячій та мишачій – тваринних моделях *in vivo*. Перевірка *in vitro* складалась з МТТ-тесту на виживаність за присутності дезінтегрину, тесту на прикріплення та за характером впливу на клітинний цикл. Використано клітини лінії карциноми легень Льюїс (LLC), HeLa, лінії BV-2 (мікроглії миші) та МАЕС (клітин ендотелію аорти миші) й визначено показники IC50, пригнічення субстрат-залежного росту та розподіл клітин за фазами циклу. Складова *in vivo* полягала в аналізі динаміки розвитку пухлини та метастазування. 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. Виявлено майже повну відсутність метастазів у мишей за умов введення дезінтегрину.

Восьмий розділ, заключення, представлений схемою досліджень та її поясненням. Висновки змістовні.

Зауваження та питання.

1. У роботі наведено дані про ефективність дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* в умовах аспіринорезистентності. Чи проводилась порівняльна оцінка механізмів дії дезінтегринів та інгібіторів P2Y12-рецепторів (наприклад, клопідогрелю) у подібних умовах?

2. Дисертантом було продемонстровано пригнічення метастазування у тваринній моделі при введенні дезінтегрину. Чи можна, на вашу думку, вважати ефект прямим наслідком дії на пухлинні клітини, чи йдеться також про вплив на мікрооточення пухлини (ендотелій, імунні клітини, цитокіни)? Чи вивчалися супутні зміни у цих компонентах?

3. У мас-спектрометричному аналізі дезінтегрину з отрути *Echis multisquamatus* визначено його молекулярну масу та склад. Чи проводилась структурна порівняльна оцінка з відомими дезінтегринами з групи RGD-

мотивів? Якщо так, то які саме мотиви відповідальні за його специфічність до GPIIbIIIa?

4. Чи спостерігались якісь ознаки токсичності чи побічні дії дезінтегринів у *in vivo* дослідях (зміни поведінки, маси тіла, органів)? Якщо ні – як це було оцінено?

5. Робота має значний практичний потенціал. Чи розглядає автор можливість подальшого виведення дезінтегринів на етап доклінічного тестування (наприклад, токсикокінетика, імуногенність)? Які труднощі, на вашу думку, постають перед розробкою дезінтегринів як фармакологічних засобів?

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

Рецензент

доктор біологічних наук, професор,


член-кореспондент НАН України

головний науковий співробітник

Інституту біохімії

ім. О.В. Палладіна НАН України

Денис КОЛИБО

Підпис 
ЗАСВІДЧУЮ
Зав. канцелярією
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
національної академії наук України
"23" 07 2025 р.

