



ГРАБОВСЬКИЙ
Олексій Олегович —
доктор філософії (PhD),
молодший науковий
співробітник відділу структури
та функції білка Інституту
біохімії ім. О.В. Палладіна НАН
України

ЯК РОЗКРИТИ ТА ПІДКОРИТИ МЕХАНІЗМИ КОАГУЛЯЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДІВ *IN SILICO*

За матеріалами наукового повідомлення
на засіданні Президії НАН України
30 жовтня 2024 р.

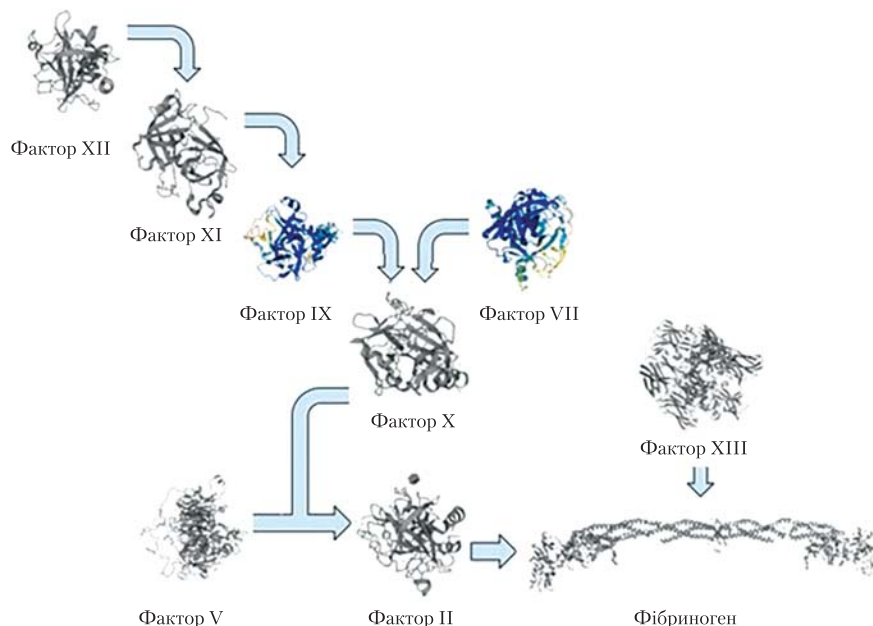
Доповідь присвячено демонстрації можливостей застосування методів in silico для розроблення нових терапевтичних сполук. Наведено приклад створення прототипу антитромботичного препарату на основі пептидів-міметиків суперспіральної ділянки молекули фібрину(оген)у. Функціонально активні сайти молекули і відповідну послідовність пептидів було передбачено in silico, а дослідження синтезованих пептидів in vitro повністю підтвердили їхню ефективну інгібіторну дію на полімеризацію фібрину. Методи докінгу та молекулярної динаміки було також використано для передбачення структури пептидів — похідних N-кінцевого фрагменту стафілокоагулази, який має здатність неензиматично активувати протромбін.

Ключові слова: кровообіг, тромбоз, кровотеча, фібрин, пептиди, протромбін, молекулярний докінг.

Система гемостазу — це комплекс судинних, тромбоцитарних і гуморальних компонентів плазми крові, які забезпечують, з одного боку, циркулювання крові в рідкому стані, а з іншого — швидке припинення кровотечі в разі ушкодження судин. Запуск ензиматичного каскаду системи зсідання крові приводить до формування активного тромбіну, який у свою чергу перетворює фібриноген на фібрин, здатний до полімеризації і формування тривимірної сітки фібрину — каркаса тромбу. Тривалі дослідження механізмів системи коагуляції дозволили сформуванати загальні уявлення про цю складну систему та зрозуміти, як саме структурні особливості факторів зсідання крові дозволяють їм здійснювати свою функцію в процесі тромбоутворення (рис. 1).

Порушення регуляторних механізмів гемостазу може призвести до внутрішньосудинного тромбоутворення, що спричиняє такі небезпечні захворювання, як інфаркт міокарду, тром-

Рис. 1. Репрезентація класичної схеми зсідання крові з використанням просторових моделей основних протеїнів системи коагуляції у 3D-виді. Наведено структури, отримані з Protein Data Bank та AlphaFold database



боемболія легеневої артерії або ішемічний інсульт. З іншого боку, при кровотечах, зокрема внаслідок поранень, необхідно максимально швидко і ефективно активувати систему зсідання крові та припинити крововтрату. Саме кровотечі є головною причиною летальних випадків у медицині катастроф та у військово-польовій медицині.

Тому важливим завданням біотехнології та медицини є пошук ефекторів, які були б здатні інгібувати внутрішньосудинне тромбоеутворення для запобігання тромбозам або ж стимулювати екстраваскулярне тромбоеутворення для запобігання крововтраті.

Важливим засобом пошуку таких ефекторів та розроблення на їх основі нових лікарських препаратів починаючи з минулого століття є комп'ютерний дизайн лікарських засобів (CADD), одним із ключових інструментів якого є віртуальний скринінг. Основна мета віртуального скринінгу — скоротити кількість експериментів у лабораторії шляхом відбору найбільш перспективних сполук з великих баз даних, які можуть складатися з мільярдів і навіть трильйонів низькомолекулярних органічних сполук. Розрізняють структурно-орієнтований та ліганд-орієнтований типи віртуального скринінгу.

Структурно-орієнтований віртуальний скринінг (Structure-based Virtual Screening, SBVS) фокусується на тривимірній структурі цільової молекули, наприклад протеїну, на відміну від ліганд-орієнтованого віртуального скринінгу (Ligand-based Virtual Screening, LBVS), де аналізують відомі активні та неактивні ліганди цільової молекули і на основі їхньої хімічної структури створюють моделі для пошуку нових лігандів. Для використання SBVS необхідна наявність якісної структури, яку отримують за допомогою методів рентгеноструктурного аналізу, ядерного магнітного резонансу, криоелектронної мікроскопії.

Нещодавно до цього переліку додалася AlphaFold2 — модель штучного інтелекту, яка передбачає просторову структуру протеїнів на основі їхньої амінокислотної послідовності [1]. За розроблення і впровадження AlphaFold2 Деміс Хассабіс і Джон Джампер цього року отримали Нобелівську премію з хімії. На сьогодні база даних AlphaFold2 налічує понад 200 млн структур протеїнів.

Крім наявності 3D-структури цільової молекули, необхідно також мати інструмент, який дозволяв би швидко перебирати положення лігандів у сайті зв'язування та аналізувати силу

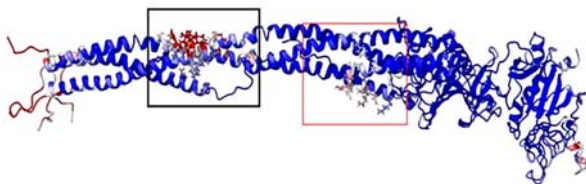


Рис. 2. Визначені за допомогою ScanNet сайти, які можуть бути залучені до протеїн-протеїнових взаємодій фібрину. Квадратом зліва позначено сайт, який відповідає шарнірній ділянці фібрину, квадратом справа — потенційне місце взаємодії пептидів, які імітують фрагменти шарнірної ділянки фібрин(огену)

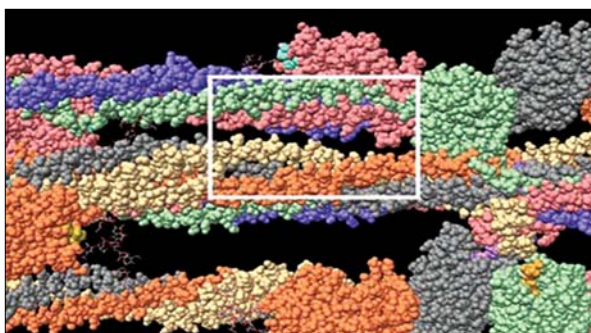


Рис. 3. Теоретична модель двох латерально-асоційованих протофібрил [5]. Прямокутником позначено ймовірний інтерфейс взаємодії між суперспіральними ділянками

зв'язування. Для цього використовують метод молекулярного докінгу. В результаті його застосування отримують список сполук, ранжованих за докінговою енергетичною функцією, і відбирають з нього необхідну кількість сполук для синтезу та подальшого тестування *in vitro*.

Незважаючи на низку недоліків, SBVS, як і інші методи *in silico*, набули широкого використання, особливо на етапах раннього пошуку ліків. SBVS дозволяє знизити витрати, підвищити швидкість розроблення та відкрити нові потенційні терапевтичні молекули.

Метою нашої роботи був пошук перспективних ефекторів системи зсідання крові з використанням засобів *in silico*.

Один із напрямів наших досліджень полягає в розробленні нових сполук, здатних пригнічувати полімеризацію фібрину та формування

фібринового згустку — каркаса тромбу, тобто **запобігати внутрішньосудинному тромбоутворенню**. Слід зауважити, що на сьогодні немає антитромботичних сполук, спрямованих на цю стадію зсідання крові, — всі доступні антикоагулянти діють на фактори каскаду або тромбоцити, що обмежує їхню ефективність за деяких патологічних станів.

Полімеризація фібрину відбувається в два етапи. Під час першого етапу завдяки взаємодії комплементарних центрів полімеризації «А»:«а» молекул фібрину формуються протофібрили. Під час другого — сформовані протофібрили латерально асоціюють, формуючи тривимірну сітку фібрил і зрештою — фібриновий згусток. Механізми, що лежать в основі латеральної асоціації, до кінця ще не з'ясовано, проте численні дані вказують на залучення до цього процесу суперспіральних ділянок молекули фібрину [2].

Для визначення можливих сайтів протеїн-протеїнових взаємодій у суперспіральній ділянці молекули фібрину ми використали ScanNet (Spatio-Chemical Arrangement of Neighbors Network), що являє собою інтерпретовну, багатомасштабну систему глибокого навчання [3]. Один із таких сайтів було виявлено в частині шарнірної ділянки молекули фібрину (перший сайт), а інший — в С-кінцевій частині суперспіральної ділянки (другий сайт) (рис. 2).

Раніше в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було отримано моноклональне антитіло FnI-3С, специфічне до фрагменту В β 122-134 шарнірної ділянки молекули фібрину, яке ефективно інгібувало латеральну асоціацію протофібрил [4]. Це відкриття узгоджується із запропонованою у статті [5] моделлю латеральної асоціації протофібрил, згідно з якою протофібрили взаємодіють завдяки D-регіонам молекул фібрину, що належать різним протофібрилам. При цьому суперспіральні ділянки молекул фібрину сусідніх протофібрил наближаються одна до одної, взаємодіючи бічними ланцюгами амінокислотних залишків (рис. 3).

Логічно припустити, що екранувавши цю контактну ділянку пептидом, можна заінгі-

бувати латеральну асоціацію протофібрил і запобігти тромбоутворенню. Для цього було синтезовано пептиди MEILRGDFSSANN, QKRQKQVKDN та NPDESSKPN, які відповідають амінокислотній послідовності фрагментів шарнірної ділянки фібрину A α 91-103, B β 125-135 та γ 69-77 відповідно.

Аналіз турбідиметричних кривих полімеризації фібрину за присутності пептидів дав змогу виявити концентраційну залежність — кожен з трьох досліджуваних пептидів пригнічував формування протофібрил (рис. 4).

Зокрема, за концентрації кожного з пептидів 1 мМ lag-період істотно зростає: за присутності пептиду A α 91-103 — в 3 рази, B β 125-135 — в 4,5 рази, γ 69-77 — в 1,75 рази. Виявлене подовження lag-періоду пов'язане не з блокуванням центрів полімеризації «А» чи «а», а з відтермінуванням початку латеральної асоціації, оскільки, згідно з нашою гіпотезою, зв'язування пептидів стерично блокує місце розташування молекули фібрину з іншої протофібрили.

Додатково було проведено молекулярний докінг, який підтвердив принципову можливість взаємодії цих трьох пептидів з комплементарним сайтом молекули фібрину (див. рис. 2, правий прямокутник). Методами *in silico* проаналізовано також ключові взаємодії між ними, що дозволить раціонально підійти до пошуку їхніх подальших модифікацій з метою досягнення оптимального інгібіторного ефекту.

Іншим важливим аспектом практичної спрямованості вивчення молекулярних механізмів системи зсідання крові є **пошук активаторів екстрасудинного тромбоутворення**. Раніше в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було розроблено кровоспинний комбінований засіб «Карбогемостат», який складається з двох компонентів: ензимного активатора протромбіну та сорбуючої пов'язки на основі високоактивованих вуглецевих матеріалів [6]. Було показано, що в разі застосування Карбогемостату рівень крововтрати є меншим, ніж при використанні комерційно доступних гемостатиків Celox (Велика Британія) або QuikClot (США).

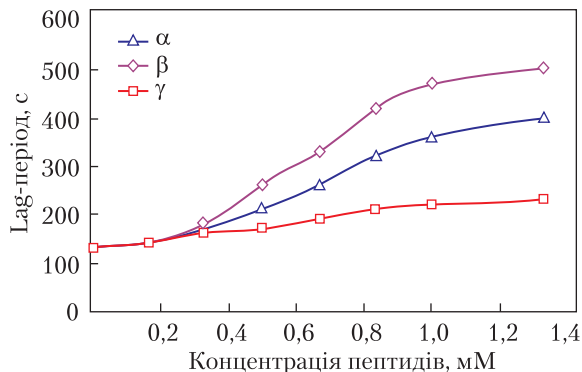


Рис. 4. Подовження lag-періоду полімеризації фібрину, індукованої АЧТЧ-регентом у плазмі крові, за присутності пептидів, які імітують фрагменти шарнірної ділянки фібрин(оген)у; α — A α 91-103 (MEILRGDFSSANN); β — B β 125-135 (QKRQKQVKDN); γ — γ 69-77 (NPDESSKPN)

Попри те, що клінічні випробування цієї розробки були успішними, застосування ензимного активатора протеїнової природи значно обмежує масштаби виробництва «Карбогемостату». Натомість заміна ензиматичного активатора протромбіну протеїнової природи на неензиматичний низькомолекулярний ефектор дозволила б збільшити його ефективність та доступність.

У пошуках ефективного активатора протромбіну — попередника активного тромбіну, який перетворює фібриноген на фібрин, здатний до полімеризації, ми зосередили свою увагу на стафілокоагулазі. Цей протеїн, продукований *Staphylococcus aureus*, здатен активувати протромбін неензиматично, вбудовуючись своїм N-кінцевим пептидом у Pe-16 кишеню молекули та індуючи тим самим конформаційні перебудови в каталітичному сайті, а також активацію протромбіну [7] (рис. 5).

Ми синтезували пептид, який імітує N-кінцевий фрагмент стафілокоагулази IVTKDYSKE, методом твердофазного синтезу з використанням Fmoc-захисених амінокислот і подальшим очищенням методом HPLC, після чого перевірили його здатність активувати протромбін у плазмі крові. Появу тромбін-подібного активного центру визначали за допо-

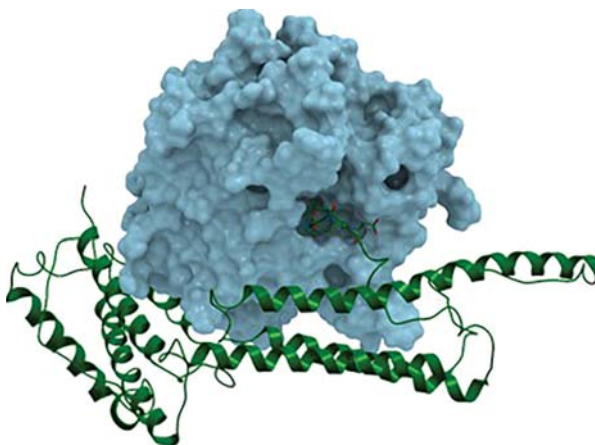


Рис. 5. Комплекс протромбіну (світлий) зі стафілокогулазою (темний). Видно взаємодію Pe-16 кишені протромбіну з N-кінцевим фрагментом стафілокоагулази. Наведено структури, отримані з Protein Data Bank

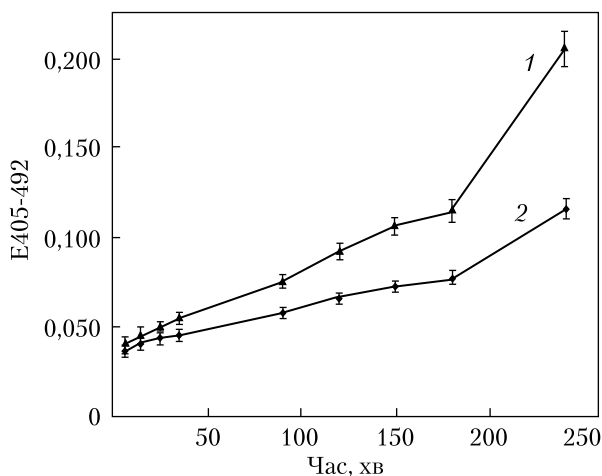


Рис. 6. Зміна оптичної густини при розщепленні хромогенного субстрату S2238 неензиматично активованим за допомогою пептидів протромбіном: 1 – пептид, який імітує N-кінцевий фрагмент стафілокоагулази IVTKDYSKE (контрольний); 2 – пептид з модифікованою структурою I***DYSKE, де * – заміна амінокислотного залишку

могою тромбін-специфічного хромогенного субстрату S2238.

Виявлено, що пептид IVTKDYSKE має здатність помірно активувати протромбін, зумовлюючи появу в плазмі крові тромбін-поді-

бного активного центру, здатного розщеплювати хромогенний субстрат (рис. 6, крива 2).

Для підвищення ефективності пептидного активатора протромбіну ми використали молекулярний докінг і молекулярну динаміку та запропонували амінокислотні заміни, які, за розрахунковими даними, мали б збільшити ефективність зв'язування з Pe-16 кишенню протромбіну. Підвищення ефективності активатора протромбіну, передбачене *in silico*, було підтверджено в прямому експерименті *in vitro* (рис. 6, крива 1).

Додатково з використанням підходів *in silico* ведеться робота над розробленням активатора протромбіну непептидної природи. Для цього було створено модель для молекулярного докінгу і бібліотеку низькомолекулярних сполук на основі фармакофорної моделі, ефективність якої належить перевірити *in vitro*.

Висновки. Методи *in silico*, комп'ютерне моделювання, прогнозування структури макромолекул у розчині – це підходи, які відкривають абсолютно нові можливості для біологічної науки. З розвитком штучного інтелекту дедалі більшого поширення набуватимуть віртуальні експерименти, які не лише моделюватимуть молекулярні взаємодії макросполук, а й дозволятимуть прогнозувати ефекти таких взаємодій, оцінювати кінетичні та енергетичні параметри. Застосування методів *in silico* в нашій роботі дало змогу ідентифікувати сайти міжмолекулярних взаємодій протеїнів системи гемостазу і запропонувати структуру їхніх низькомолекулярних ефекторів, здатних інгібувати формування кров'яного згустку або ж, навпаки, – стимулювати тромбоутворення для ефективної зупинки кровотечі.

Автор висловлює щире подяку академіку НАН України С.В. Комісаренку. Планування досліджень здійснювалося разом із науковим керівником доктором біологічних наук В.О. Чернишенком, ідею неензиматичної активації протромбіну пептидами сформульовано та апробовано спільно з О.Ю. Цуваревим (Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка).

REFERENCES

1. Jumper J., Evans R., Pritzel A. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021. **596**: 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
2. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin Formation, Structure and Properties. In: Parry D., Squire J. (eds) *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*. Subcellular Biochemistry. Vol. 82. Springer, Cham, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_13
3. Tubiana J., Schneidman-Duhovny D., Wolfson H.J. ScanNet: an interpretable geometric deep learning model for structure-based protein binding site prediction. *Nat. Methods*. 2022. **19**: 730–739. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01490-7>
4. Lugovskoy E.V., Gritsenko P.G., Kolesnikova I.N., Lugovskaya N.E., Komisarenko S.V. A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin beta-chain. *Thromb. Res.* 2009. **123**(5): 765–770. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.08.024>
5. Yang Z., Mochalkin I., Doolittle R.F. A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2000. **97**(26): 14156–14161. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.1415>
6. Komisarenko S.V., Lugovskoi E.V., Nikolaev V.G. et al. Combined haemostatic agent for the prevention of blood loss in particular at hemophilia. Inventory Patent. 2017. 19. 114356.
7. Friedrich R., Panizzi P., Fuentes-Prior P. et al. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*. 2003. **425**: 535–539. <https://doi.org/10.1038/nature01962>

Oleksii O. Hrabovskyi

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6690-2398>

HOW TO EXPLORE AND EXPLOIT BLOOD COAGULATION MECHANISMS USING AN IN SILICO APPROACH

According to the materials of report at the meeting of the Presidium of the NAS of Ukraine, October 30, 2024

This study explores the use of in silico methods for developing novel therapeutic compounds, showcasing the design of a prototype antithrombotic drug based on peptide mimetics from the superspiral region of the fibrin(ogen) molecule. Functional sites on the molecule were identified in silico, leading to the selection of peptide sequences that were subsequently synthesized and tested. In vitro studies confirmed the peptides' potent inhibitory effects on fibrin polymerization. Additionally, docking and molecular dynamics simulations were employed to model derivatives of the N-terminal fragment of staphylocoagulase, known for its capacity to non-enzymatically activate prothrombin. The continuation of these approaches holds significant potential for the development of both novel antithrombotic agents and unique blood coagulation activators for rapid hemorrhage control.

Keywords: blood circulation, thrombosis, bleeding, fibrin, peptides, prothrombin, molecular docking.

Cite this article: Hrabovskyi O.O. How to explore and exploit blood coagulation mechanisms using an *in silico* approach. *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* 2024. (12): 88–93. <https://doi.org/10.15407/visn2024.12.088>