

Голові спеціалізованої вченої ради
при Інституті біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
доктору біологічних наук,
провідному науковому
співробітнику відділу біохімії
м'язів Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України
Юрію ДАНИЛОВИЧУ

ВІДГУК

офіційного опонента, кандидата біологічних наук, завідувачки лабораторії
онкофармакології відділу фармакології ДУ “Інститут фармакології та
токсикології НАМН України”
на дисертаційну роботу Валентина ДІДКІВСЬКОГО “Дослідження сполук
**калікс[4]аренового ряду як антитромботичних та проангіогенних
агентів**”, подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі
знань 09 – Біологія, за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія.

1. Актуальність обраної теми дослідження.

У світі питання профілактики та попередження тромбоутворення стоїть дуже гостро. На даний момент ще не було знайдено універсального рішення даної проблематики. Дисертація Валентина ДІДКІВСЬКОГО присвячена вивченню нової сполуки калікс[4]аренового ряду, створеної в Інституті органічної хімії НАН України – калікс[4]арен С-145, що безпосередньо взаємодіє з центром полімеризації фібрину «А» завдяки своїй гідрофобній часті. Оскільки калікс[4]арен С-145 безпосередньо інгібує формування протофібрил фібрину ($IC_{50} = 2,5 \times 10^{-6}$), запобігаючи утворенню полімерного фібрину, то він може бути використаний як ефективний антитромботичний засіб, що було показано в умовах як *in vitro*, так і *in vivo*. Дисертаційна робота актуальна тим, що присвячена дослідженню сполук калікс[4]аренового ряду саме як антитромботичних агентів та підбору умов для їх застосування *in vivo*, що дозволило провести доклінічні дослідження. Це дозволить е майбутньому провести клінічні дослідження та впровадити антитромботичні засоби нового покоління.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота Валентина ДІДКІВСЬКОГО містить результати експериментальних досліджень, які було виконано у відділі структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України відповідно до плану науково-дослідних робіт: 0121U110361 «Створення прототипу лікарського препарату «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» та його доклінічні дослідження», 2021; 0119U000660 «Розробка прототипу лікарського препарату з антитромботичною та проангіогенною дією на основі калікс[4]арену С-145», 2019; 0115U003650 «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих антифібринолітичних та антитромботичних агентів», 2015-2019; 0123U100894 «Створення сучасних каліксаренових регуляторів біохімічних процесів для медицини та біотехнології», 2023-2024 рр.

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків сформульованих у дисертації.

Аналіз змісту дисертаційного дослідження Валентина ДІДКІВСЬКОГО та опублікованих наукових публікацій дозволяє стверджувати, що наукові положення, висновки і рекомендації представленої наукової роботи мають достатнє теоретичне та методологічне обґрунтування. Поставлені завдання, об'єкт, предмет та мета дослідження у повній мірі відповідають темі дисертаційної роботи.

Для досягнення поставленої мети, яка полягала у виборі оптимальної сполуки калікс[4]аренового ряду з антитромботичними властивостями, підборі умов для її застосування *in vivo*, Валентином було визначено ряд завдань, які є взаємопов'язаними та цілком відображають зміст роботи. Для виконання поставлених завдань автор застосував комплекс методів, таких як АЧТЧ, МТТ-тест, методи аналітичної хімії, гістологічні методи, статистичні методи, що дало змогу досить повно розкрити обрану тему дослідження.

4. Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів.

Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки проведена дисертантом робота є достатньо комплексною, всебічною, виконана на високому науковому рівні. Застосовані в роботі методи дозволили підтвердити висунуті дисертантом гіпотези. Отримані результати є якісними і не містять ознак підробки.

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

На підставі проведеного аналізу дисертаційного дослідження Валентина ДІДКІВСЬКОГО можна зробити висновок, що наукові положення, висновки і рекомендації, які сформульовані у дисертації, є достовірними, містять усі елементи новизни та мають науково-практичну цінність для галузі знань з біології. Погоджуючись в цілому із сформульованими в дисертаційному дослідженні конкретними положеннями, які визначають наукову новизну отриманих результатів, особливо наголошу на окремих з них, що, на мою думку, є найбільш важливими і вагомими.

Вперше показано, що, на відміну від калікс[4]арену C-145, сульфур-модифікована форма C-145S ефективно інгібує гідроліз фібринового згустку та стимулює життєздатність ендотеліоцитів у культурі. Визначено напівлетальну дозу калікс[4]арену C-145 ($LD_{50} = 1420$ мг/кг) і показано, що він є низькотоксичною сполукою, придатною для застосування *in vivo*.

Визначено, що максимальна антитромботична дія калікс[4]арену C-145 спостерігається на 4-6 годину після внутрішньовенного або перорального введення лабораторним тваринам у дозі 12 мг/кг маси тіла та зникає через 24 години. Доведено, що калікс[4]арен C-145 ефективно інгібує процес полімеризації фібрину в плазмі крові спонтанно гіпертензивних щурів які

отримували дієту з високим вмістом холестеролу (3 %) або вісцерального жиру (30 %), і тим самим надає антитромботичний ефект. Вперше виявлено протекторну дію калікс[4]арену C-145 на стінку аорти та на серцевий м'яз в умовах експериментального інфаркту міокарда. Показано відсутність сенсibiliзаційної дії та мутагенного ефекту калікс[4]арену C-145. Створено прототип антитромботичного засобу на основі калікс[4]арену C-145.

6. Практичне значення одержаних результатів.

У ході роботи визначено значний антиполімеризаційний ефект калікс[4]арену C-145 та проведено його апробацію *in vivo* для зниження прокоагулянтного потенціалу. Зокрема, обрано ефективну дозу, визначено час появи у кровотоці за умов внутрішньовенного та перорального введення лабораторним тваринам. Показано ефективну антитромботичну дію за умов експериментального інфаркту міокарду, високожирової та холестерольної дієти у щурів. Представлені в дисертації результати свідчать, що калікс[4]арен C-145 як низькомолекулярна та потенційно неімуногенна сполука видається перспективним антитромботичним агентом. Розпочато проведення доклінічних досліджень, зокрема, визначено гостру токсичність та показано відсутність мутагенного ефекту, що відкриває шлях до початку проведення клінічних досліджень в подальшому.

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях.

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації в повній мірі відображені в 5 опублікованих статтях (4 з яких належать до міжнародних наукометричних баз) та 6 тезах доповідей на наукових конференціях. Публікації як за кількістю, так і за якістю відповідають нормативним вимогам.

8. Структура дисертації.

Дисертація чітко структурована та складається з вступу, огляду літератури, експериментальної частини, що включає опис матеріалів і методів дослідження, і викладення результатів дослідження та їх обговорення, заключення, висновків, списку літератури, що містить 106 джерел. Дисертація містить 9 таблиць, 59 рисунків. Загальний обсяг дисертації становить 143 сторінки.

У вступі дисертантом сформульовані актуальність теми, мета та завдання дослідження, наукова новизна, теоретичне та практичне значення роботи.

В огляді літератури узагальнено описано сучасний стан досліджень механізмів внутрішньосудинного тромбоутворення, що є однією з головних причин летальних випадків осіб працездатного віку у світі. Охарактеризовані наявні дані щодо сполук, які здатні різними шляхами ефективно запобігати утворенню тромбу. В цілому огляд написаний кваліфіковано і дає уяву про сучасний стан проблеми. Варто звернути увагу на недостатню кількість ілюстративного матеріалу (рисунків та схем) у огляді літератури, що суттєво ускладнює сприйняття тексту.

В третьому розділі наведено результати власних досліджень, а саме описано вибір сполуки калікс[4]аренового ряду із широкого спектра каліксаренів. Головний акцент зроблено на антитромботичних властивостях калікс[4]арен С-145. Треба підкреслити, що дуже важливим надбанням роботи є те, що було визначено напівлетальну (LD50) та терапевтичну концентрацію калікс[4]арен С-145. Також було проведено ряд доклінічних досліджень калікс[4]арену С-145.

На основі одержаних даних дисертантом сформульовано 8 висновків, які повністю витікають із результатів дослідження і відповідають завданням, які були поставлені при виконанні роботи.

9. Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення

В цілому, робота написана й оформлена досить кваліфіковано, добре вичитана та містить необхідну для подібного роду праць інформацію. Разом з тим, трапляються незначні орфографічні, стилістичні помилки та недбалості форматування. Незначні похибки в оформленні не зменшують важливість виконаного наукового дослідження. Попри відсутність принципових недоліків, є незначні зауваження, що стосуються наступного.

1. Ряд методів експериментальної роботи не описано, зокрема:
культивування лінії клітин ендотеліоцитів PAE;
визначення фібринолітичної активності за дії калікс[4]арену C-145 та сульфур-модифікованої форми C-145S;
дослідження антитромботичного ефекту лікарської субстанції C-145;
недостатньо описано морфометричні методи визначення товщини стінки аорти та площі фіброзу міокарду щурів (кількість зрізів на тварину, крок між зрізами). Вочевидь для морфометрії брали кожен 20 зріз товщиною 5 мкм, всього на тварину аналізували декілька десятків зрізів.
2. У теоретичній частині роботи відсутній ілюстративний матеріал, доцільно було подати схему дії калікс[4]арену C-145. Без цих схем огляд літератури сприймається досить важко.
3. Спираючись на які дані було обрано дози калікс[4]арену C-145 для експериментальних моделей, зокрема дозу 12 мг/кг?
4. Не достатньо обґрунтовано вибір діапазону концентрацій C-145 та C-145S (10-50 мкМ) на компоненти системи гемостазу *in vitro*.
5. Замість проліферативної активності у випадку МТТ-тесту доцільно вживати термін «життєздатність».
6. У розділі Статистика опис статистичних процедур представлено зовсім лаконічно. Не вказано у яких випадках для порівняння вибірок були застосовані ті чи інші параметричні або непараметричні критерії. Крім того, в деяких випадках було б бажано використовувати відповідні методи множинних порівнянь.

7. У випадку, якщо зміни наведені автором не є статистично значущими, краще вживати формулювання – спостерігається тенденція.

8. Для оцінки стану стінки судин за умов високохолестерольної дієти потрібно використовувати кількісне дослідження фіброзу: забарвлення по Масону, ІГХ на колаген I та II типів, та більш специфічні маркери, властиві запаленню ендотелію (Ahg II, RAGE, IL-6) або його пошкодженню (Cas-3, Bcl-2).

9. Для оцінки стану судинної системи міокарду за умов холестерольної та високожирової дієти потрібно використовувати маркери CD31. Оцінка стану міокарду потребує морфометрії на вміст фіброзної тканини, розміри та щільність кардіоміоцитів, їх апоптозу та некрозу із використанням специфічних маркерів.

10. На деяких рисунках відсутні або зміщені межі похибок.

Однак, ці зауваження не зменшують високої оцінки представленої дисертаційної роботи, у якій подано нові, сповна аргументовані, дані щодо вибору сполуки калікс[4]аренового ряду з антитромботичними властивостями, підбір умов для її застосування *in vivo*, а також проведення доклінічних досліджень.

10. Висновок

Дисертаційна робота Валентина ДІДКІВСЬКОГО “Дослідження сполук калікс[4]аренового ряду як антитромботичних та проангіогенних агентів”, є логічно завершеною науковою працею, в якій одержані нові дані щодо вибору сполуки калікс[4]аренового ряду з антитромботичними властивостями, підбору умов для її застосування *in vivo*, а також проведення доклінічних досліджень.

За своєю актуальністю, науковою новизною, методичним рівнем і теоретичним та практичним значенням, дисертація повністю відповідає вимогам чинного законодавства України, що передбачені в наказі Міністерства освіти і науки України «Про затвердження вимог до

оформлення дисертацій» від 12 січня 2017 № 40 і п. 6-9 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 та «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів», затвердженої Постановою Кабінету Міністрів України №502 від 19 травня 2023 року.

Здобувач Валентин ДІДКІВСЬКИЙ заслуговує присудження йому ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія.

Канд. біол. наук,
завідувачка лабораторії онкофармакології
відділу фармакології
ДУ «Інститут фармакології та
токсикології НАМН України»



Тетяна КАРАЦУБА

