

РЕЦЕНЗІЯ

**на дисертаційну роботу Валентина ДІДКІВСЬКОГО
за темою «Дослідження сполук калікс[4]аренового ряду як
антитромботичних та проангіогенних агентів»,
що подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія та біохімія**

Дисертація Дідківського В.А. присвячена дослідженню антитромботичних властивостей низки сполук калікс[4]аренового ряду, що включало скринінг їхньої інгібіторної активності по відношенню до полімеризації фібрину та антитромботичної дії в експериментах *in vivo*.

Актуальність обраної теми дослідження.

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження не викликає сумнівів, оскільки на сьогоднішній день проблема тромбоутворення та асоційованих з ним фатальних захворювань серцево-судинної системи ще далека від вирішення і становить одне з найбільш пріоритетних завдань біохімії та біомедицини. Існуючі на сьогодні підходи лікування тромботичних станів засновані на застосуванні препаратів, що пригнічують агрегацію тромбоцитів, та препаратів-фібринолітиків, які сприяють розчиненню фібринового згустку, що сформувався. Втім, наразі у світі не розроблено та не впроваджено до клінічного застосування жодного препарату, який би попереджав безпосередньо полімеризацію фібрину усередині судини як першопричину формування тромботичних станів. У цьому контексті дані, які представлені у дисертаційній роботі здобувача, становлять вагомe наукове та практичне значення.

Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків сформульованих у дисертації.

Завдання, які було сформульовано у роботі, є цілком адекватні поставленій меті. Зокрема, було заплановано 1) провести скринінг сполук

калікс[4]аренового ряду *in vitro* з метою виявлення серед них інгібіторів полімеризації фібрину; 2) проаналізувати дію обраних сполук на агрегацію тромбоцитів та проліферацію ендотеліоцитів й обрати речовину з вираженими антитромботичними властивостями; 3) визначити напівлетальну дозу (LD50) обраної сполуки калікс[4]аренового ряду; 4) дослідити особливості антитромботичного ефекту обраної сполуки калікс[4]аренового ряду в експериментах *in vivo*; 5) дослідити антитромботичний ефект обраної сполуки калікс[4]аренового ряду за умов експериментального передтромботичного стану у спонтанно гіпертензивних щурів, які отримували дієту з високим вмістом жиру; 6) вивчити ефект обраної сполуки калікс[4]аренового ряду на тканину серцевого м'язу та ключові параметри зсідання крові за умов експериментального інфаркту міокарду щурів; 7) провести тест обраної сполуки калікс[4]аренового ряду на мутагенність та сенсibiliзаційні властивості. Усі поставлені у роботі завдання були у повній мірі виконані, чому посприяло застосування низки сучасних біохімічних, цитологічних та гістохімічних методів дослідження.

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.

Скринінгові тести *in vitro* низки водорозчинних сполук калікс[4]аренового ряду дозволили встановити, що каліксарен C-145 та його

сульфур-модифікована форма C-145S є найбільш ефективними інгібіторами полімеризації фібрину. Через високу здатність модифікованого каліксарену C-145S інгібувати одночасно з полімеризацією фібрину й гідроліз фібринового згустку подальші дослідження проводили з використанням сполуки C-145. Отримані дисертантом результати вперше доводять ефективність застосування калікс[4]арену C-145 як прямого інгібітора полімеризації фібрину *in vivo* з метою зниження прокоагулянтного потенціалу зсідання крові.

Практичне значення одержаних результатів.

Випробування на лабораторних тваринах дали змогу обрати ефективну для зниження здатності крові до коагуляції терапевтичну дозу препарату, яку надалі було застосовано у кількох експериментальних моделях. Зокрема, було встановлено, що максимальна антитромботична дія каліксарену 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. Автором роботи доведено, що каліксарен 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%), забезпечуючи тим самим антитромботичний ефект. Дані щодо протекторної дії каліксарену C-145 на стінку аорти та серцевий м'яз за умов експериментального інфаркту міокарда становлять безперечну новизну роботи. Автор пов'язує реалізацію васкуло- та кардіопротекторних ефектів досліджуваної сполуки із запобіганням нею формуванню тканинних фібринових депозитів, що ушкоджують стінку судини. Значну увагу також привертають ефекти сполуки C-145 за умов створених експериментальних моделей на клітини судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу, що беруть безпосередню участь у формуванні патологічних станів, асоційованих з тромбозами. Зокрема, було показано, що каліксарен C-145 достовірно нормалізував ступінь агрегації тромбоцитів та суттєво знижував її швидкість у гіпертензивних тварин, що утримувалися на високожировій дієті. Важливо

зауважити, що, крім інгібувальної дії С-145 на полімеризацію фібрину та його антитромбоцитарних властивостей, ця сполука каліксаренового ряду виявляє здатність до підсилення активності ендотелійних клітин *in vitro*, що може слугувати підґрунтям для реалізації її проангіогенних властивостей *in vivo*. Виявлені проангіогенні ефекти каліксарену С-145 свідчать про його мультипотентні властивості, які дозволяють нормалізувати функціонування різних молекулярно-клітинних ланок системи гемостазу, запобігаючи як тромботичним явищам, так і ішемізації тканини. Беручи до уваги низьку токсичність С-145 ($LD_{50} = 1420$ мг/кг маси тіла тварини), неімуногенність, відсутність мутагенних властивостей та низьку сенсibilізаційну активність, ця сполука є реальним кандидатом для створення антитромботичного та судинопротекторного препарату комплексної дії. На доказ цього, в окремому розділі дисертації автором висвітлено технологічний процес виготовлення капсульованої форми С-145 як препарату-прототипу для перорального застосування. Приємне враження складає узагальнена схема проведеного дослідження прототипу нового антитромботичного засобу, наведена на рис. 10.1, що доводить глибоке розуміння автором усіх ланок доклінічних випробувань: від скринінгу досліджуваних сполук, усіх етапів експериментальної роботи *in vivo*, до створення лікарської форми препарату. Здобувачем сформульовано 8 висновків, які є цілком адекватними отриманим результатам.

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.

Структура дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота Дідківського В.А. побудована за традиційною схемою та складається з наступних частин: анотації (українською та англійською мовами), переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», опису результатів та обговорення, списку використаної літератури (106 першоджерел), заключення та висновків. Робота містить 59 рисунків та 9 таблиць, об'єм рукопису становить 143 сторінки машинописного тексту.

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

Основні результати дисертаційного дослідження наведено у 5 статтях, 4 з яких у журналах, які відносяться до наукометричних баз, та висвітлено у 6 тезах наукових конференцій, симпозіумів та конгресів, є співавтором 1 патентної заявки. Публікації як за кількістю, так і за якістю відповідають нормативним вимогам.

Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення.

Після ознайомлення з текстом дисертаційної роботи постають певні питання та зауваження, деякі з них мають дискусійний характер, але потребують уточнення автора. У цілому, ознайомлення з дисертаційною роботою залишає позитивне враження, рукопис написано у загальноприйнятому науковому стилі, має чіткий логічний методологічний підхід до викладення матеріалу, робота якісно ілюстрована. Зміст дисертації повною мірою розкриває суть проведеної роботи, її положень, результатів та визначеного наукового напрямку. Попри відсутність принципових недоліків, є незначні зауваження, що стосуються наступного.

Основні питання та зауваження:

1. Авторіві слід узгодити результати, наведені в ілюстративному матеріалі, з їхнім описом у тексті. Зокрема, часто порівнюються ефекти дещо

різних концентрацій сполук-каліксаренів C-145 та C-145S (наприклад, рис. 4.1). На рис. 4.4. у клітинній культурі ендотеліоцитів PAE (porcine aortic endothelial cells) дуже важко розрізнити капіляроподібні структури, про утворення яких йдеться у тексті. На рисунках 7.20 – 7.24 представлені зрізи ділянок міокарду серця спонтанно гіпертензивних щурів, але не надано знімків відповідної тканини контрольних тварин, що обмежує співставлення результатів. Фото щурів на рис. 8.1 (ізопротренол-індукована ішемія міокарду) не несуть відповідного інформативного навантаження.

2. Автор не визначився з інтерпретацією результатів МТТ-тесту, проведеного на культурі ендотеліальних клітин за присутності досліджуваних сполук (активація проліферації клітин чи їхньої метаболічної активності).

3. Гостру токсичність препарату, взятого у 4 дозах, оцінювали на 6 тваринах. Наскільки така постановка випробування вважається коректною?

4. Робота насичена результатами гістологічних досліджень, проте, майже відсутні дані стосовно молекулярних механізмів коригувального впливу C-145 у тканинах стінки аорти та міокарду за створених експериментальних моделей. Було б доцільним визначити вплив каліксарену на рівень ключових біомаркерів апоптозу, некрозу та автофагії. Для підтвердження або спростування протизапальних властивостей C-145 видається більш інформативним визначення рівня C-реактивного протеїну, прозапальних цитокінів, оцінка інфільтрації тканини макрофагами (CD68⁺-клітини).

5. Текст дисертаційної роботи потребує редагування: виправлення граматичних та друкарських помилок, тавтологій, неоковирних термінологічних висловів (полімеризація/антиполімеризація плазми).

6. Статистичну обробку результатів, отриманих в ході експериментів у комплексі, який складався більше, ніж з 3-х груп, слід проводити з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA).

7. На яку ланку фібринолізу спрямована, на думку дисертанта, інгібувальна дія сульфур-похідного каліксарену C-145S?

8. У різних місцях тексту дисертації надано різні рекомендації стосовно дозування лікарського препарату на основі С-145: одноразово та дворазово на добу.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам:

Висловлені зауваження та питання не зменшують наукової цінності представленої роботи. Враховуючи беззаперечну наукову та практичну значимість отриманих результатів, високий методичний рівень, оригінальність запланованих експериментів та значний масив отриманих первинних даних, які відкривають широкі перспективи подальшого розвитку цього напрямку досліджень, вважаю, що дисертація Валентина ДІДКІВСЬКОГО «Дослідження сполук калікс[4]аренового ряду як антитромботичних та проангіогенних агентів» відповідає вимогам «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 12.01.2022 року № 44 та «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів», затвердженої Постановою Кабінету Міністрів України від 19.05.2023 року № 502, а автор представленої дисертаційної роботи Валентин ДІДКІВСЬКИЙ, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091- Біологія та біохімія в галузі знань 09- Біологія.

Завідувач відділу хімії та біохімії ферментів

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна

НАН України,

старший науковий співробітник

д.б.н. Артем ТИХОМИРОВ

