

ВІДГУК

офіційного опонента, члена-кореспондента НАМН України, доктора медичних наук, професора Пархоменка Олександра Миколайовича на дисертаційну роботу Чернишенка Володимира Олександровича «Пошук та вивчення механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, що впливають на зсідання крові», яка подана до спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології та генетики НАН України на здобуття наукового ступеню доктора наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

1. Актуальність обраної теми дисертації.

Дисертаційна робота Володимира Олександровича Чернишенка присвячена актуальному питанню медицини, молекулярної біохімії і біотехнології – пошуку та вивченню механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, здатних впливати на систему зсідання крові. Це питання стосується всіх ланок медицини, в яких попередження небажаного внутрішньосудинного тромбоутворення (інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, венозні тромбози і емболії) та/або лікування наявної кровотечі (внаслідок операції, травми, поранення в умовах збройних конфліктів), є важливою проблемою з наукової і практичної точки зору. Слід зазначити, що смертність тільки від потенційно протромбогенних серцево-судинних захворювань в Україні займає перше місце.

Особливістю дисертаційної роботи є те, що вона базується на широкому використанні сучасних методів із суміжних наук – клітинної біології, гістології, фізіології, фармакології, біохімії, біоінформатики. Все це дозволило запропонувати нові можливості впливу на систему зсідання крові і розробити нові, практично значущі гемостазіологічні методи лікування, а також біоматеріали для їх реалізації.

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

Робота є фрагментом планових НДР Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках декількох міжнародних проектів Європейського союзу (2008-2012 роки) та 15 галузевих наукових програм України (2012-2021 роки): № 230790 European Union, FP7/2008-2012, COMPOSITUM, Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme (2008-2012); № 269099 European Union, FP7-PEOPLE-2010 «Photorelease», Marie Curie International Research Staff Exchange Scheme (2010); № 0112U002624 «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016); № 0114U003217 «Вивчення механізму формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностиків стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2014-2018); № 0115U003645 «Дослідження ролі ВβN-доменів фібриногену в регуляції фізіологічних функцій судинної та тромбоцитарної ланок гемостазу» (2015-2016); № 0115U005241 «Створення комбінованого перев'язувального засобу для зупинки кровотеч та прискорення загоювання ран» (2015-2016); № 0115U003650 «Дослідження каліксаренів як кровозберігаючих, антифібринолітичних та антитромботичних агентів» (2016-2020); № 0117U002808 «Впровадження у виробництво гемостатичних губок на основі колагенової матриці та активатора зсідання крові» (2017); № 0118U000453 «Розробка новітніх інгібіторів зсідання крові на основі фармакологічних агентів, що інгібують ензиматичну активність тромбіну та фактору Ха» (2017-2018); № 0117U003558 «Розробка, доклінічні та клінічні дослідження універсального гемостатичного засобу на основі активатора системи зсідання крові та волокнистих вуглецевих сорбентів» (2017-2021); № 0117U004344 «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017-2021); № 0118U006207 «Біологічні ефекти N-ацилетаноламінів на пухлинні та нормальні клітини» (2018); № 0119U000661 «Клінічна апробація та впровадження методу концентрування тромбоцитів аутологічної плазми

крові для клітинної терапії» (2019); № 0119U000660 «Розробка прототипу лікарського препарату з антитромботичною та проангіогенною дією на основі калікс[4]арену C-145» (2019); № 0119U001795 «Підготовка та проведення клінічних випробувань композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» (2019); № 0114U003217 «Вивчення механізму формування фібринового каркасу тромбу та розробка діагностикумів стану системи гемостазу при запальних процесах, серцево-судинних захворюваннях та хірургічних втручаннях» (2019-2023).

3. Новизна дослідження та отриманих результатів.

За результатами наукового дослідження автор сформулював низку положень, які мають наукову новизну та практичне значення. Проведений аналіз молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення дозволив обрати етап активації протромбіну як найбільш придатну потенційну мішень застосування прокоагулянтних засобів, а агрегацію тромбоцитів і полімеризацію фібрину - як найбільш перспективні об'єкти дії нових антитромботичних препаратів. Це дозволило вперше запропонувати ензимний активатор протромбіну для надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей. Доведено виключне значення етапу активації протромбіну в розробці біотехнологічних підходів для стимулювання екстрасудинного тромбоутворення. Було визначено та отримано низку нових біологічно активних сполук, речовин та біоматеріалів, які впливають на систему зсідання крові.

4. Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.

Комплексне дослідження молекулярних механізмів екстрасудинного та внутрішньосудинного тромбоутворення дозволило сформувати наукову концепцію щодо реперних точок системи гемостазу як потенційних мішеней про- та антикоагулянтних засобів. З використанням цього підходу створені кровоспинні та ранозагоювальні матеріали, які пройшли всебічну апробацію.

Так, було виділено сполуки, які здатні напряму інгібувати активність тромбоцитів крові (метаболіти лігнанів, епігалокатехінгаллат, N-стеароїлетаноламін), або опосередковано (діоксид силіцію). Проте такі відносно інертні для системи зсідання крові наномолекули, як нанодіаманти та фулерени, можуть бути носіями лікарських засобів.

Розроблено прототип перспективного антитромботичного засобу на основі сполуки калікс[4]аренового ряду, що запобігає полімеризації молекули фібрину, запропоновані кровоспинні агенти, які у порівнянні із закордонними аналогами значно перевищують ефективність останніх.

Розроблено і впроваджено у практику спосіб концентрування суспензії функціонально активних тромбоцитів аутологічної крові для клітинної терапії, а методика було успішно адаптована для стимуляції процесів регенерації шкіри.

За участю автора дисертаційної роботи було створенно повний цикл нової медичної технології лікування на основі поєднання ензимного активатора зсідання крові та активованого волокнистого вуглецевого матеріалу створено універсальний засіб для зупинки кровотеч – «Карбогемостат». На моделях судинної та паренхіматозної кровотечі у лабораторних тварин продемонстровано його вищу ефективність порівняно з комерційно доступними кровоспинними засобами.

Автором роботи також запропонований спосіб виготовлення аутологічного фібринового гелю, придатного для прискорення загоєння ран кісткової та паренхіматозної тканини, створено здатну до біодеградації колагенову матрицю, модифіковану ензимним активатором зсідання крові для надання їй прокоагулянтних властивостей.

5. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій сформульованих у дисертації, їх достовірність.

При виконанні наукового дослідження були використані методики, апаратура, лабораторні, інструментальні методи дослідження адекватні поставленим завданням відповідно до сучасних наукових стандартів.

На основі проведеної роботи дисертантом сформульовано 10 висновків, які базуються на фактичному матеріалі і відповідають завданням, що були поставлені при її плануванні. Усі наукові положення та висновки, що випливають із отриманих результатів, вважаються обґрунтованими та достовірними, вони чіткі і конкретні.

6. Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.

Матеріали дисертації відповідають автореферату і в повному обсязі висвітлені 75 друкованих роботах – 35 наукових статтях у фахових вітчизняних наукових журналах, рекомендованих ДАК МОН України, та наукометричних виданнях, в 40 тезах доповідей на наукових конференціях. По результатам дисертаційної роботи отримано 6 патентів України на корисну модель та винахід. Апробація роботи була здійснена під час численних виступів на міжнародних і національних наукових фахових конгресах та конференціях.

7. Оцінка оформлення та змісту дисертації.

Дисертацію викладено українською мовою на 312 сторінках тексту. Робота побудована за класичними принципами. Вона складається зі вступу, в якому описано значимість проблеми, огляду літератури, матеріалів та методів, експериментальної частини, яка має вісім розділів, висновків, списку використаних джерел. Останній включає 242 найменування, більшість із яких англійською мовою. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на 152 рисунках та представлено в 21 таблиці.

Автором сформульовано мету і завдання роботи, актуальність теми, її наукове і практичне значення. В огляді літератури розглянуто матеріали

щодо складу та регуляції системи гемостазу, процесу підтримки гемостатичного балансу в організмі, способів запобігання внутрішньосудинному тромбоутворенню та способам стимулювання екстрасудинного тромбоутворення. Огляд написаний кваліфіковано і дає уявлення про сучасний стан проблеми.

В дисертаційній роботі описано методи дослідження та субстанції, препарати, які були використані під час проведення досліджень. Автором використано сучасні методи -- хроматографічні та електрофоретичні методи, агрегатометрію, спектрофлуориметрію, цитометрію, скануючу електронну мікроскопію, тести для оцінки стану системи гемостазу, турбідиметрію, дослідження ангиогенезу та тромбогенезу в моделі *Danio rerio*, модельні дослідження кровотечі за різних умов та інші.

У 3 розділі роботи був проведений аналіз молекулярних механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення, що дозволило обрати агрегацію тромбоцитів і полімеризацію фібрину найбільш перспективними об'єктами дії нових антитромботичних препаратів. Відповідно визначено низку біологічно активних сполук, речовин та біоматеріалів, які виступають ефекторами тромбоцитів. Особливо цікаві дані отримані відносно полівінілхлориду та поліуретану, модифіковані антиромбіновим препаратом аргатробаном. Також був розроблений спосіб одержання збагаченої тромбоцитами плазми крові людини для отримання нативних непошкоджених функціонально активних тромбоцитів в достатній для ефективного терапевтичного ефекту кількості.

Розділ 4 присвячений терапевтичній оцінці застосування збагаченої плазми крові для проведення клітинної терапії, розділ 5 – вивченню субстанції С-145 на полімеризацію фібрину, процеси зсідання крові, ангиогенез, розділ 6 – створенню та доклінічному випробуванню кровоспинного засобу «Карбогемостату», розділ 7 – одержанню аутологічного фібринового композиту для стимуляції загоювання ран,

репаративного остеогенезу, розділ 8 – створенню гемостатичних губок, 9 – отриманню стабільного препарату тромбіну.

Анотація дисертаційного дослідження викладена українською та англійською мовами, відповідає змісту наукової роботи, написана стисло та грамотно. Список літературних джерел достатній.

8. Зауваження до дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Під час розгляду дисертаційної роботи виник ряд зауважень і побажань. Варто звернути увагу на недостатню кількість ілюстративного матеріалу (рисуноків та схем) у огляді літератури, що суттєво ускладнює сприйняття тексту. При опису схеми системи зсідання крові бажано навести її автора. Під час наведення методів досліджень не всюди є посилання на оригінальне джерело, що не дозволяє оцінити валідність методу. Під час опису клінічної апробації методу клітинної терапії у людини не наведені дані щодо її організації – наявності інформованої згоди, дозволу етичної комісії, методу рандомізації, результатів статистичного аналізу порівняння результатів в обох досліджуваних групах пацієнтів. При описі дослідів з кров'ю людини не наведені дані щодо віку і наявності хронічних захворювань. Чисельність досліджуваних експериментів в деяких випадках є досить малою (5 або 8 дослідів), що робить ускладненою статистичну обробку матеріалу і можливість порівняння результатів.

Хотілося б висловити побажання щодо систематизації отриманих даних у комплексі. Зокрема, важливий внесок у наукову вагу роботи внесло б пряме порівняння інгібування агрегації та активації тромбоцитів досліджуваними агентами, наприклад – епігалокатехінгаллатом, лігнанами та NSE. У роботі бракує інформації про доклінічні дослідження антитромботичного засобу калікс[4]арену C-145, які було б також важливо розглянути.

Як біотехнологічна робота, дисертація спрямована насамперед на досягнення практичного результату, хоча назва постулює розкриття «механізмів дії» досліджуваних агентів.

Проте наведені недоліки і зауваження до дисертації не зменшують наукової новизни і практичної значущості проведеної роботи.

В ході рецензування дисертаційної роботи виникли наступні питання:

1. Чи слід на Ваш погляд сьогодні розглядати систему зсідання крові як наявність окремих ланок тромбоцитарного гемостазу і гемостазу гемокоагуляційного?
2. Чому в роботі не висвітлювалися аспекти попередження і лікування синдрому дисемінованого внутрішньосудинного зсідання крові?
3. Чи широко застосовується в наукових дослідженнях метод оцінки сумарного гемостатичного потенціалу крові за *Blomback* і в чому його переваги?
4. Яка може бути перспектива розробки клінічних засобів рослинного походження, в тому числі лігнанів, для впливу на систему зсідання крові?
5. Чи не планував автор проведення порівняння потенційних антитромботичних засобів між собою або з відомими, які вже використовуються (аспірин, клопідогрель, тикагрелор)?
6. На якому етапі випробувань знаходиться зараз перспективний кровоспинний засіб «Карбогемостат»?

9. Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертаційна робота Володимира Олександровича Чернишенка «Пошук та вивчення механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, що впливають на зсідання крові» є завершеною самостійною науково-дослідною роботою, в якій наведено теоретичне узагальнення і розроблено нові наукові положення, сукупність яких можна кваліфікувати як вирішення проблеми пошуку нових біологічно активних сполук, які впливають на систему зсідання крові, а також розробки на цієї основі інноваційних біотехнологій та матеріалів для корекції порушень гемостазу.

при кровотечах, тромбозах і емболіях. Вважаю, що за актуальністю теми, науково-методичним, науково-практичним значенням дисертаційна робота Володимира Олександровича Чернишенка відповідає вимогам п. 11 та п. 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор Володимир Олександрович Чернишенко заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Член-кореспондент НАМН України,
доктор медичних наук, завідувач відділу
реанімації та інтенсивної терапії
ДУ ННЦ «Інститут кардіології
імені академіка М.Д. Стражеска»
НАМН України, професор

Олександр Миколайович ПАРХОМЕНКО

Бідоля Дмитро Іванович
зав. відділу реанімації та інтенсивної терапії
ДУ ННЦ «Інститут кардіології імені академіка М.Д. Стражеска»
НАМН України, професор