Відгук
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Чернишенка Володимира Олександровича «Пошук та вивчення механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, що впливають на зсідання крові», подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність. Гемостаз – це один із механізмів захисту кровоносної системи від ушкоджень. Порушення системи гемостазу є причиною близько 60% летальних випадків при різного роду патологіях чи травмах. Більше половини цих порушень складають масивні кровотечі або тромбози. В фізіологічних умовах система гемостазу функціонує як єдине ціле і спрямована на забезпечення ефективного кровообігу і припинення кровотечі в разі порушення цілісності судинної стінки. Всі ланки системи гемостазу тісно пов'язані між собою. Зміна функціонування однієї ланки веде до компенсаторних зсувів в функціонуванні інших, а порушення цього балансу призводить до порушення кровопостачання тканин та органів, що спричиняє тяжкі наслідки. В патологічних умовах, зокрема при масивній крововтраті, інтоксикації, атеросклерозі та за низки інших станів, може відбутися порушення компенсаторних механізмів, внаслідок чого стається розвиток гіперкоагуляції, що загрожує тромбозом, або гіпокоагуляції, яка призводить до виникнення неконтрольованих повторюваних кровотеч.

Розуміння цих механізмів має не лише виключне фундаментальне значення, але і важливе практичне застосування. Володіння способами керування про- та антикоагулянтним потенціалами системи гемостазу відкриває перспективи лікування цілої низки найпоширеніших захворювань, пов'язаних з патологічним внутрішньосудинним тромбоутворенням, та порятунку пацієнтів у випадку кровотеч шляхом стимулювання екстрасудинного тромбоутворення. Тому пошук простих та ефективних способів контролю стану системи гемостазу є актуальним біотехнологічним завданням.

Наукова новизна роботи. Кропіткий аналіз молекулярних механізмів тромбоутворення та зупинки кровотечі дозволив обрати агрегацію тромбоцитів і полімеризацію фібрину найбільш перспективними об'єктами дії нових антитромботичних препаратів, а стадію активації протромбіну – ключовою мішенню для специфічних кровоспинних засобів.

Отримані результати дозволили вперше запропонувати ензимний активатор протромбіну для надання біоматеріалам прокоагулянтних властивостей і створити з використанням цього підходу кровоспинні та ранозагоювальні матеріали. Доведено їхню ефективність порівняно з аналогами та підтверджено виключне значення етапу активації протромбіну в розробці біотехнологічних підходів для стимулювання екстрасудинного тромбоутворення.

Практичне значення результатів дослідження. Визначено низку біологічно активних сполук, які виступають ефекторами тромбоцитів і

можуть розглядатися як допоміжні засоби за умов проведення антикоагулянтної терапії (метаболіти лігнанів, епігалокатехінгаллат, N-стеароїлетаноламін), є перспективним компонентом засобів зупинки локальних кровотеч (наночастки діоксиду силіцію), можуть бути потенційними носіями для терапевтичних сполук, що контактують з кров'ю (нанодіаманти та фулерени).

У роботі обґрунтовано, охарактеризовано та апробовано нові біоматеріали, які можуть бути основою для створення кровоспинних медичних виробів: кровоспинний засіб на основі ензимного активатора зсідання крові та активованого вуглецевого матеріалу, засіб, здатний до біодеградації, на основі колагену з посиленими прокоагулянтними властивостями, створено методику отримання аутологічного фібринового композиту для прискорення загоєння ран; запропоновано ефективний підхід для клітинної терапії суспензією аутологічних висококонцентрованих функціонально активних тромбоцитів, розроблено новий ефективний метод отримання активного тромбіну. Результати, представлені в дисертації, знайшли впровадження у виробництві (спосіб отримання колагену) та у біомедицині (спосіб отримання суспензії аутологічних тромбоцитів), що підтверджено відповідними актами про впровадження.

Структура дисертації. Дисертацію побудовано за загальноприйнятою схемою, вона містить перелік умовних позначень, вступ, 10 розділів (огляд літератури, матеріали і методи досліджень, 7 розділів результатів власних досліджень, їх аналіз та узагальнення), висновки, заключення та список використаних джерел.

У Вступі обґрунтовано актуальність проблеми дисертаційного дослідження, сформульовано мету, завдання, окреслено об'єкт, предмет та методи дослідження. Висвітлено наукову новизну, теоретичне та практичне значення роботи. Наведено дані про особистий внесок дисертанта, апробацію та впровадження результатів дослідження, структуру дисертації.

Огляд літератури містить аналіз вітчизняних та іноземних публікацій останніх років і дає уяву про сучасний стан проблеми. Огляд написано кваліфіковано, що свідчить про ґрунтовну підготовленість автора, його знаннях у питаннях біохімії гемостазу та біотехнології.

У розділі 2 «Матеріали та методи дослідження» наведено методи вирішення задач, а саме: методи білкової хімії, лабораторної діагностики, моделі *in vivo*, методи клітинної біології, інструментальні методи досліджень, які успішно було використано в роботі.

Результати та їхнє обговорення представлено у розділах **3-9,** в яких викладено найважливіші наукові та практичні результати, одержані дисертантом. Виклад матеріалу підпорядкований одній провідній ідеї, чітко визначеній автором.

У розділі 3 «Дія екзогенних та ендогенних ефекторів на тромбоцити» основним є узагальнена схема системи гемостазу, яка поєднує систему зсідання крові, що призводить до формування тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу, і тромбоцитарну ланку, активація якої призводить до

формування тромбоцитарного тромбу. Визначено дію сполук – інгібіторів (метаболіти лігнанів, епігалокатехінгаллат, N-стеароїлетаноламін) та активаторів (наночастки діоксиду силіцію) тромбоцитів. Показано, що відносно інертні нанодіаманти та фулерени можуть виступати потенційними носіями для терапевтичних сполук, що взаємодіють з кров'ю.

У **розділі 4** «Застосування висококонцентрованої аутологічної плазми крові в клінічних випробуваннях» представлено розроблений спосіб отримання висококонцентрованої суспензії тромбоцитів людини для біомедичного застосування і показано, що отримана у такий спосіб суспензія тромбоцитів є більш ефективною для клітинної терапії порівняно з суспензією тромбоцитів, отриманої одним з комерційно доступних способів.

У **розділі 5** «Розробка антитромботичного препарату калікс[4]арен С-145» наведено результати вивчення особливостей дії С-145 на полімеризацію фібрину, проведено дослідження С-145 *in vivo,* які виявили проангіогенний та антикоагулянтний ефект калікс[4]арену С-145.

У **розділі 6** «Створення та випробування кровоспинного засобу «Карбогемостат» представлено результати досліджень по створенню засобу для зупинки масивної судинної, паренхіматозної та капілярної кровотечі, який складається з двох функціональних компонентів: ензимного активатора зсідання крові у якості гемостатичного агента в необхідній кількості та вуглецевої сорбуючої пов'язки на основі активованих волокнистих вуглецевих матеріалів марки АУВМ, яка виконує функцію матриці для іммобілізації ензимного активатора. Створений композит має сорбційні та чітко виражені кровоспинні властивості. Його застосування може бути рекомендоване для зупинки масивних судинних кровотеч, кровотечі за хірургічних втручань, зокрема обширних планарних ран після ранньої ексцизії струпа у пацієнтів з опіками III-IV ступеню, та травмах у тому числі на фоні застосування антитромботичних препаратів та за умов гемофілії.

У **розділі 7** «Одержання аутологічного фібринового композиту» представлено розробку способу одержання фібринового гелю, який на відміну від синтетичних аналогів не ушкоджує поверхню тканин і розсмоктується за досить короткий час. Дослідження *in vivo* показали, що створений фібриновий композит стимулює репаративний остеогенез, знижує інтенсивність запалення. Фібриновий гель *a priori* має високу адгезію, призводить до герметизації поверхні рани.

У **розділі 8** «Створення гемостатичних губок на основі колагенової матриці і активатора зсідання крові» надано інформацію щодо колагенових губок як гемостатичних агентів, охарактеризовано зразки колагенів. На основі отриманих результатів створено та випробувано експериментальні зразки колагенової матриці *in vitro* та *in vivo.* Показано, що створена колагенова матриця, модифікована ензимним активатором зсідання крові, продемонструвала свою ефективність для зупинки кровотечі з печінки. Вона володіла виключною кровоспинною дією, яка не була властива комерційно доступному зразку колагену, та була здатна до біодеградації.

У **розділі 9** «Розробка умов отримання стабільного препарату тромбіну» представлено результати проведених досліджень, які дозволили розробити оптимальний спосіб отримання високоочищеного препарату тромбіну для використання в лабораторній і клінічній практиці. Проведено порівняльний кількісний та якісний аналіз кінцевого продукту – препарату тромбіну, отриманого з протромбіну різними методами. Розроблений спосіб активації протромбіну дозволяє отримувати тромбін високої активності, який не потребує проведення діалізу та додаткової очистки від активатора протромбіну, який було використано для отримання кінцевого продукту.

Висновки базуються на отриманих дисертантом результатах досліджень, цілком чіткі, конкретні.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та в авторефераті. Наукові результати, наявні в дисертації, висвітлено у 36 наукових працях, з них у провідних фахових наукових журналах України – 22, в міжнародних фахових виданнях – 12, в методичних рекомендаціях – 1, в 40 тезах доповідей на наукових конференціях, отримано 6 патентів України на корисну модель та винахід. Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації. Ступінь оприлюднення матеріалів дисертації є достатнім.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення. Суттєвих недоліків у дисертації та авторефераті не виявлено. Матеріал викладено логічно, грамотно, з дотриманням існуючих вимог щодо структури, змісту і технічного оформлення.

Під час офіційного захисту від автора хотілося б почути відповіді на такі запитання:

1. Чи будуть виявлені вами сполуки, інгібітори агрегації тромбоцитів, виявляти антитромботичний ефект *in vivo*?
2. В роботі використано низку наноматеріалів (діоксид силіцію (розмір частинок від 10 до 40 нм), фулерен С-60 (розмір частинок 0,7 нм) та нанодіаманти (розмір частинок 4 нм) для вивчення впливу на тромбоцити людини та на систему гемостазу. За якими принципами проводився вибір наноматеріалів?
3. Чи не може бути пов'язана дія калікс[4]арену С-145 на тромбоцити з пригніченням тромбоцитопоезу?
4. Яка перспектива застосування розроблених Вами гемостатичних засобів в медичних закладах?

Висновок. Дисертаційна робота Чернишенка В.О. «Пошук та вивчення механізмів дії нових біологічно активних сполук та біоматеріалів, що впливають на зсідання крові», яка представлена на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук вирішує актуальну науково-практичну задачу сучасної науки та медицини – пошук простих та ефективних засобів контролю стану системи гемостазу з метою лікування цілої низки найпоширеніших захворювань, пов'язаних з патологічним внутрішньосудинним тромбоутворенням, та порятунку пацієнтів у випадку кровотеч шляхом стимулювання екстрасудинного тромбоутворення.

За актуальністю, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням робота повністю відповідає вимогам постанови №567 КМ України від 24 липня 2013р. «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», що пред'являються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія, а її автор заслуговує присвоєння звання доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Завідувач відділу біомолекулярної електроніки
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України,
академік НАН України, доктор біол. наук, професор

Солдаткін Олексій Петрович

Підпис Солдаткін О.П.
посвідчується
Національна академія наук України
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
Ідентифікаційний код 05417101