

Рішення
разової спеціалізованої вченої ради
про присудження ступеня доктора філософії

Здобувач ступеня доктора філософії Валентин Дідківський, 1985 року народження, громадянин України, освіта вища: закінчив у 2009 році Київський національний університет імені Тараса Шевченка за спеціальністю «Біохімія», працює молодшим науковим співробітником в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, виконав акредитовану освітньо-наукову програму «Біологія та біохімія».

Разова спеціалізована вчена рада, утворена наказом Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, від «24» липня 2024 року № 22-а, у складі:

Голови разової
спеціалізованої вченої ради –

Юрія Даниловича, д.б.н., с.н.с., провідного наукового співробітника відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;

Рецензентів –

Артема Тихомирова, д.б.н., с.н.с., завідувача відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;

Ольги Матишевської, д.б.н., проф., провідного наукового співробітника відділу науково-інформаційних та інноваційних досліджень Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;

Офіційних опонентів -

Тетяни Галенової, к.б.н., старшого дослідника, асистента кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка;

Тетяни Карацуби, к.б.н., завідувачки лабораторії онкофармакології відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

на засіданні «11» вересня 2024 року прийняла рішення про присудження ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія Валентину Дідківському на підставі публічного захисту дисертації «Дослідження сполук калікс[4]аренового ряду як антитромботичних та проангіогенних агентів» за спеціальністю 091 Біологія та біохімія.

Дисертацію виконано в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ.

Науковий керівник Володимир Чернишенко, д.б.н., старший дослідник, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, завідувач відділу структури і функції білка.

Дисертацію подано у вигляді спеціально підготовленого рукопису українською мовою, який за змістом, рівнем наукової новизни, теоретичним й практичним значенням результатів, кількістю наукових публікацій відповідає вимогам пункту 6 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 року № 44 (зі змінами) та вимогам до оформлення дисертацій, затвердженим наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 (зі змінами).

Дисертація Валентина Дідківського є самостійною та ґрунтовною науковою працею, що виконана з дотриманням вимог академічної доброчесності, отримані результати якої мають важливе теоретичне та практичне значення для галузі знань Біологія. Дисертаційна робота Валентина Дідківського 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*. Наукова новизна полягає у тому, що вперше доведено ефективність калікс[4]арену С-145 як прямого інгібітора полімеризації фібрину *in vivo* для зниження прокоагулянтного потенціалу зсідання крові.

Здобувач має 11 наукових публікацій за темою дисертації, з них 4 статті у наукових виданнях, включених на дату опублікування до переліку наукових фахових видань, 2 з яких у періодичному науковому виданні проіндексованому у базі Scopus та віднесені до четвертого квартеля (Q4) відповідно до SCImago Journal and Country Rank та 6 доповідей та тез на наукових конференціях:

1. Chernyshenko V., Savchuk O., Cherenok S., Silenko O., Negelia A., Kasatkina L., Pirogova L., Didkivskyi V., Yusova O., Kalchenko V., Garmanchuk L., Grinenko T., Lugovskoy E., Komisarenko S. Haemostasis modulation by calix[4]arene methylenebisphosphonic acid C-145 and its sulfur-containing analogue. *Ukr. Biochem. J.* 2018. 90(6): 21-30. DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj90.06.021>
2. Tkachenko O., Hudz Ie., Kosiakova H., Klymenko P., Stohnii Y., Didkivskyi V., Chernyshenko T.M., Platonova T.M. Protective action of N-stearoylethanolamine on blood coagulation and arterial changes in spontaneously hypertensive rats fed cholesterol-rich diet. *Ukr. Biochem. J.* 2020. 92(2): 60-70. DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj92.02.060>
3. Didkivskyi V., Pavlenko A. Approbation of calix[4]arene C-145 as antithrombotic agent in vivo. *Biotechnologia acta.* 2022. 15(5): 41-46. DOI: <https://doi.org/10.15407/biotech15.05.041>
4. Didkivskyi V.A., Pavlenko A.O., Marunych R. Y., Selikhova A.O., Cherenok S. O., Todosiuk T.P., Shevchenko S.M. HPLC detection of antithrombotic calix[4]arene in blood plasma of animals. *Biotechnologia Acta.* 2022. 15(2): 51-52. DOI: <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.051>

У дискусії взяли участь голова, рецензенти, офіційні опоненти, інші присутні і висловили зауваження:

1. Юрій Данилович, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, без зауважень.

2. Артем Тихомиров, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу хімії та біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, надав позитивну рецензію із зауваженнями:

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 культурі ендотеліоцитів PAE (porcine aortic endothelial cells) дуже важко розрізнити капілярноподібні 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 ендотелійних 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 С-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 С-145 видається більш інформативним визначення рівня С-реактивного протеїну, прозапальних цитокінів, оцінка інфільтрації тканини макрофагами (CD68⁺-клітини).

5. Текст дисертаційної роботи потребує редагування: виправлення граматичних та друкарських помилок, тавтологій, неокочирних 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 С-145S?

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

3. Ольга Матишевська, доктор біологічних наук, професор, провідний науковий співробітник відділу науково-інформаційних та інноваційних досліджень Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, надала позитивну рецензію із зауваженнями:

1. Щодо мети та завдань.

Роботу присвячено С-145. Це виглядає цілком обґрунтованим, якщо врахувати попередньо отримані у відділі структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна дані про встановлену пригнічувальну дію калікс[4]арена С-145 на полімеризацію фібрину (Lugovskoi, 2013). Тому було б логічним поставити за мету більш поглиблено і всебічно охарактеризувати ефекти саме С-145 (на агрегацію тромбоцитів, гідроліз фібринового згустку, проліферацію ендотеліоцитів, і т.д., і особливо *in vivo* за патологічних станів), щоб довести можливість його застосування на практиці як лікарського антитромботичного препарату.

У зв'язку з цим більш виправданою видається така назва роботи: КАЛІКС[4]АРЕН С-145 ЯК АНТИТРОМБОТИЧНИЙ ТА ПРОАНГІОГЕННИЙ АГЕНТ.

2. Огляд літератури.

А. Розділ 1.1. «Характеристика факторів системи зсідання крові» – найдовший і загальновідомий, але безпосередньо не стосується мети роботи. А от розділ з короткою характеристикою, що ж відбувається з системою гемостазу за патологій, які використано як модельні у роботі, відсутній, а був би дуже корисним.

Б. Розділ 1.5.2. «Функції калікс[4]аренів» - це штучно синтезовані сполуки, їм не притаманні функції, вони лише можуть якимось чином впливати на певні біологічні процеси, тобто проявляти біологічну активність. Цей аспект у розділі описано недостатньо.

3. Результати.

А. Розділ 3. Якщо раніше вже було доведено високу ефективність С-145 як інгібітора полімеризації фібрину, то навіщо проводити скринінг подібних до нього сполук і знову повернутись до того ж С-145? Якщо вже такий скринінг інших каліксаренів робити, то слід пояснити необхідність цього – можливо, були сподівання посилити ефект С-145 якимось змінами у структурі. Тоді треба проаналізувати, чим саме ці сполуки відрізнялись, що таке є в структурі С-145, що робить його ефективнішим за подібні до нього сполуки?

Б. Чому обраний для досліджень *in vitro* діапазон концентрацій С-145 (0.6 – 30мМ) відрізняються на порядки від IC_{50} встановленої у роботі Луговського ($2,5 \times 10^{-6}$).

В. Чому С-145 став лікарською антитромботичною субстанцією вже у розділі 5? Чи не зарано, можливо, такий термін варто ввести після повного набору даних, які підтверджують його потенціал.

Д. Вважаю за важливі та такі, що потребують окремого висновка результати побудови калібрувального графіка залежності часу зсідання плазми крові від кількості калікс[4]арену С-145 (Рис. 6.6). Це дійсно надає змогу кількісно визначати вміст калікс[4]арену С-145 в плазмі крові тварин за антиполімеризаційним ефектом.

У зв'язку з цим виникає питання: після введення тваринам С-145 чи досягає його вміст у крові того діапазону концентрацій, за якого виявлено інгібування полімеризації фібрину *in vitro* - (0.6 – 30мМ)?

4. Заключення. Очевидно, що біохімічні механізми дії С-145 залишаються неповністю з'ясованими і навряд чи все зводиться лише до пригнічення полімеризації фібрину. Який механізм дії на ендотеліоцити? Як пояснити пригнічення агрегації тромбоцитів, зниження їх кількості,

покращення стану судинної стінки та показників запалення? Ці дані йдуть на користь основного висновка щодо перспективності терапевтичного застосування результатів дисертаційної роботи, проте викликають питання з біохімічної точки зору.

4. Тетяна Галенова, кандидат біологічних наук, старший дослідник, асистент кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, надала позитивний відгук із зауваженнями:

Зауваження до розділу 2:

1. Нажаль, не всі застосовані дисертантом методи повною мірою відображені у даному розділі. Ряд методів – відсутні, тоді як деякі з представлених – не повною мірою висвітлюють умови та методологію виконання. Не наведена також інформація, щодо кількості тварин залучених до кожного конкретного експерименту.

2. У підрозділі 2.5.4 «Статистична обробка даних», автор не розкрив деталей щодо алгоритму проведення статистичного аналізу, не конкретизував методи, які були використані для перевірки нормальності розподілу, порівняння одержаних результатів та встановлення значущих різниць між дослідними групами.

Зауваження до розділу 3:

1. Рис 3.1 варто було б доповнити структурними формулами калікс[4]аренів C-145 та C-145S.

2. При наведенні результатів не слід було включати до табл. 3.1 зміни часу зсідання плазми відносно контролю (у %), достатньо було лише навести діапазон абсолютних величин (у секундах).

Зауваження до розділу 4:

1. Бажано було б детальніше описати постановку контролів для виконаних експериментів, результати яких наведено на рисунках 4.1, 4.2 і 4.3. Варто було навести контрольні величини на графіках або ж вказати інформацію щодо них у підписах до рисунків. На рис. 4.1-4.3 координати не приведено до одноманітності. У підписах слід було б навести інформацію про кількість повторів експериментів (n) та спосіб вираження даних ($m \pm SEM$ чи $m \pm SD$).

2. Результати щодо впливу калікс[4]аренів C-145 та C-145S на ступінь агрегації тромбоцитів не слід трактувати як «інгібуючий ефект». Можливо, є певна тенденція до зниження показника ступеня агрегації. Але для перевірки цієї гіпотези варто було розширити діапазон досліджуваних концентрацій. Тут також слід підкреслити, що концентрації сполук C-145 та C-145S, які ефективно інгібували полімеризацію фібрину, практично не впливали на ступінь агрегації тромбоцитів.

Питання до розділу 4:

1. Які фізико-хімічні чи структурні характеристики калікс[4]аренів С-145 та С-145S можуть обумовлювати позитивний вплив на проліферацію ендотеліальних клітин свині лінії PAE?

Зауваження до розділу 5:

1. У таблиці 5.1 варто було навести дані для контрольної групи тварин.
2. У підписах до рисунків 5.1, 5.2 та 5.3 слід було б навести інформацію про кількість повторів у експериментах (n) та спосіб вираження даних ($m \pm SEM$ чи $m \pm SD$).

3. У тексті роботи варто було більш детально описати можливі механізми впливу досліджуваної сполуки на кількість тромбоцитів та ступінь їх агрегації на тлі перорального введення калікс[4]арену С-145.

Питання до розділу 5:

1. Автор у тексті використовує терміни «лікарська субстанція «Антитромботичний засіб калікс[4]арен С-145» та «препарат калікс[4]арен С-145», які насправді мають чітке визначення в фармацевтичній сфері. Чи є доцільним та обґрунтованим використання даних термінів у контексті конкретної сполуки?

2. Чи достатньо двох тварин на групу для виконання протоколу OECD 425 (OECD Guideline for Testing of Chemicals «Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure») та одержання достовірних висновків?

3. Оскільки експериментальна доза (12 мг/кг) калікс[4]арену С-145 обиралася на основі попередніх результатів вивчення токсичності даної сполуки на щурах, чи можна стверджувати, що дана доза є універсальною для виконання інших експериментів із залученням інших видів лабораторних тварин? Зокрема у роботі були також використані миші та кролі.

Питання до розділу 6:

1. Чим обумовлена різниця показників контролю та дослідних тварин на момент введення калікс[4]арену С-145 (точка «0»), наведених на рисунках 6.1 та 6.2.

2. Калібрувальний графік залежності часу зсідання плазми від концентрації С-145 в пробі у експерименті *in vitro* будували використовуючи плазму донорів, чи коректно використовувати одержану криву для оцінки концентрації у експериментах *in vivo* виконаних на лабораторних тваринах.

3. Чи існують на сьогоднішній день кількісні методи оцінки вмісту каліксаренів в зразках, зокрема біологічних рідинах?

4. Що відомо автору про метаболізм каліксаренів в організмі? Цікавлять механізм транспортування на рівні ентероцитів ШКТ (оскільки автор використовував пероральний спосіб введення препарату), місця

депонування (якщо такі є) та шлях виведення.

Зауваження до розділу 7:

1. Для більш глибокого розуміння природи та механізмів показаних для босліджуваної сполуки ефектів слід було включити у схему експериментів *in vivo* ще одну контрольну групу, а саме групу спонтанно гіпертензивних щурів, яким вводили калікс[4]арен С-145.

2. Для легшого сприйняття матеріалу автору варто було уніфікувати загальний вигляд графіків та підписи до них, навести інформацію щодо статистичного аналізу, кількості тварин в кожній дослідній групі та способу вираження даних.

3. При наведенні результатів гістологічного дослідження (рисунки 7.20-7.24), хотілося б щоб автор вказав, наприклад, за допомогою стрілочок різного кольору, на ті цито- та гістологічні особливості, які були виявлені при аналізі зразків, а не лише перераховані.

Питання до розділу 7:

1. Який метод автор використовував для оцінки рівня протеїну С в плазмі крові (рис. 7.5)? Мова йде про концентрацію чи потенційну активність?

2. Як, на думку автора, можна пояснити позитивний вплив калікс[4]арену С-145 на стан судин, зокрема стінку аорти.

3. Оскільки автор у своєму дослідженні використовує хронічний експеримент (калікс[4]арен С-145 вводили лабораторним тваринам протягом 2 місяців), хотілося б почути, що відомо (можливо, з літератури) про токсичність каліксаренів за умов довготривалого введення.

Зауваження до розділу 8:

1. На мою думку для остаточних висновків щодо ефектів калікс[4]арену С-145 на серцевий м'яз самої кардіограми та гістологічного аналізу тканин серцевого м'язу – не достатньо. Для повноти картини не вистачає результатів біохімічного аналізу крові, дослідження специфічних маркерів (зокрема тропоніну), оцінки вміст фіброзної тканини, досліджень апоптозу та некрозу кардіоміоцитів. Одержані результати безумовно є цікавими і становлять практичну цінність. Однак їх слід розглядати як попередні, такі які можуть слугувати підґрунтям для визначення вектору майбутніх досліджень.

2. Аналогічне зауваження до способу наведення результатів гістологічного дослідження (рисунки 8.5-8.6). На мою думку, візуалізація конкретних цито- та гістологічних змін за допомогою графічних маркерів, безумовно, сприяла б кращому сприйняттю одержаних даних.

5. Тетяна Карацуба, кандидат біологічних наук, завідувачка лабораторії онкофармакології відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та

токсикології НАМН України», надала позитивний відгук із зауваженнями:

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, ПГХ на колаген I та II типів, та більш специфічні маркери, властиві запаленню ендотелію (Ahg II, RAGE, IL-6) або його пошкодженню (Cas-3, Vcl-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.

6. Інші присутні, всі підтримали, без зауважень.

Результати відкритого голосування:

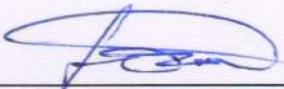
«За» 5 членів ради,

«Проти» немає членів ради.

На підставі результатів відкритого голосування разова спеціалізована вчена рада присуджує Валентину Дідківському ступінь доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія та біохімія

Відеозапис трансляції захисту дисертації додається.

Голова разової
спеціалізованої вченої ради


(підпис)

Юрій ДАНИЛОВИЧ

