

## **ВІДГУК**

офіційного опонента на дисертаційну роботу  
**КОРОЛЬОВОЇ Дар'ї Сергіївни** «Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.04 – біохімія та 03.00.20 – біотехнологія

**Актуальність теми дисертації.** Дисертаційну роботу Дар'ї Корольової присвячено дослідженню механізмів регуляції активності ключового ензиму системи гемостазу – тромбіну. Дисертація охоплює не лише фундаментальні аспекти біохімії зсідання крові, але й спрямована на біотехнологічного розроблення нових медичних виробів, що значно розширює прикладний потенціал роботи.

Порушення роботи системи гемостазу призводить до появи в кровотоці активного тромбіну, що може викликати внутрішньосудинне тромбоутворення. Натомість, саме екстрасудинна генерація тромбіну є необхідною для швидкої та ефективною зупинки кровотеч. Тому, авторка у своєму дослідженні зосереджується на пошуку способів регуляції активності тромбіну (для попередження тромбозів та припинення кровотеч) та на вивченні шляхів його детекції для своєчасної діагностики загрози тромбозів.

Створення нових ефективних кровоспинних виробів є вкрай актуальним особливо для України, оскільки в умовах ведення бойових дій значні втрати серед військових та цивільного населення спричинені саме масованими кровотечами. В той же час, смертність від тромботичних ускладнень продовжує посідати перше місце серед причин природної смертності в світі та зростає в Україні через несвоєчасну діагностику та неефективну медичну допомогу на тлі війни. Тож легкі у виконанні методи ранньої діагностики загрози тромбоутворення є вкрай актуальними.

Крім того, дисертаційну роботу присвячено фундаментальним аспектам регулювання активності тромбіну за патологічних станів. Отримані результати є важливими для розуміння механізмів внутрішньосудинного тромбоутворення та сприяють коректному формулюванню завдань з метою його регуляції.

Таким чином, робота Дар'ї Корольової є актуальною і представляє не лише біохімічні аспекти регуляції системи гемостазу, але й біотехнологічні підходи для вирішення проблем, пов'язаних з порушенням роботи цієї системи.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Важливість та актуальність дисертаційної роботи підтверджується її тісним зв'язком з тематикою робіт Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Дослідження виконувались в рамках вісімнадцяти фундаментальних та прикладних проєктів: № 0112U002624 «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій», розділ: «Моделювання системних біологічних

процесів та розробка молекулярно-динамічних схем регуляції метаболічних шляхів та міжмолекулярних взаємодій», підрозділ: «Протеом системи гемостазу у перебігу опосередкованих процесів утворення та елімінації згустку» (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); № 0115U005241 «Створення комбінованого перев'язувального засобу для зупинки кровотеч та прискорення загоювання ран» (2015-2016); № 0117U002808 «Впровадження у виробництво гемостатичних губок на основі колагенової матриці та активатора зсідання крові» (2017); № 0117U000453 «Розробка новітніх інгібіторів зсідання крові на основі фармакологічних агентів, що інгібують ензиматичну активність тромбіну та фактору Ха» (2017), № 0118U000453 «Розробка новітніх інгібіторів зсідання крові на основі фармакологічних агентів, що інгібують ензиматичну активність тромбіну та фактору Ха» (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», розділ «Дослідження системних біологічних процесів за різних патологічних станів, як основа персоніфікованої та регенеративної медицини», підрозділ «Протеїн-протеїнові та протеїн-клітинні взаємодії в системі гемостазу за норми та патології: механізми. Діагностика та корекція порушень» (2017-2021); 0118U002373 «Розроблення тест-системи для одночасного визначення трьох молекулярних маркерів внутрішньосудинного тромбоутворення» (2018-2019); № 0119U000661 «Клінічна апробація та впровадження методу концентрування тромбоцитів аутологічної плазми крові для клітинної терапії» (2019); №0119U001795 «Підготовка та проведення клінічних випробувань композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» (2019); №0122U002158 «Розробка, доклінічні та клінічні випробування аутологічного фібринового гелю для застосування у хірургії» (2022); № 0119U002512 «Взаємодії компонентів системи гемостазу на клітинному та молекулярному рівні в процесі формування та елімінації тромбу» (2019-2023); №0123U102770 «Вплив природної і штучної імунізації антигенами SARS-CoV-2 на стан системи гемостазу» (2023-2024); № 0120U103183 «Створення бібліотеки моноклональних антитіл до альфаС-регіону фібриногену з метою вивчення його ролі в полімеризації фібрину та для розробки імунодіагностиків» (2020-2024); ALLEA grant EFDS-FL2-02 provided to the Institution within the framework of Funding Line 2 of the «European Fund for Displaced Scientists» (EFDS), 2022-2023; № 0123U103409 «Створення тест-системи для кількісного визначення протеїну С з метою діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення» (2023-2025); № 0124U000251 «Дослідження та пошук способів регуляції молекулярних

механізмів внутрішньосудинного та екстрасудинного тромбоутворення» (2024-2028).

**Рівень виконання поставленого наукового завдання та оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності.** Метою дисертації є пошук шляхів регулювання ензиматичної активності тромбіну та виявлення результатів його внутрішньосудинної появи. Для досягнення цієї мети та виконання поставлених завдань в дисертації застосовано різноманітні методи, а саме: хроматографічні та електрофоретичні методи, агрегатометрію, спектрофотометрію, цитометрію, імуноензимний аналіз, низку тестів для характеристики стану системи гемостазу (коагуляційні тести, визначення активності окремих факторів зсідання крові, визначення концентрації розчинного фібрину, D-димеру та фібриногену, тощо), турбідиметрію, цитологічні та гістологічні методи, ПЛР-аналіз, методи комп'ютерного моделювання (молекулярний докінг, молекулярна динаміка), статистичні та математичні методи аналізу. Дослідження *in vitro* підтверджені з використанням моделей на тваринах та на плазмі крові пацієнтів.

**Оцінка змісту дисертаційної роботи та її завершеності.** Дисертація є самостійним науковим дослідженням, в якій відображені власні ідеї та напрацювання авторки, що дало змогу вирішити поставлені у роботі завдання. Дисертаційна робота містить результати власних досліджень, положення і висновки, які логічно випливають із результатів експериментів та які дисертантка сформулювала особисто.

**Структура та характеристика роботи.** Дисертація викладена в двох томах. Перший том включає основну частину об'ємом 313 сторінок комп'ютерного тексту, яка має традиційну структуру і складається з анотацій (українською та англійською мовами), вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, яка складається з п'яти розділів власних досліджень, заключення та висновків. Містить посилання на джерела літератури (203 найменування). Робота ілюстрована 32 таблицями і 109 рисунками. В другому томі (299 сторінок) подано Додатки А – О, зокрема власні роботи авторки (50 джерел).

**У вступі** розкрито суть і стан наукової проблеми, логічно обґрунтовано її актуальність, охарактеризовано зв'язок роботи з науковими програмами і проектами, сформульовано основну мету та задачі дослідження, окреслено об'єкт, предмет та методи дослідження, розкрито наукову новизну отриманих результатів та акцентовано увагу на їхнє практичне значення. Також ретельно висвітлено особистий внесок докторантки у проведенні досліджень, наведено інформацію щодо апробації результатів роботи та опублікованих праць, у яких відображено основний зміст роботи. Вступ до роботи завершується стислою інформацією щодо її структури і обсягу.

**Перший розділ** присвячений огляду літератури, в якому представлено узагальнення ролі тромбіну в системі гемостазу та розглянуто особливості регуляції ензиматичної активності тромбіну. Огляд включає роботи,

опубліковані за останні 10-15 років, з них більшість англомовних. Матеріал викладено кваліфіковано, проілюстровано двома авторськими схемами, що узагальнюють дані літератури.

**Другий розділ** присвячено опису методів, методологічних підходів, які було використано у дисертаційній роботі. В розділі окремі підпункти присвячено опису моделей на тваринах та опису пацієнтів, які були залучені до клінічних досліджень. Всі застосовані методи підібрано раціонально, їх підпорядковано загальній меті та завданням дослідження, вони є інформативними та сучасними. Розділ написаний чітко та логічно.

Наступні 5 розділів висвітлюють одержані авторкою результати.

У **розділі 3** «Розробка нових способів інгібування активності тромбіну з метою створення антитромботичних препаратів» *in silico* було запропоновано низку сполук – потенційних інгібіторів тромбіну. Скринінг запропонованих низькомолекулярних інгібіторів тромбіну *in vitro* дав змогу обрати специфічні та селективні інгібітори, які виявились ефективними *in vivo*.

У основу **розділу 4** «Застосування активаторів протромбіну у медицині» покладена ідея створення специфічних гемостатичних засобів на основі екзогенного активатора протромбіну, а також використання його для одержання фібринового гелю. Показано, що модифікація біоматеріалів екзогенним активатором протромбіну надає їм кровоспинних властивостей. Найбільш перспективними біоматеріалами для подальшої розробки кровоспинних засобів виявились колаген та карбоновий матеріал. Гемостатик на основі модифікованого карбонового матеріалу та комплект для одержання фібринового гелю пройшли клінічні дослідження, які засвідчили їх безпечність та ефективність.

**Розділ 5** «Виявлення патологічної внутрішньосудинної генерації тромбіну» присвячено розробці тестів для кількісного визначення маркерів появи тромбіну в кровотоці – претромбіну-1 та протеїну С в плазмі крові. Крім того, в розділі також удосконалено імуноензимний метод кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові. Робота, представлена в розділі, проведена в тісній співпраці з медиками. Методи кількісного визначення претромбіну-1 та розчинного фібрину в плазмі крові впроваджено в лабораторну практику.

У **розділі 6** «Визначення ознак внутрішньосудинної генерації тромбіну за моделювання патологічних станів у тварин» продемонстровано інформативність запропонованих методів виявлення активного тромбіну в плазмі крові на модельних системах у тварин. Зокрема досліджено моделі LPS-індукованого запалення на мишах, променевої хвороби на щурах та інсулінорезистентності на щурах. Суттєвим для підтвердження інформативності запропонованих тестів є кореляція анамнезу (вік, відновлювальна терапія) із ступенем вираженості маркерів появи тромбіну в кровотоці.

У розділі 7 «Раціональна молекулярна діагностика патологічних станів, пов'язаних з внутрішньосудинною генерацією тромбіну» підтверджено інформативність розроблених попередньо тестів лабораторної діагностики ризику тромбозу. В розділі простежується зв'язок ступеня порушення роботи системи гемостазу з клінічними параметрами. Результати, описані в цьому розділі, з одного боку, лягли в основу методичних рекомендацій щодо клінічної діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення, а з іншого – дозволили сформулювати парадигму перемикання активності тромбіну за патологічних станів.

В **заключенні** обговорено і систематизовано великий обсяг отриманої теоретичної інформації, наведеної у огляді літератури, а також власних напрацювань авторки. Систематизовано отримані результати. Розділ побудовано логічно та послідовно, він містить обговорення отриманих авторкою результатів.

У 10 наведених **висновках**, які базуються на отриманому фактичному матеріалі роботи і є теоретичним і практичним узагальненням проведених досліджень, представлено найважливіші результати у повній відповідності до головної мети та завдань дослідження.

**Наукова новизна роботи.** Оцінюючи найважливіші здобутки дисертаційного дослідження, варто вказати на наступні результати, що мають вагому наукову новизну.

У роботі вперше запропоновано сфокусуватись на регуляції активності одного ензиму для вирішення різноспрямованих завдань: профілактики та прогнозування тромбофілії, а також зупинки кровотеч.

У дисертаційній роботі запропоновані принципово нові гемостатичні медичні вироби, принцип роботи яких засновано на безпосередній активації протромбіну до тромбіну. На основі аналізу стану системи гемостазу та клінічного стану пацієнтів, авторкою запропоновано нову парадигму динамічного перерозподілу тромбінової активності в умовах тромбофілії. У межах цієї парадигми, тромбін виявляє пріоритетність до фібриногену, протромбіну або протеїну С, залежно від клінічних параметрів: ендотеліального статусу та концентрації субстратів. Такий механізм дозволяє пояснити характерні зміни гемостатичного балансу при широкому спектрі патологій, зокрема COVID-19, ускладненій вагітності, операціях з приводу ендопротезування кульшового суглобу, системному червоному вовчаку, ішемічній хворобі серця, тощо. Водночас дисертантка обґрунтовує необхідність комплексного підходу до оцінки стану системи гемостазу, наголошуючи, що жоден окремих маркер появи тромбіну в кровотоці не є достатнім для достовірної діагностики ризику тромбофілії.

За матеріалами дисертації отримано 10 патентів на винахід та корисну модель, що також підтверджує новизну роботи.

**Практичне значення отриманих результатів.** Всі результати дисертаційної роботи мають практичне спрямування. В дисертації запропоновані низькомолекулярні прямі інгібітори тромбіну, як основа для

розробки антитромботичних препаратів. Біохімічні підходи авторка також використовує для обґрунтування та розробки специфічних кровоспинних матеріалів та комплекту для одержання фібринового гелю. Слід зазначити, що запропоновані медичні вироби не лише протестовані з використанням моделей на тваринах, але й пройшли успішні клінічні дослідження, впроваджені в хірургічну практику та ветеринарію.

Крім того, в роботі розроблено методи виявлення маркерів появи тромбіну в кровотоці та удосконалено існуючий метод виявлення розчинного фібрину. Інформативність всіх запропонованих маркерів підтверджено на плазмі крові пацієнтів, а два методи впроваджено в клінічну лабораторну практику. Результати комплексного аналізу стану системи гемостазу пацієнтів дали змогу сформулювати методичні рекомендації щодо діагностики протромботичних станів.

Зважаючи на впровадження результатів дисертаційної роботи, можна говорити про велике практичне значення отриманих результатів.

**Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій.** Основні наукові положення викладено переконливо і логічно, висновки та рекомендації ґрунтуються на результатах власних досліджень. Методологія відповідає поставленим завданням. Результати дисертаційної роботи є достатньо обґрунтованими, що підтверджується коректністю прийнятих припущень, використанням непараметричних статистичних методів та відтворюваності результатів у ланцюжку *in vitro* -> *in vivo* -> *in praxi clinica*. Достовірність низки висновків підтверджується впровадженням результатів роботи у практику.

**Повнота викладу результатів в опублікованих працях.** За результатами досліджень опубліковано 50 наукових праць, у тому числі 25 статей у наукових фахових виданнях (16 статей, включених у міжнародні наукометричні бази даних Scopus та/або Web of Science Core Collection, Q1 – 3 статті, Q2 – 3, Q3 – 3, Q4 – 7), 2 методичних рекомендації, 13 тез доповідей в збірниках матеріалів конференцій, 8 статей у інших періодичних виданнях, 10 патентів на винаходи та корисні моделі, які в достатній мірі висвітлюють результати роботи, що виносяться на захист.

**Відсутність (наявність) порушення академічної доброчесності.** Аналіз дисертації не виявив ознак порушення академічної доброчесності, фабрикації, фальсифікації, текстових запозичень чи інших порушень академічної доброчесності. Авторка чітко дотримується вимог щодо посилань на джерела, забезпечує повну прозорість методик, а висновки спираються виключно на власні результати.

**Відповідність змісту реферату основним положенням дисертації.** Реферат в повній мірі відображає зміст та положення дисертації.

**Дискусійні положення та зауваження до змісту дисертаційної роботи**

Водночас, при аналізі дисертаційної роботи виникли деякі зауваження, викладені нижче:

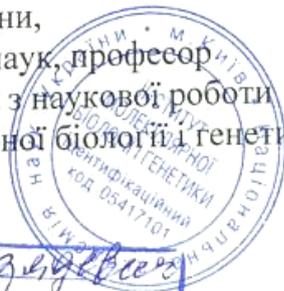
1. Огляд літератури міг би бути більш розгорнутим та глибшим у контексті сучасної доказової бази.
2. Відсутні дані статистичної обробки на рисунках 3.2, 3.3, 3.6, 3.10, 4.11, 4.12, 4.23, 4.36, 5.18, 5.19, 5.23.
3. У експериментах на тваринах у моделі запалення не визначено біохімічні маркери запального процесу.
4. Припущення щодо ролі ендотелію у зміні активності тромбіну було б доцільно підкріпити експериментами на культурі ендотеліальних клітин.
5. В тексті зустрічаються редакторські похибки.

Перераховані зауваження не мають принципового характеру і не змінюють загальної позитивної оцінки дисертаційної роботи, не зменшують наукової значущості й практичної цінності результатів дисертаційної роботи. Вважаю, що здобувачка **Корольова Дар'я Сергіївна** зробила цінний особистий внесок у науковий напрям, пов'язаний із дослідженням механізмів регуляції активності тромбіну в нормі та за патологічних станів.

#### **Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

За актуальністю дослідження, повнотою охоплення наукової проблеми, обсягом та рівнем виконаних досліджень, достовірністю та ступенем обґрунтованості наукових положень і висновків, новизною та практичним значенням, повнотою викладення у наукових публікаціях, відсутністю порушень принципів академічної доброчесності дисертаційна робота Корольової Дар'ї Сергіївни на тему «Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів» є завершеною науковою працею, повністю відповідає вимогам, що ставляться до докторських дисертацій, зокрема пунктам 7, 8, 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №1197 від 17.11.2021 р., а її авторка **Корольова Дар'я Сергіївна** заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.04 – біохімія та 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,  
академік НАН України,  
доктор біологічних наук, професор  
заступник директора з наукової роботи  
Інституту молекулярної біології та генетики  
НАН України



Сергій ДЗЯДЕВИЧ

Підпис Сергій Дзядевич  
посвідчується  
Зав.науч. М. Мейсєва