

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу Корольової Дар'ї Сергіївни
«Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів»,
подану на здобуття наукового ступеня доктора біологічних
наук за спеціальностями 03.00.04 – біохімія та 03.00.20 - біотехнологія

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження

Актуальність проблеми, якій присвячена дисертація не викликає сумніву. Час виконання дисертаційної роботи Корольовою Д.С. припав на тяжкі виклики для нашої країни: початок бойових дій на Сході України, коронавірусну пандемію, повномасштабне вторгнення росії. Попри побутуюче уявлення про відірваність фундаментальної науки від життя, у цій роботі всі згадані події знайшли віддзеркалення. Авторка не лише досліджує стан системи зсідання крові у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, але і пропонує нові ефективні засоби своєчасної діагностики загрози тромбозу. Не тільки вивчає механізми формування фібринового згустку, але і розробляє кровоспинні матеріали, які в майбутньому зможуть допомогти рятувати життя та здоров'я наших військовослужбовців.

Як відомо, тромбози та тромбоемболії стали причиною високої смертності у пацієнтів з COVID-19. І авторка зосереджується на пролонгованості ризику тромбозів у пацієнтів, що перехворіли на коронавірусну інфекцію та методах діагностування цих ризиків.

Крововтрати при мінно-вибухових пораненнях є домінуючою причиною смертності в результаті бойових дій. Саме запропоновані в роботі ефективні кровоспинні засоби є одним із способів вирішення цієї проблеми.

Тож вважаю, що робота є актуальною і відповідає викликам сьогодення.

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

Дисертаційну роботу виконано на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках вісімнадцяти фундаментальних та прикладних проектів, один з яких є міжнародним, а два - спрямовані на підтримку обороноздатності в межах базового фінансування НАН України. Це вкотре підкреслює важливість та актуальність роботи.

Рівень виконання поставленого наукового завдання та оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності. Дисертація присвячена пошуку шляхів регулювання ензиматичної активності тромбіну та виявлення результатів його внутрішньосудинної появи. Для 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, використано низку моделей на тваринах та проведено аналіз стану системи гемостазу пацієнтів.

Використані в роботі методи є адекватними та цілком відповідають поставленим задачам.

Оцінка змісту дисертаційної роботи та її завершеності. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням, містить результати власних досліджень, положення і висновки, які логічно випливають із результатів експериментів та які дисертантка сформулювала особисто.

У вступі висвітлено актуальність теми дисертації та обґрунтовано вибір об'єкта дослідження, сформульовано мету і задачі дослідження, наукову

новизну і практичне значення роботи, наведено дані про особистий внесок автора, апробацію результатів роботи і публікації.

Мета дослідження сформульована чітко та звучить як пошук шляхів регулювання ензиматичної активності тромбіну та виявлення результатів його внутрішньосудинної появи.

Дев'ять завдань дослідження відповідають поставленій меті, розділам дисертації та результатам дослідження. Завдання в роботі досягнуті та відповідають висновкам за кожним розділом.

Об'єкт і предмет дослідження розкривають поставлену мету.

В науковій новизні отриманих результатів прослідковується рівень доповнення, який вносить нові елементи у відомі теоретичні та практичні положення та рівень конкретизації об'єктів та систем.

Особистий внесок дисертанта також незаперечний.

Апробація результатів дослідження - достатня.

Коротка характеристика окремих розділів роботи. Рукопис має класичну структуру, яка відповідає вимогам ДАК України. Розділи власних досліджень викладені в чіткій послідовності до поставленої мети та завдань дослідження. Представлені наукові положення та висновки дисертації аргументовані та підтверджені достатніми за обсягом фактичними матеріалами.

Перший розділ є оглядом літератури, що зосереджено на властивостях тромбіну, як регуляторного ензиму системи гемостазу. Матеріал викладено послідовно, лаконічно та логічно, основні тези проілюстровано схемами.

Методи, моделі на тваринах та когорти пацієнтів описано в другому **розділі**. Для препаратів протеїнів, які отримувались авторкою особисто, наведено протоколи очистки та електрофоретичну характеристику препаратів. Розділ написано докладно, а у випадку пацієнтів, які брали участь в клінічних дослідженнях, наведено критерії включення/виключення відповідно ДСТУ EN ISO 14155:2015 «Клінічні дослідження медичних виробів для людей. Належна

Розділі 7 є логічним продовженням двох попередніх розділів, оскільки спрямований на аналіз стану системи гемостазу за маркерами появи тромбіну в кровотоці за низки патологій асоційованих із запальним процесом та порушенням роботи гемостазу. В цьому розділі авторка не лише доводить діагностичну ефективність претромбіну-1, протеїну С та розчинного фібрину, але й аналізує механізми регуляції активності тромбіну за реальних патологічних станів.

Узагальнення підбиває підсумки експериментальної роботи. В цьому розділі авторка складає загальну картину регуляції активності тромбіну з окремих «пазлів», що представлені в попередніх розділах. Розділ побудований логічно та послідовно, містить обговорення отриманих авторкою результатів.

За результатами роботи сформульовано 10 **висновків**, які базуються на отриманому фактичному матеріалі і є лаконічним теоретичним і практичним узагальненням проведених досліджень, представлені найважливіші результати, у повній відповідності до головної мети та завдань дослідження.

Наукова новизна роботи. У дисертаційній роботі вперше висунуто ідею цілеспрямованої регуляції одного ензиму для одночасного вирішення двох протилежних задач: попередження тромбофілії та зупинки кровотеч. Як результат, авторкою розроблено нові засоби для контролю гемостазу: інгібітори тромбіну для попередження протромботичних станів та гемостатики, які безпосередньо активують протромбін до тромбіну та зупиняють кровотечу. Патентоспроможність методів і підходів описаних в роботі підтверджує їх наукову новизну.

Оскільки обов'язковою умовою виявлення ризику тромбозів та контролю за антикоагулянтною терапією є контроль за станом системи гемостазу, авторкою запропоновано одночасне визначення трьох маркерів генерації тромбіну в кровотоці: появу претромбіну-1 та розчинного фібрину, а також зниження вмісту протеїну С. Аналіз цих маркерів, у порівнянні з клінічною картиною, дав змогу вперше простежити основні шляхи регуляції активності тромбіну не в модельній системі, а за реальних патологій.

клінічна практика». Всі методи, використані в роботі, підбрано раціонально, їх підпорядковано загальній меті та завданням дослідження, вони є інформативними та сучасними.

У розділі 3 запропоновано низькомолекулярні інгібітори тромбіну. Проведено *in silico* та *in vitro* скринінг запропонованих сполук та продемонстровано їх ефективність *in vivo* на моделі внутрішньовенного введення щурам.

Розділ 4 присвячений розробці специфічних гемостатичних засобів на основі екзогенного активатора протромбіну. Проведено модифікацію біоматеріалів різного типу активатором протромбіну, показано підвищення коагуляційних властивостей модифікованих біоматеріалів, та визначено модифікація яких матеріалів може бути безпечною, тобто не супроводжується десорбцією активатора. Особливо слід відзначити, що авторка пропонує медичні вироби для різних рівнів медичного забезпечення: на тактичному рівні корисним є «Карбогемостат», на оперативному – «Карбогемостат» та колагенові матриці, на стратегічному – колагенові матриці та фібриновий гель.

В Розділі 5, присвяченому виявленню патологічної внутрішньосудинної генерації тромбіну, теоретично обґрунтовано вибір маркерів появи тромбіну в кровотоці, розроблено метод визначення концентрації претромбіну-1 та протеїну С в плазмі крові, а також удосконалено метод кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові. Слід відзначити, що метод кількісного визначення претромбіну-1 та удосконалений метод визначення розчинного фібрину в плазмі крові впроваджені на базі медичних лабораторій.

Розділі 6 невеликий за розміром, але необхідний для доказового переходу від теоретичного передбачення маркерів появи тромбіну в кровотоці до доведення їх інформативності на рівні організму. В цьому розділі виявлення претромбіну-1, протеїну С та розчинних фібрин-мономерних комплексів за різних фізіологічних станів у тварин, стає базисом для підтвердження інформативності запропонованих в розділі 5 маркерів.

Практичне значення отриманих результатів. Робота має потужну біотехнологічну складову, що і обумовлює її практичне значення. Всі розробки представлені в дисертації: гемостатичні засоби, методи лабораторної діагностики знаходяться на тій чи іншій стадії впровадження.

Зокрема «Карбогемостат» пройшов успішні клінічні дослідження, комплект для отримання аутологічного фібринового гелю - успішно впроваджений в хірургічну практику та виробництво, колагенові матриці наразі знайшли своє застосування у ветеринарії, хоча мають всі передумови для впровадження у хірургію.

Результати, отримані при аналізі стану системи гемостазу пацієнтів, дали змогу сформулювати чіткі та прості методичні рекомендації, які стануть в пригоді як практикуючим лікарям, так і персоналу діагностичних лабораторій.

Обґрунтованість та достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій. Наукові положення та висновки, наведені в дисертації, є достовірними, що підтверджується використанням великого обсягу фактажу, логічністю постановки завдань, статистичним аналізом та узагальненням отриманих даних. Основні наукові положення викладено переконливо і логічно, висновки та рекомендації ґрунтуються на результатах власних досліджень. Методологія відповідає поставленим завданням.

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 у 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.

Дисертація і автореферат оформлені якісно і на достатньо високому рівні.

Дискусійні положення та зауваження до дисертаційного дослідження. Виявлені незначні стилістичні недоліки не впливають на значимість дисертації як наукової роботи.

Але хотілось би зауважити наступне:

1. Нажаль, попри переконливі експериментальні та клінічні дослідження, розроблені медичні вироби не мають широкого впровадження.

2. Не вистачає прямого порівняння розроблених кровоспинних виробів із відомими аналогами, такими як QuikClot, Celox, тощо.

3. Не всі групи пацієнтів достатньо докладно описані (пацієнти з аневризмою черевної аорти, ішемічною хворобою серця, ендопротезуванням кульшового суглобу).

Однак, вказані зауваження не зменшують наукової значущості й практичної цінності результатів дисертаційної роботи Корольової Д.С.

ЗАГАЛЬНИЙ ВИСНОВОК

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» 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:

начальник кафедри військової хірургії

Української військово-медичної академії,

Заслужений лікар України,

лауреат Національної премії імені Бориса Патона,

доктор медичних наук, професор,

полковник медичної служби

Сергій КОРОЛЬ

