

ВІДГУК

офіційного опонента доктора біологічних наук, професора, члена-кореспондента НАН України Стойки Ростислава Стефановича на дисертаційну роботу КОРОЛЬОВОЇ ДАР'І СЕРГІЇВНИ на тему «**Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів**», представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.04 – біохімія та 03.00.20. – біотехнологія (09 – біологічні науки).

Актуальність роботи. Біологічній ролі тромбіну в системі гемостазу присвячено дуже багато досліджень. Адже концентрація протромбіну в плазмі крові є досить високою й активація цього проензиму важлива як для ефективної зупинки кровотечі, так і для внутрішньосудинного тромбоутворення з чисельними негативними наслідками для організму. Тромбін регулює всі ланки системи гемостазу, здійснюючи як прокоагулянту, так і антикоагулянту функції. Через регуляцію про- чи антикоагулянтного шляху тромбінової активності, можна стимулювати екстрасудинне тромбоутворення, або ж запобігти внутрішньосудинному формуванню фібрину. Тому пошук нових шляхів регуляції активності тромбіну в нормі та за патологічних станів є актуальною загальнобіологічною проблемою, вирішення якої важливе також для медицини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Основні дослідження в рамках дисертаційної роботи виконано в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках 17-ти науково-дослідницьких проєктів, у т.ч. 1-го міжнародного проєкту від «European Fund for Displaced Scientists»:

Такий широкий перелік науково-дослідницьких проєктів за темою дисертаційної роботи, з одного боку, свідчить про те, що авторка роботи володіє різноманітною проблематикою біологічних досліджень, а, з другого боку, вказує на великий об'єм експериментальних досліджень, виконаних в рамках дисертаційної роботи.

Мета і завдання роботи. На думку рецензента, мета роботи «Пошук шляхів регулювання ензиматичної активності тромбіну та виявлення результатів його внутрішньосудинної появи» сформульована надто загально і вимагає певної конкретизації, з якої можна було б зрозуміти, чим саме планує займатися авторка. Завдання роботи сформульовані чітко і свідчать про великий об'єм дисертаційної роботи Корольової Д.С.

Методи дослідження. Перелік методів, використаних у дисертаційній роботі Корольової Д.С., підтверджує той факт, що вона може захищатися як за спеціальністю «біохімія», так і за спеціальністю «біотехнологія». В рецензованій роботі використані різноманітні гематологічні, фізико-хімічні, біохімічні, імунологічні, біоінформаційні і статистичні методи дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. На думку рецензента авторка досить «скромно» підійшла до формулювання головних наукових положень, що витікають з результатів її роботи. Як і у випадку з «Метою роботи», доцільно було більш конкретно пояснити основні положення, що витікають з дисертаційної

роботи, яка виносить на захист. Наприклад, положення «Вперше запропоновано способи вибору між коагуляцією та антикоагуляцією шляхом прямої дії на (про)тромбін молекулярними ефекторами: інгібіторами активності тромбіну та активаторами протромбіну». А що ж тут принципово нового? Необхідно було конкретизувати, як саме авторка здійснювала вибір між «коагуляцією та антикоагуляцією». Положення «Вперше застосовано кровоспинні засоби на основі активатора протромбіну, принцип дії яких є інноваційним, порівняно з існуючими неспецифічними гемостатичними засобами» більше відповідає наступному розділові «Практичне значення отриманих результатів». Положення «Запропоновано парадигму перемикання активності тромбіну за тромбофілії...» доцільно було розширити і пояснити детальніше, в чому полягають біохімічні механізми цієї парадигми. Щодо положення «Наукової новизни роботи» «Застосування цього принципу дозволило пояснити патогенез змін у системі гемостазу за таких патологій, як...», доцільно було розкрити, в чому саме полягає патогенез цих змін, щоб не шукати цих пояснень в тексті дисертаційної роботи. Усі згадані вище підрозділи повинні бути самодостатніми, щоб з них було зрозуміло, що саме авторка мала на увазі.

Особистий внесок здобувачки є визначальним на всіх етапах проведених досліджень. Про це свідчить також співавторство здобувачки, де вона є 1-м автором у 3-х міжнародних публікаціях і в 3-х публікаціях в українських періодичних виданнях (усі журнали з бази даних Скопус).

Повнота викладу основних результатів дисертаційної роботи в наукових фахових виданнях. Корольова Д.С. є співавтором 3-х статей в журналах з квартилем Q1, 3-х статей в журналах Q2, 3-х статей в журналах Q3, і 4-х статей в журналах Q4. Усі журнали, де опубліковані статті, є в базі даних Скопус. Крім того, 9 статей у співавторстві опубліковані у фахових журналах України і за кордоном.

Враховуючи докторський статус дисертаційної роботи Корольової Д.С. хотілося б побачити її одноосібні роботи, наприклад, оглядові статті, а також роботи з кореспондуючим співавторством.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності.

Результати та їх обговорення. Розділ 1 «Основи функціонування тромбіну» фактично виконує роль «Огляду літератури». Він викладений дещо нетрадиційно, оскільки в ньому замість історичного викладу матеріалу, пов'язаного з тромбіном, представлена є методологія дослідження цього важливого білка. Можливо, це пов'язано з тим, що другою спеціальністю захисту є «Біотехнологія». Цей розділ складається усього з 2-х підрозділів: 1) Функціональні сайти тромбіну; 2) Участь тромбіну у тромбоутворенні. Такий дискусійний спосіб викладу матеріалів, представлених в Розділі 1, свідчить про вміння авторки роботи мислити нетрадиційно, а саме ставити питання і намагатися давати на них відповіді, а не просто констатувати, що відомо в науковому світі про тромбін і його біологічну роль. Розділ 1 викладений всього на 16-ти сторінках машинопису, але в них авторка зуміла викласти головні положення, пов'язані зі структурою і функціями тромбіну.

У Розділі 2. «Матеріали та методи дослідження» детально описані матеріали, використані в роботі, як закуплені в різних фірм, так і виготовлені авторкою, такі як фібриноген, фібрин desAB, екамулін, претромбін-1. Для створення різних модельних систем у дисертаційній роботі використані різні лабораторні тварини (щури, кролики, миші).

Важливо зазначити, що в дисертаційній роботі проведені клінічні дослідження, зокрема «Відкрите, одноцентрове, проспективне, рандомізоване, контрольоване паралельне дослідження ефективності та безпечності застосування виробу медичного – композиту адсорбційного гемостатичного аплікаційного «Карбогемостат» для зупинки артеріальних кровотеч, зокрема за антитромботичної терапії», а також дослідження із залученням пацієнтів, з діагнозом синдром діабетичної стопи, що проходили курс антикоагулянтної терапії та пацієнтів з таким же діагнозом, що не приймають антикоагулянти.

Без сумніву, досвід роботи, набутий авторкою щодо використання в дослідженні реальних людських пацієнтів, є неоціненним для її подальших біомедичних досліджень. Клінічне дослідження «Рандомізоване, відкрите, контрольоване, паралельне, одноцентрове, проспективне клінічне дослідження безпечності та ефективності комплексу для одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції загоєння ран первинним натягом» було погоджено комісією з Біоетики при ТОВ «Мед Сервіс Консалтинг». Ці результати ретельно систематизовані та проаналізовані. Для розробки методу визначення претромбіну-1 в плазмі крові досліджено зразки плазми крові 72-х пацієнтів з різними патологіями, що супроводжуються порушеннями зсідання крові, а саме аневризмою черевної аорти, ендопротезування кульшового суглоба після перелому та інсульту.

Дослідженню також піддівали пацієнтів, що перенесли коронавірусну хворобу (COVID-19), які на момент забору крові одужали від захворювання на COVID-19 і були серопозитивними та ПЛР-негативними. Ці пацієнти були поділені на дві групи - з низьким ризиком ускладнень і з високим ризиком ускладнень. Пацієнти 2-ї групи мали принаймні один із таких факторів ризику, як вік старше 65 років, ожиріння з ІМТ > 25, цукровий діабет, а також різні серцево-судинні захворювання, включно з тромбозом глибоких вен, варикозним розширенням вен, атеросклерозом чи серцевою недостатністю.

Повний перелік піддослідних груп пацієнтів дійсно вражає. Це - дисфункція плаценти впродовж спонтанної вагітності (без специфічної антитромботичної терапії), вагітність, ускладнена ожирінням, ішемічна хвороба серця, аневризма черевної аорти, системний червоний вовчак, операція з ендопротезування кульшового суглобу, морбідне ожиріння, опікові травми. Без сумніву, цей факт ставить дисертаційну роботу Корольової Д.С. у розряд непересічних.

На думку рецензента, **Розділ 3 «Розробка нових способів інгібування активності тромбіну з метою створення антитромботичних препаратів»** не повністю виправдав надії авторки роботи і тому цей розділ краще було б розмістити в кінці представлення результатів роботи. Усі викладені тут результати необхідно було б представити в порівнянні до позитивного контролю – дії препарату

Аргатробан, який використовують в медичній практиці для профілактики та лікування тромбозів, або іншого офіційно затвердженого препарату з подібною дією. Тобто розпочинати виклад власних результатів краще було б з більш якісних результатів, яких без сумніву достатньо в даній роботі.

Підрозділ 3.3.2. «Дослідження *in vivo* інгібіторної дії низькомолекулярних сполук на процес активації та агрегації тромбоцитів» містить значну частину опису методів дослідження, який доцільніше було б розмістити у відповідному місці Розділу 2.

Розділ 4. Застосування активаторів протромбіну у медицині. У дослідженні використано отруту змій, багату на активатори протромбіну. Екзогенним активатором протромбіну слугував екамулін – ензим з отрути *Echis multisquamatus*, який у попередніх дослідженнях зарекомендував себе ефективним активатором протромбіну. Його носієм був карбоновий матеріал АУВМ «Дніпро»-МН, розроблений в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Запропоновано велику кількість гемостатичних засобів, але жоден з них не можна вважати ідеальним. В роботі використано біоінертні (целюлозне волокно, гідроксиапатит), біоактивні (вуглецевий сорбент, діоксид кремнію) і біодеградабельні (колаген, желатин) матеріали, які нековалентно функціоналізували екамуліном. Найбільш ефективними сорбентами виявилися діоксид кремнію, карбоновий сорбент, а також колаген і желатин. За результатами дослідження зроблено висновок про те, що модифікований колаген і вуглецевий сорбент є найбільш перспективними кровоспинними засобами для потенційного використання в хірургії. Модифікований екамуліном вуглецевий сорбент АУВМ «Дніпро»-МН (аплікаційний гемостатичний препарат «Карбогемостат») продемонстрував свою ефективність як перев'язувальний засіб для зупинки кровотечі на різних моделях - гострої судинної кровотечі щурів, печінкової кровотечі у щурів і кровотечі з стегнової артерії свиней. Тому цей препарат підлягав доклінічному дослідженню на базі ДП «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України». «Карбогемостат» не викликав сенсibiliзацію у експериментальних тварин і не містив аеробних та анаеробних бактерій. Успішне доклінічне випробування «Карбогемостату» дозволило провести його клінічне дослідження на базі поліклінічного відділення Київського міського клінічного ендокринологічного центру. Встановлено, що кровотеча зупинялась в усіх пацієнтів упродовж не більше як 3 хвилини з моменту застосування досліджуваного препарату. Цей ефект позитивно корелював з такими параметрами, як протромбіновий індекс, активований частковий тромбопластиновий час і вміст розчинних фібрин-мономерних комплексів в плазмі крові пацієнтів.

Саме ці результати є найбільш показовими і з них варто було розпочинати представлення результатів дисертаційної роботи.

В роботі продемонстровано ефективність використання колагену, функціоналізованого екамуліном, для зупинки кровотеч у лабораторних тварин.

У дослідженні використано фібриновий гель на основі плазми крові та збагаченої тромбоцитами плазми крові з використанням екамуліну, як ензимного активатора зсідання. Крім того, одержували аутологічний фібриновий гель для стимуляції загоєння ран у післяопераційний період після лоскутної анопластики у пацієнтів з гострими та хронічними формами комбінованого геморою.

Показано, що активність екамуліну щодо стимуляції зсідання крові у 30%-му розчині глюкози чи 50%-му розчині гліцерину зберігається протягом року.

Незважаючи на успішне використано як активатора протромбіну екамуліну з отрути змії *Echis multisquamatus*, масштабування виробництва цього продукту і його стандартизація становлять значні труднощі. Тому здобувачкою проведено роботу зі створення рекомбінантного активатора протромбіну та його апробації. Це – складна біотехнологічна проблема, бо екамулін складається із двох нековалентно з'єднаних субодиниць з молекулярною масою 67 (S1) і 27 (S2) kDa, що взаємодіють у співвідношенні 1:1. Авторка дисертаційної роботи успішно справилася з цим складним завданням. Автентичність отриманих рекомбінантних продуктів було підтверджено за допомогою мас-спектрометричного аналізу відповідних триптичних пептидів. Створення генетичної конструкції, що кодує структуру активатора протромбіну, присвячений підрозділ 4.5.2. Оскільки цей матеріал (сторінки 160-172) не відноситься безпосередньо до теми дисертаційної роботи, його доцільно було винести в Додатки. Одержаний рекомбінантний протеїн досліджували за здатністю ініціювати появу тромбіну, що призводить до активації тромбоцитів, за фібриноутворенням та впливом на гідроліз тромбін-специфічного амідного субстрату. Показано, що рекомбінантний протеїн володів здатністю ефективно активувати протромбін, що сприяло фібриноутворенню. Рекомбінантний активатор зсідання крові у вигляді аутологічного фібринового гелю характеризувався місцевою переносимістю як медикаментозний засіб.

Розділ 5. Виявлення патологічної внутрішньосудинної генерації тромбіну. Тут описано розробку діагностичних підходів для виявлення патологічної внутрішньосудинної активації тромбіну (підрозділ 5.1), розробку методу визначення рівня претромбіну-1 в плазмі крові (підрозділ 5.2), розробку методу визначення вмісту протеїна С в плазмі крові (підрозділ 5.3). Підрозділи 5.3.1. Отримання протеїну С з плазми крові людини і 5.3.2. Розробка підходів одержання рекомбінантних аналогів протеїну С з антигенними властивостями можна перенести в Додатки. Дані рестрикційного аналізу гену, що кодує протеїназу (підрозділ 5.3.2.1.), Опис структури генетичної конструкції для експресії рекомбінантного протеїну С (5.3.2.2.), Створення бібліотеки моноклональних антитіл до протеїну С (5.3.3.) також безпосередньо не відносяться до мети роботи і тому цей матеріал можна було б перенести в Додатки. У Розділ 5 ще включені підрозділи: 5.3. Розчинний фібрин: удосконалення та оптимізація методу визначення. 5.3.1 Стандартизація калібратора. 5.3.2. Визначення концентрації

розчинного фібрину в плазмі крові за допомогою різних tag-антитіл. 5.3.3. Підбір умов для ліофілізації tag-антитіла. 5.3.4 Апробація імуноензимних тест-систем для кількісного аналізу розчинного фібрину для діагностики загрози тромбоутворення. Ця інформація необхідна для досліджень, що стосуються фібрину в плазмі крові.

У Розділі 6. Визначення ознак внутрішньосудинної генерації тромбіну за моделювання патологічних станів у тварин досліджено три експериментальні моделі: 6.1. Модель променевої хвороби; 6.2. Модель гострого запалення; 6.3. Модель інсулінорезистентності з урахуванням вікового параметру.

У Розділі 7. Раціональна молекулярна діагностика патологічних станів, пов'язаних з внутрішньосудинною генерацією тромбіну розглядаються різні діагностичні системи, створені за результатами дисертаційної роботи: 7.1. Діагностика системи гемостазу за COVID-19, 7.2 Діагностика системи гемостазу за ускладненої вагітності, 7.3 Діагностика системи гемостазу за серцевосудинних захворювань (7.3.1. Ішемічна хвороба серця і 7.3.2. Аневризма черевної аорти), 7.4. Діагностика системи гемостазу за інших патологій (7.4.1. Системний червоний вовчак, 7.4.2. Операція з ендопротезування кульшового суглобу, 7.4.3. Морбідне ожиріння, 7.4.4. Опікова травма). Підрозділ 7.5. Можливі механізми менеджменту тромбіну при патологіях містить невдалий вираз «механізми менеджменту тромбіну».

Розділ 8. Заключення, очевидно, планувався як заміник Розділу «Аналіз і узагальнення результатів дисертаційної роботи». Він викладений на 7-ми сторінках, проте в ньому міститься лише аналіз власних результатів без їх співставлення з результатами аналогічних досліджень інших вчених. Не зрозуміло, чи взагалі проводили такі дослідження в світі і як їхні результати можна співставити з результатами дисертаційної роботи. В цьому розділі немає жодного посилання на роботи інших вчених.

За результатами дисертаційної роботи зроблено **10 висновків**, які є лаконічними та інформативними. Викликає здивування преамбула до висновків, що включає три головні положення. На думку авторки роботи вони витікають з отриманих результатів дослідження, проте в цих положеннях перелічені загально відомі факти: 1) про важливу роль тромбіну у внутрішньосудинному тромбоутворенню; 2) про індукцію екстрасудинного тромбоутворення для створення гемостатиків; 3) про значення діагностики протромботичних станів для прогнозування та успішної терапії розладів системи гемостазу. Дивно звучить Висновок 6 «Запропоновано претромбін-1 як молекулярний маркер генерації активного тромбіну». Питання – а що, може бути по-іншому?

Список використаної літератури налічує всього 203 найменування, що на думку рецензента недостатньо для докторської дисертації. Можливо, саме через це в Розділі 8 «Заключення» відсутнє співставлення результатів дисертаційної роботи з даними, наявними в науковій літературі.

Зміст автореферату відповідає змісту дисертації і достатньо повно висвітлює основні положення дослідження.

Запозичення, виявлені в дисертаційній роботі Корольової Дар'ї Сергіївни «Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів», оформленні коректно і не мають ознак академічного або інших видів плагіату, а наведені результати не містять ознак фабрикації та фальсифікації.

Загальний висновок та оцінка дисертації рецензентом. Незважаючи на висловлені редакційні зауваження щодо доцільності представлення окремих результатів в основному тексті і послідовності викладення основних розділів дисертаційної роботи, її достоїнства значно переважають ці недоліки. Дисертаційна робота Корольової Дар'ї Сергіївни на тему «**Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів**» виконана на високому науково-методичному рівні та є завершеним, цілісним і актуальним дослідженням з новими та важливими науковими і науково-практичними результатами. Обґрунтованість наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації, їх достовірність, а також повнота висвітлення в опублікованих статтях свідчать про фахову самостійність авторки та її високий професійний рівень. Одержані авторкою результати, безумовно, забезпечують вклад до вирішення важливих проблем в галузі біологічної науки.

Обрана теми роботи є дуже актуальною, про що свідчить той факт, що друге місце у списку ліків з найкращими світовими продажами у 2024 році (20,7 мільярдів доларів США) зайняв препарат Eliquis (апіксабан). Він виробляється фірмами Bristol Myers Squibb / Pfizer та успішно використовується як антикоагулянт для лікування і профілактики тромбів та інсульту, особливо після операцій із ендопротезування кульшового або колінного суглоба. Побічним ефектом від застосування цього препарату є незначна кровотеча, тоді як важкі симптоми включають біль у грудях, а також тривалу кровотечу під час менструації. До речі, про апіксабан чомусь не згадано у дисертаційній роботі Корольової Д.С.

Відповідно до результатів докінгу та молекулярної динаміки, здійснених в рамках дисертаційної роботи, відібрано серію потенційних інгібіторів тромбіну. Їхню здатність до інгібування тромбіну визначали у розроблених модельних системах *in vitro*, а також після їх розчинення у диметилсульфоксиді (DMSO, до речі, не вказано концентрацію цього досить агресивного розчинника) і його введення у хвостову вену щура. Аналіз структури запропонованих інгібіторів свідчить про те, що це – типові гетероциклічні сполуки, які погано розчинні, або зовсім нерозчинні у воді.

Апіксабан – це також типовий гетероцикл з 3-ма азотовмісними кільцями. Для його перорального застосування таблетку подрібнюють та змішують з водою, 5% глюкозою, або фруктовим соком. Авторці роботи необхідно подумати, як

можна підвищити ефективність дії запропонованих нею інгібіторів і сприяти їх кращій розчинності у воді.

Висновок про відповідність вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Дисертаційна робота Корольової Дар'ї Сергіївни на тему «**Регулювання активності тромбіну в нормі та за патологічних станів**» є цілісною завершеною науково-дослідною роботою, яка містить результати вирішення важливої сучасної проблеми щодо методів виявлення і попередження внутрішньо-судинного тромбоутворення та стимуляції екстрасудинного тромбоутворення для створення гемостатиків.

За актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів, логічністю і обґрунтованістю основних положень та висновків дисертація відповідає вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук, зокрема п.п. 7, 8, 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 року, а її авторка Корольова Дар'я Сергіївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.04 – біохімія та 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент

Завідувач відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу

Інституту біології клітини НАН України,

доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України,

Ростислав СТОЙКА

Підпис члена-кореспондента НАН України засвідчую:

Вчений секретар Інституту біології клітини НАН України,

канд. біол. наук



Марина БАРСЬКА

Львів, 14 листопада 2025 р.