

ВІДГУК

офіційного опонента Король Лесі Вікторівни

на дисертаційну роботу Карбовського Віталія Леонідовича «Система гемостазу у
постковідний період», представлену на здобуття наукового ступеня доктора
біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність дисертаційного дослідження. Незважаючи на завершення гострої фази пандемії COVID-19, проблема віддалених наслідків SARS-CoV-2-інфекції залишається надзвичайно актуальною. Значна частина населення світу перенесла COVID-19, а у багатьох реконвалесцентів після клінічного одужання тривалий час зберігаються різноманітні патологічні симптоми, що об'єднують терміном «постковідний синдром» (Long COVID). Постковідна симптоматика характеризується широким спектром клінічних проявів, включаючи серцево-судинні, неврологічні, когнітивні, імунні та метаболічні порушення. При цьому молекулярно-біохімічні механізми формування та підтримання постковідних ускладнень залишаються недостатньо вивченими, що визначає актуальність досліджень, спрямованих на з'ясування патогенетичних основ постковідного синдрому.

Особливу увагу привертає система гемостазу, що є однією з ключових мішеней SARS-CoV-2-інфекції. Відомо, що у гостру фазу COVID-19 у пацієнтів спостерігалися виражені порушення коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу, розвиток ендотеліальної дисфункції, мікро- та макротромбозів, що значною мірою визначало тяжкість перебігу захворювання та ризик летальних наслідків. Водночас питання щодо тривалості збереження порушень у системі гемостазу після перенесеної інфекції та їх ролі у розвитку постковідних ускладнень залишаються недостатньо дослідженими.

Актуальність таких досліджень зумовлена також тим, що порушення системи гемостазу можуть мати довготривалі наслідки. Збереження прокоагуляційного стану, ендотеліальної дисфункції, хронічного запалення та порушень фібринолізу може сприяти підвищенню ризику тромботичних ускладнень, ішемічних уражень та прогресуванню супутньої патології. У зв'язку з цим дослідження молекулярно-

біохімічних механізмів порушення системи гемостазу після перенесеного COVID-19 є важливим як з фундаментальної, так і з практичної точки зору.

Важливим напрямом сучасних досліджень є також оцінка стану системи гемостазу у осіб із хронічними неінфекційними захворюваннями, оскільки такі патології часто супроводжуються порушенням коагуляційного балансу, хронічним запаленням, ендотеліальною дисфункцією та змінами протеолітичних процесів. Перенесена SARS-CoV-2-інфекція може посилювати вже наявні патологічні зміни та сприяти формуванню стійкого протромботичного стану. У зв'язку з цим особливо актуальним є дослідження особливостей функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом, остеоартритом та іншими хронічними захворюваннями у постковідний період, оскільки це дозволяє краще зрозуміти механізми розвитку ускладнень, оцінити ризики тромботичних та судинних порушень і сформувати підґрунтя для розробки персоналізованих підходів до моніторингу та лікування таких пацієнтів.

Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами. Робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем «Тромбози як фактор ризику виникнення ускладнень у пацієнтів, що хворіли на COVID-19» (№д/р 0121U109854, 2021-2023 рр.); «Патології суглобів, спричинені порушеннями метаболізму в пост-ковідний період» (№д/р 0122U001909, 2022-2024 рр.) та виконання завдань Перспективного плану розвитку наукового напрямку «Біологія та охорона здоров'я» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (№д/р 0121U112939, 2021-2025 рр.).

Структура та обсяг дисертації. Робота складається зі вступу, огляду літератури (два розділи), опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень (шість розділів), заключення, висновків, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел нараховує 378 найменувань. Робота викладена на 389 сторінках, містить 15 таблиць та 69 рисунків.

Перший розділ дисертаційної роботи має оглядовий характер і присвячений аналізу сучасних уявлень щодо патогенетичних механізмів розвитку постковідного

синдрому та пов'язаних із ним порушень системи гемостазу. Розділ складається з двох підрозділів, у яких узагальнено сучасні літературні дані щодо основних механізмів формування постковідного синдрому, включаючи персистенцію вірусу SARS-CoV-2, імунну дизрегуляцію, аутоімунні процеси, ендотеліальну дисфункцію, хронічне запалення та порушення функціонування різних органів і систем. Особливу увагу автор приділяє аналізу механізмів розвитку коагулопатій та гемостатичних порушень у постковідний період. У розділі детально охарактеризовано роль ендотеліальної дисфункції, імунотромбозу, гіпоксії, аутоантитіл, позаклітинних нейтрофільних пасток, порушень фібринолізу та хронічного запалення у формуванні тромботичних ускладнень після перенесеної COVID-19-інфекції. Також узагальнено сучасні дані щодо участі аутоімунних реакцій, молекулярної мімікрії та персистуючої активації імунної системи у підтриманні патологічного стану системи гемостазу. На основі проведеного аналізу світової літератури автором обґрунтовано актуальність дослідження молекулярно-біохімічних механізмів постковідних порушень системи гемостазу, а також доцільність вивчення змін у функціонуванні коагуляційної та фібринолітичної ланок, ролі антитіл у підтриманні протромботичного стану у осіб, які перенесли COVID-19

Другий розділ дисертації містить характеристику дослідних груп та опис методів, що були використані для вирішення завдань роботи. До дослідження були залучені клінічно здорові донори плазми крові віком 25–45 років, у яких забір біологічного матеріалу проводили через 3–6 місяців після перенесеного COVID-19. На основі значень титру анти-SARS-CoV-2 IgG було сформовано шість дослідних груп, включаючи контрольну групу серонегативних донорів. Методична частина розділу охоплює широкий спектр сучасних підходів до аналізу системи гемостазу визначення вмісту та активності протеїназ і їх інгібіторів, концентрації цитокінів, ростових факторів. Значна увага приділена застосуванню хроматографічних методів для очищення з плазми крові білкових фракцій і комплексів антитіл з молекулами плазміногенового походження, а також використанню ензим-електрофорезу та вестерн-блот аналізу для характеристики білкових комплексів і оцінки протеолітичної активності. Таким чином, другий розділ формує

методологічну основу дисертаційної роботи та забезпечує належне обґрунтування отриманих результатів щодо молекулярно-біохімічних механізмів порушення системи гемостазу у постковідний період.

Наступні, з третього по шостий розділи, містять опис отриманих результатів відповідно до завдань роботи. Наведено комплексний аналіз стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19, з урахуванням рівня антитіл проти SARS-CoV-2, а також запропоновано молекулярно-біохімічне обґрунтування механізмів постковідних порушень. Отримані результати свідчать, що навіть через 3–6 місяців після перенесеного захворювання у донорів зберігаються ознаки протромботичного стану, що характеризуються підвищенням концентрації фібриногену, розчинних фібрин-мономерних комплексів та D-димеру, змінами у системі регуляції коагуляції та порушенням балансу між процесами коагуляції та фібринолізу. Особливу наукову цінність мають результати дослідження протеолітичного дисбалансу та нетипових білок-білкових взаємодій у плазмі крові реконвалесцентів після COVID-19. Автором вперше показано наявність ковалентних комплексів між антитілами класу G та молекулами плазміногенового і протромбінового походження, а також обґрунтовано їхню можливу участь у підтриманні прокоагулянтної спрямованості системи гемостазу у постковідний період. Важливим є також дослідження пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом, що продемонструвало посилення гемостатичних порушень після перенесеного COVID-19 у осіб з даними захворюваннями. Загалом результати роботи суттєво розширюють сучасні уявлення про механізми постковідної дисфункції системи гемостазу та мають як фундаментальне, так і прикладне значення.

У розділі «Заключення» автором узагальнено результати комплексного дослідження стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19, та сформовано цілісне уявлення про можливі молекулярно-біохімічні механізми підтримання постковідних порушень. Особливу увагу приділено результатам кореляційного аналізу, що дозволив виявити статистично достовірні взаємозв'язки між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та показниками системи гемостазу, маркерами запалення, вмістом окремих протеїназ та факторів клітинної відповіді.

Автором виокремлено низку показників, що найбільш тісно корелюють із рівнем антитіл проти SARS-CoV-2, зокрема рівень розчинних фібрин-мономерних комплексів, протейну С, інгібітора активатора плазміногену-1, молекул протромбінового походження, плазміногену, інтерлейкінів 6 та 8, тромбоцитарного фактора росту та інших факторів, що дозволило обґрунтувати взаємозв'язок між імунною відповіддю та порушенням системи гомеостазу у постковідний період. Важливим підсумком роботи є запропонована автором концепція участі ковалентних комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження у підтриманні постковідної симптоматики та порушень системи гемостазу. На основі отриманих результатів сформовано узагальнюючу схему, що відображає роль цих комплексів у розвитку протеолітичного дисбалансу, ендотеліальної дисфункції, гіпофібринолізу та підтриманні протромботичного стану. Запропонована модель суттєво розширює сучасні уявлення про патогенез постковідного синдрому та підкреслює можливу роль нетипових білок-білкових взаємодій у тривалому збереженні молекулярно-біохімічних порушень після перенесеної SARS-CoV-2-інфекції.

Наукова новизна отриманих результатів. Дисертаційна робота має беззаперечну наукову новизну, оскільки автором уперше отримано комплекс експериментальних даних, що суттєво розширюють сучасні уявлення про молекулярно-біохімічні механізми порушення системи гемостазу у постковідний період. Встановлено, що у постковідний період зберігається дисбаланс між коагуляційною та фібринолітичною ланками гемостазу, що супроводжується активацією процесів коагуляції, пригніченням фібринолізу та формуванням стійкого протромботичного стану навіть після клінічного одужання. Показано, що важливу роль у підтриманні постковідних порушень системи гемостазу відіграють процеси хронічного низькоінтенсивного запалення, зміни цитокінового профілю та порушення регуляції протеолітичних процесів. Встановлено взаємозв'язок між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та показниками коагуляційної, антикоагуляційної, фібринолітичної й протеолітичної систем, що дозволило розширити сучасні уявлення про патобіохімічні механізми розвитку постковідного синдрому. Автором уперше експериментально доведено існування ковалентних

комплексів між антитілами класу G та молекулами плазміногенового походження. Показано, що такі комплекси не є інертними утвореннями, а здатні проявляти залишкову або атипову протеолітичну активність, впливати на окремі ланки системи гемостазу та брати участь у підтриманні протромботичного й гіпофібринолітичного стану у постковідний період. Уперше обґрунтовано концепцію залучення ковалентних комплексів антитіл із молекулами плазміногенового походження до механізмів формування та підтримання постковідної симптоматики. Встановлено, що постковідний період у пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом характеризується посиленням прокоагуляційних змін, пригніченням антикоагуляційного та фібринолітичного потенціалу крові, а також накопиченням ковалентних комплексів антитіл із молекулами плазміногенового та протромбінового походження. Показано, що рівень таких комплексів достовірно зростає після перенесеної SARS-CoV-2-інфекції, що дозволяє розглядати їх як потенційний патогенетичний чинник розвитку постковідних ускладнень.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати мають важливе практичне значення для лабораторної оцінки стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19. Встановлені зміни коагуляційної, антикоагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу та виявлені кореляційні взаємозв'язки з титром антитіл проти SARS-CoV-2 можуть бути використані для моніторингу перебігу постковідного синдрому та оцінки ризику розвитку тромботичних ускладнень. Ідентифікація ковалентних комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового та протромбінового походження може бути використана для об'єктивнішої та комплексної оцінки стану системи гомеостазу, постковідного протромботичного стану та порушень фібринолітичного потенціалу у реконвалесцентів після COVID-19. Практичне значення одержаних результатів полягає також у поглибленні підходів до оцінки стану системи гемостазу у пацієнтів із хронічними неінфекційними захворюваннями, зокрема розсіяним склерозом та остеоартритом, після перенесеного COVID-19. Встановлені особливості функціонування коагуляційної, антикоагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу у таких пацієнтів можуть бути використані для своєчасного виявлення

осіб із підвищеним ризиком тромботичних та судинних ускладнень, а також для моніторингу перебігу постковідного синдрому на тлі хронічної патології. Виявлення у плазмі крові таких пацієнтів ковалентних комплексів антитіл із молекулами плазміногенового та протромбінового походження відкриває перспективи для розробки нових діагностичних підходів до оцінки тяжкості постковідних порушень у осіб із супутніми хронічними захворюваннями.

Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Карбовського В.Л. є завершеним самостійним науковим дослідженням, виконаним на високому науково-методичному рівні. Поставлені у роботі мета та завдання є чітко сформульованими, а отримані результати повною мірою забезпечують їх вирішення. Дослідження базується на значному обсязі експериментального матеріалу та використанні комплексу сучасних біохімічних методів та статистичних методів аналізу, адекватних поставленим завданням та сучасному рівню розвитку експериментальної біохімії. Текст дисертаційної роботи викладено послідовно, логічно та у науковому стилі. Результати власних досліджень достатньо проілюстровані таблицями, схемами та рисунками, що полегшує сприйняття матеріалу та підтверджує аргументованість наведених положень. Достовірність одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки забезпечується використанням адекватних методичних підходів, належною статистичною обробкою даних та відтворюваністю отриманих результатів. Наведені у роботі висновки є обґрунтованими, логічно випливають із результатів проведених досліджень та повністю відповідають поставленій меті та завданням дисертаційної роботи.

Повнота викладення основних наукових результатів роботи та апробація дисертації в опублікованих працях. Експериментальні дані, викладені у розділах роботи опубліковано 21 статтю: 12 статей у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus, з них 1 стаття у виданні, віднесеному до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) та 2 статті у виданнях, віднесених до третього і четвертого кuartилів (Q3 і Q4) відповідно до класифікації SCImago Journal and

Country Rank; 9 статей у наукових фахових виданнях України, а також 7 тез доповідей на вітчизняних і міжнародних конференціях.

Ідентичність реферату та основних положень дисертації. Дисертацію та реферат оформлено відповідно до вимог МОН України. Реферат викладено у науковому стилі літературною мовою. Він повною мірою відображає зміст дисертації, структуру та основні положення. Зміст реферату ідентичний основним положенням дисертації та стисло відображає її зміст.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертаційної роботи. У цілому матеріали у дисертаційній роботі викладено логічно, послідовно та з необхідним ступенем деталізації. Разом з тим, під час ознайомлення з дисертаційною роботою виникли зауваження та запитання, що не впливають на позитивну оцінку роботи та не знижують її теоретичну та практичну значність, але потребують уточнення.

1. Чому у дослідження включено пацієнтів з розсіяним склерозом та остеоартритом? Чи є якісь особливості формування постковідного синдрому специфічні саме для цих захворювань?
2. У роботі показано, що до складу очищених комплексів входять молекули протромбінового та плазміногенового походження, а також продукти їх деградації. Чи припускаєте Ви можливість існування в кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, інших комплексів антитіл з білками плазми крові? Які саме білки, на Вашу думку, можуть бути потенційними компонентами таких комплексів та яку роль вони можуть відігравати у формуванні постковідних порушень?
3. У роботі показано наявність ковалентних комплексів не лише в осіб, які перенесли COVID-19, але й у донорів без ознак перенесеної інфекції. Як Ви можете пояснити присутність таких комплексів у кровотоці практично здорових осіб?
4. У роботі показано наявність у складі комплексів деградованих форм плазміногену. Які механізми, на Вашу думку, можуть бути відповідальними за утворення таких фрагментів плазміногену в кровотоці? Чи є присутність деградованих форм плазміногену характерною лише для патологічних станів, чи вони можуть виявлятися і в нормі внаслідок фізіологічних процесів протеолізу?
5. У роботі продемонстровані зміни концентрації та активності плазміногену в крові донорів-добровольців залежно від відносного рівня антитіл. Як Ви можете

пояснити різну направленість змін концентрації та потенційної активності плазміногену залежно від рівня антитіл? Який з цих двох параметрів, на Вашу думку, є найбільш інформативний для діагностики порушень системи гемостазу?

6. Згідно з наведеними у роботі результатами, між концентрацією та активністю тканинного активатора плазміногену спостерігається певна невідповідність. Якими механізмами, на Вашу думку, можна пояснити відсутність прямого зв'язку між рівнем білка та його функціональною активністю?

7. Зниження потенційної активності молекул протромбінового походження у донорів із високими титрами антитіл Ви пов'яжете з наявністю функціонально неактивних форм цих молекул. Які молекулярні механізми, на Вашу думку, можуть лежати в основі такої функціональної неактивності?

Зауваження.

1. У розділі «Матеріали та методи» доцільно було б зазначити загальну кількість осіб, включених у дослідження. Хоча чисельність кожної окремої групи наведена, загальний обсяг вибірки у роботі прямо не вказаний, що дещо ускладнює сприйняття дизайну дослідження.

2. В роботі не зазначено, яким чином доводився факт, що учасник дослідження хворів на COVID-19 (тільки зазначалося, що відбір проводився за рівнем антитіл до SARS-CoV-2). Група 1- титр антитіл 0. Які учасники дослідження сформували цю групу?

3. Розділ 6 дисертаційної роботи описує різноспрямовані зміни концентрації цитокінів в крові учасників дослідження залежно від титру антитіл, але не подано жодної кореляційної залежності з показниками системи гемостазу, проте зміни у системі гемостазу дисертант пов'язує та обґрунтовує наявністю запалення та активністю імунологічних реакцій.

4. У роботі трапляються окремі твердження та обговорення літературних даних, які не завжди супроводжуються посиланнями на першоджерела. У подальшому автору доцільно приділяти більше уваги належному цитуванню літературних джерел.

5. Незважаючи на значний обсяг публікаційної апробації результатів, зокрема 12 статей у виданнях, індексованих у базі Scopus, але деякі з них суто медичної спрямованості. Також хотілося б бачити ширше представлення результатів на

міжнародних наукових форумах, що могло б сприяти активнішому обговоренню запропонованої автором концепції у світовому науковому середовищі.

6. По тексті дисертаційної роботи зустрічаються аббревіатури без подання повної назви, неодноразово зустрічаються і повні, і скорочені назви досліджуваних показників, граматичні, стилістичні та друкарські помилки.

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. За своєю актуальністю, новизною, обґрунтованими науковими результатами, визначенням перспективних практичних напрямів і повнотою представлення дисертаційна робота Карбовського Віталія Леонідовича «Система гемостазу у постковідний період», подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого Постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 року №1197, а її автор Карбовський В.Л. заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю – біохімія.

Офіційний опонент

доктор біологічних наук,

старший науковий співробітник,

завідувачка лабораторії біохімії

ДУ «Національний науковий центр хірургії

та трансплантології імені О.О. Шалімова

НАМН України»



Леся КОРОЛЬ

