

ВІДГУК

**офіційного опонента Корольової Дар'ї Сергіївни
на дисертацію Карбовського Віталія Леонідовича
«Система гемостазу у постковідний період»,
подану до захисту на здобуття ступеня доктора біологічних наук за
спеціальністю 03.00.04 - біохімія**

Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19 та встановленню молекулярно-біохімічних механізмів постковідних порушень у системі гемостазу з урахуванням рівня антитіл до SARS-CoV-2. Актуальність теми дисертації обумовлена низкою важливих наукових і практичних аспектів. По-перше, система гемостазу є однією з ключових мішеней SARS-CoV-2-інфекції. Саме порушення рівноваги між ланками системи гемостазу та, як наслідок, тромбоемболічні ускладнення були характерними ознаками тяжкого перебігу COVID-19 та призводили до високої смертності за цього захворювання. Водночас питання щодо тривалості та механізмів підтримання ризику тромботичних ускладнень після одужання залишаються недостатньо дослідженими. По-друге, на сьогодні постковідний синдром (Long COVID) визнаний окремою медичною проблемою, яка характеризується надзвичайно широким спектром клінічних проявів, включаючи хронічну втому, когнітивні порушення, серцево-судинні розлади, зміни імунного статусу та інші функціональні порушення. Незважаючи на значну кількість клінічних спостережень, патогенетичні механізми розвитку та підтримання постковідної симптоматики залишаються до кінця не з'ясованими. У зв'язку з цим особливої актуальності набувають дослідження, спрямовані на пошук молекулярно-біохімічних механізмів і маркерів, які можуть пояснювати тривале збереження патологічних змін після перенесеної інфекції. По-третє, особливий інтерес становить вивчення наслідків COVID-19 у пацієнтів із супутніми захворюваннями, особливо у

випадку, коли такі захворювання самі по собі можуть супроводжуватися порушеннями гемостатичного балансу, запальними реакціями та змінами протеолітичних процесів. Тому перенесена SARS-CoV-2-інфекція потенційно здатна посилювати наявні патологічні зміни та підвищувати ризик розвитку судинних і тромботичних ускладнень. З огляду на це дослідження особливостей функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом, остеоартритом та іншими хронічними патологіями після COVID-19 є важливим як з фундаментальної, так і з клінічної точки зору. Таким чином, дисертаційна робота присвячена актуальній науковій проблемі, спрямованій на поглиблення сучасних уявлень про молекулярні механізми постковідних порушень та їх зв'язок зі станом системи гемостазу, що має важливе значення для розвитку біохімії, патофізіології та клінічної медицини.

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

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка в межах виконання науково-дослідних тем: «Тромбози як фактор ризику виникнення ускладнень у пацієнтів, що хворіли на COVID-19» (№ держреєстрації 0121U109854, 2021–2023 рр.) та «Патології суглобів, спричинені порушеннями метаболізму у постковідний період» (№ держреєстрації 0122U001909, 2022–2024 рр.), а також відповідно до завдань Перспективного плану розвитку наукового напрямку «Біологія та охорона здоров'я» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (№ держреєстрації 0121U112939, 2021–2025 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Структура дисертаційної роботи логічна, матеріали розділів викладено відповідно до мети і поставлених задач. Робота оформлена традиційно і містить всі необхідні розділи, а саме: вступ, два підрозділи огляду літератури, які вводять в проблематику дослідження, матеріали та методи

дослідження, шість розділів експериментальної частини, заключення, висновки та список використаної літератури.

У першому розділі дисертації **«Постковідний синдром: патогенетичні механізми та гемостатичні порушення»** (огляд літератури, 23 сторінки) автором детально викладено, узагальнено та систематизовано сучасні дані щодо біохімічних механізмів розвитку ускладнень у постковідний період на рівні різних систем організму. Зокрема, окреслено роль дисфункції ендотелію, продукції аутоантитіл, тривалої гіпоксії, низькорівневого хронічного запалення в розвитку коагулопатії в постковідний період. Особливу увагу приділено основним причини виникнення порушень у функціонуванні системи гемостазу у постковідний період. Проналізовано характерні зміни коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу, ролі ендотеліальної дисфункції, запальних та імунних процесів у формуванні постковідних ускладнень. Окремо розглянуто сучасні уявлення щодо участі аутоантитіл та нетипових імунних механізмів у підтриманні тривалих патологічних змін після COVID-19. Матеріал викладено послідовно і логічно, що свідчить про глибоку обізнаність автора з сучасним станом проблеми. Проведений аналіз літератури став належним теоретичним підґрунтям для формування мети, завдань та інтерпретації результатів власних досліджень.

У розділі 2 **«Матеріали і методи досліджень»** (24 сторінки) докладно описано використані методи дослідження. Це хроматографічні методи для очищення комплексів антитіл з білками, одержання фракції серинових протеїназ, аналіз білково-пептидного складу фракцій; електрофоретичні методи для визначення молекулярної маси білків, виявлення протеїназ різної субстратної специфічності, контроль на етапах очищення цільових білків; спектрофотометричні методи для визначення активності ферментів, вмісту окремих сполук; метод імуноферментного аналізу для визначення вмісту цитокінів, матриксних металопротеїназ, факторів клітинної відповіді. Крім того, автором описано використані в роботі методи лабораторної діагностики

стану системи гемостазу та окреслено їх діагностичне значення. Наприкінці, розділу розгорнуто описано статистичні та математичні методи аналізу.

Третій розділ дисертаційної роботи «**Стан системи згортання крові у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-COV-2 у постковідний період**» (54 сторінки) присвячений характеристиці системи зсідання: визначено параметри зовнішнього та внутрішнього шляхів системи зсідання, визначено концентрацію фібриногену та його здатність до зсідання у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у постковідний період. Автором проаналізовано основні показники про- та антикоагулянтної ланок системи гемостазу, зокрема параметри коагуляційних скринінгових тестів, рівні фібриногену, розчинних фібрин-мономерних комплексів, D-димеру, протромбіну, антитромбіну III, протеїну C та тромбомодуліну. Отримані результати свідчать про наявність дисбалансу між про- та антикоагулянтною ланками системи гемостазу і формування латентного протромботичного стану у осіб, які перенесли COVID-19.

У **четвертому розділі** дисертаційної роботи «**Оцінка стану системи фібринолізу у донорів з різними титрами антитіл до SARS-COV-2 у постковідний період**» (26 сторінок) досліджено стан фібринолітичної системи у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у постковідний період. Автором проаналізовано зміни в активності та вмісті плазміногену/плазміну та основних модуляторів плазмінової активності (тканинного активатора плазміногену, PAI-1, $\alpha 2$ -антиплазміну, $\alpha 2$ -макроглобуліну, тощо). Отримані результати свідчать про порушення функціонування фібринолітичної ланки гемостазу та пригнічення процесів фібринолізу у осіб, які перенесли COVID-19.

У **п'ятому розділі** дисертаційної роботи «**Протеолітичний профіль плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-COV-2 у постковідний період**» (42 сторінки) досліджено протеолітичний профіль плазми крові донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у постковідний період. Автором проаналізовано зміни протеїнового складу

плазми крові на фоні характеристики роботи нирок та печінки за біохімічними маркерами; визначено профіль матриксних металопротеїназ та їх інгібітора, а також вміст та активність серинових протеїназ в плазмі крові. Отримані результати свідчать про порушення протеолітичного гомеостазу у осіб, які перенесли COVID-19.

Шостий розділ «Аналіз запальних та стрес-асоційованих маркерів у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-COV-2 у постковідний період» (26 сторінок), присвяченому аналізу запальних та стрес-асоційованих маркерів, автором досліджено цитокіновий профіль, показники запалення, фактори ангіогенезу, гіпоксії та клітинного стресу у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у постковідний період. Доведено збереження в постковідному періоді хронічного низькорівневого запального процесу, що супроводжується дисбалансом вмісту прозапальних та протизапальних цитокінів, а також порушенням регуляції факторів ангіогенезу, порушення метаболізму заліза та активацію процесів тканинного ремоделювання.

Сьомий розділ «Комплекси антитіл з молекулами плазміногенового походження як потенційні тригери порушень гомеостазу у постковідний період» (39 сторінок) є родзинкою роботи Карбовського В.Л., де цілим спектром методів автор доводить утворення комплексів антитіл з молекулами плазмінового походження та демонструє функціональність таких комплексів як потенційних тригерів порушень гомеостазу у постковідний період. Автором вперше очищено та охарактеризовано ковалентні комплекси, до складу яких входять імуноглобуліни класу G та молекули плазміногену і його деградованих форм. За допомогою афінної хроматографії, електрофоретичних методів та вестерн-блот аналізу підтверджено ковалентний характер взаємодій між компонентами комплексів. Показано, що очищені комплекси виявляють функціональну активність та можуть бути залучені до підтримання порушень

гемостатичного балансу, хронічного запалення і протеолітичного дисбалансу у осіб, які перенесли COVID-19.

У восьмому розділі «Особливості функціонування системи гемостазу у постковідний період у пацієнтів з розсіяним склерозом та остеоартритом» (29 сторінок) досліджено особливості функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом у постковідний період. Показано, що перенесений COVID-19 супроводжується посиленням прокоагуляційних змін, пригніченням антикоагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу, а також збереженням ендотеліальної дисфункції у пацієнтів із хронічними захворюваннями. Крім того, у плазмі крові пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом, які перенесли COVID-19, вперше виявлено ковалентні комплекси антитіл з молекулами плазміногенового та протромбінового походження, рівень яких суттєво зростає після перенесеної інфекції.

У розділі «Заключення» автором узагальнено результати комплексного дослідження стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19, та сформульовано основні патогенетичні механізми розвитку постковідних порушень. Наведено результати кореляційного аналізу щодо взаємозв'язків між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та досліджуваними показниками. На підставі отриманих результатів автором запропоновано узагальнюючу концепцію та схему залучення таких комплексів до молекулярно-біохімічних механізмів розвитку постковідного синдрому.

Достовірність та наукова новизна одержаних результатів.

Загальний аналіз змісту дисертаційної роботи свідчить про системний, цілісний та самостійний характер виконаного дослідження, його високий науково-методичний рівень і безперечну наукову новизну. Достовірність одержаних результатів забезпечується достатнім обсягом експериментального матеріалу, використанням комплексу сучасних біохімічних методів, адекватних поставлених меті та завданням роботи, а

також обґрунтованим застосуванням сучасних методів статистичної обробки даних. Наукові положення, висновки та узагальнення ґрунтуються на результатах власних експериментальних досліджень автора, є логічно обґрунтованими та взаємопов'язаними. Наукова новизна роботи полягає насамперед у тому, що автором уперше проведено комплексне дослідження функціонування системи гемостазу у постковідний період з урахуванням титру антитіл проти SARS-CoV-2. Особливої уваги заслуговують результати, присвячені виявленню та характеристиці ковалентних комплексів імуноглобулінів класу G з молекулами плазміногенового походження. Автором уперше експериментально доведено існування таких комплексів у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, встановлено їх ковалентну природу, склад та підтверджено наявність ферментативної активності. Запропоновано новий підхід до розуміння механізмів формування постковідного дисбалансу системи гемостазу, відповідно до якого ковалентні білкові комплекси можуть виступати одним із ключових патогенетичних чинників підтримання порушень коагуляції, фібринолізу та протеолітичних процесів у постковідний період. Важливими та оригінальними є також результати щодо дослідження системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом після перенесеного COVID-19, що дозволило розширити сучасні уявлення про особливості постковідних порушень у осіб із супутніми захворюваннями.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.

Теоретичне значення дисертаційної роботи полягає у розширенні сучасних уявлень про молекулярно-біохімічні механізми розвитку постковідного синдрому та порушень функціонування системи гемостазу після перенесеної SARS-CoV-2-інфекції. Отримані результати поглиблюють знання щодо взаємозв'язку між імунною відповіддю, коагуляційними та фібринолітичними процесами, протеолітичним гомеостазом і хронічним запаленням у постковідний період. Особливу теоретичну цінність має запропонована автором концепція участі ковалентних комплексів антитіл з

молекулами плазміногенового походження у формуванні та підтриманні гемостатичного дисбалансу, яка розширює сучасні уявлення про патогенез постковідних ускладнень.

Практичне значення роботи визначається можливістю використання отриманих результатів для вдосконалення підходів до лабораторної оцінки стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19. Встановлені зміни показників коагуляційної ланки, фібринолітичної системи, а також виявлені взаємозв'язки між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та активністю окремих факторів системи гемостазу можуть бути використані для стратифікації ризику розвитку тромботичних ускладнень у постковідний період. Практичний інтерес становлять результати щодо виявлення ковалентних комплексів антитіл з молекулами плазміногенового та протромбінового походження, які можуть розглядатися як маркери порушень гемостатичного гомеостазу та потенційні об'єкти для подальших діагностичних і терапевтичних розробок. Результати дисертаційної роботи впроваджені у практичну діяльність медичних закладів («Андроцентр», м. Обухів, «Біомед», м. Київ, ТОВ «Медбуд-Клінік», м. Київ).

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях.

Результати дисертації висвітлено у 21 публікації: 12 статей у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus, з них 1 стаття у виданні, віднесеному до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) та 2 статті у виданнях, віднесених до третього і четвертого квартилів (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.

Оцінка змісту дисертації.

Аналіз змісту дисертаційної роботи свідчить, що дисертація є цілісною, логічно структурованою та завершеною науковою працею, у якій послідовно викладено результати комплексного дослідження молекулярно-біохімічних механізмів порушення системи гемостазу у постковідний період. Робота характеризується належним науково-методичним рівнем, чіткою структурою та логічною послідовністю викладення матеріалу. Представлені результати ґрунтуються на достатньому обсязі експериментальних досліджень, виконаних із застосуванням сучасних біохімічних методів. Висновки дисертації є обґрунтованими, відповідають поставленим завданням і логічно впливають із отриманих результатів. Особливо слід відзначити комплексний підхід автора до дослідження системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19, а також оригінальність результатів, пов'язаних із виявленням та характеристикою ковалентних комплексів імуноглобулінів класу G з молекулами плазміногенового та протромбінового походження. Запропонована автором узагальнююча концепція участі таких комплексів у підтриманні постковідного протромботичного стану є науково обґрунтованою та добре аргументованою експериментальними даними.

Під час аналізу тексту дисертації порушень принципів академічної доброчесності не виявлено. Робота містить належні посилання на використані літературні джерела, коректно оформлені цитування та повну інформацію щодо використаних методичних підходів. У дисертації відсутні ознаки академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації чи фальсифікації результатів дослідження.

Загалом дисертаційна робота є завершеним самостійним науковим дослідженням, виконаним на високому науковому рівні, та робить вагомий внесок у розвиток сучасних уявлень про молекулярно-біохімічні механізми постковідних порушень системи гемостазу.

Дискусійні положення та зауваження щодо змісту дисертації.

1. В обговоренні результатів дослідження присутньо багато повторів тез із першого розділу. Натомість в роботі відсутній цілісний опис роботи ланок систему гемостазу, якій, власне, присвячено дисертаційне дослідження. На мій погляд, доцільно було б в огляді літератури приділити більше уваги системі гемостазу, а опис впливу імунної системи на гемостаз лишити в обговоренні результатів.

2. В роботі відсутнє чітке обґрунтування чому відправними точками стали саме обрані титри антитіл. Можливо саме такі титри антитіл корелюють з динамікою чи важкістю захворювання чи лабільністю імунної системи, клінічними проявами в період одужання, тощо?

3. Автор в обговоренні результатів тесту АЧТЧ робить припущення, щодо причин подовження часу зсідання в цьому тесті. Однак для звуження кола причин такого подовження було б доречно провести інгібіторно-корекційну пробу в тесті АЧТЧ.

4. Феномен подовження часу зсідання в тесті ТЧ (який зазвичай є прямим наслідком зменшення концентрації фібриногену) в групі пацієнтів з найвищим рівнем фібриногену потребує окремого пояснення (рис 3.4 та 3.5; група 2).

5. Автор на підставі комплексного аналізу показників фібринолітичної системи у осіб, які перенесли COVID-19, робить висновок про «певне зниження фібринолітичного потенціалу, яке, у залежності від групи донорів, має різні причини». Однак у цих донорів спостерігається підвищена концентрація D-димеру, що є наслідком роботи фібринолізу. Які ймовірні механізми такої картини?

6. На мій погляд, недостатньо перехресного аналізу результатів описаних в різних розділах. Скажімо, співставлення:

- результатів отриманих щодо рівню матриксних металонротейназ (розділ 5) із результатами дослідження компонентів фібринолітичної

системи, зокрема активністю плазміну, який здатен активувати матриксні металопротеїнази (розділ 4); або

- профілю прозапальних маркерів (розділ 6) із концентрацією фібриногену, який є протеїном гострої фази запалення (розділ 3), чи
- рівню фактору росту фібробластів (розділ 6) із появою тромбомодуліну в плазмі крові (розділ 3).

7. З моєї точки зору, роботу поліпшила б глибша характеристика антитіл виявлених у донорів, зокрема, визначення наявності/відсутності аутоантитіл до компонентів системи гемостазу, окрім похідних плазміногену; встановлення розподілу субкласів антитіл; визначення про-/анти-запального профілю глікозилювання антитіл, тощо.

8. Як можна пояснити чому у пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли на COVID-19 активність протеїну С знижується (рис 8.6), в той час як у постковідних пацієнтів без цього супутнього захворювання в групах 2 – 5 (рис. 3.16) цей параметр зростає?

Разом з тим, наголошую, що висловлені зауваження мають суто рекомендаційний характер і не зменшують високої оцінки представленого дослідження.

Загальний висновок та оцінка дисертації.

Дисертаційна робота Карбовського Віталія Леонідовича на тему «Система гемостазу у постковідний період» є самостійним, завершеним науковим дослідженням. Актуальність обраної теми дослідження, обґрунтованість наукових положень та висновків, їх достовірність та наукова новизна одержаних результатів, повнота викладу в опублікованих працях свідчать про наукову самостійність автора. Одержані автором результати забезпечують внесок у розв'язання актуального наукового завдання в галузі науки 03.00.04 біохімія, а саме розуміння механізмів, які лежать в основі розвитку постковідного синдрому.

Дисертаційна робота Карбовського Віталія Леонідовича на тему «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 Віталій Леонідович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент –

доктор біологічних наук,

старший дослідник,

старший науковий співробітник

відділу структури і функцій біологічних систем

Інституту біохімії

ім. О.В. Палладіна НАН України



[Handwritten signature]

Дар'я КОРОЛЬОВА

Підпис Корольова Д.С.
 ЗАСВІДЧУЮ
 Зав. канцелярією
 Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна
 національної академії наук України
 "08" 06 2026 р. Курінова

КИЇВСЬКИЙ
 НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
 імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
 Вх. № 4169 "10"
 "10" 06 2026 р.