

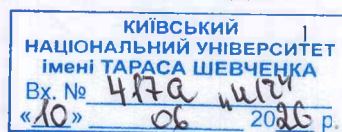
ВІДГУК

офіційного опонента Прилуцької Світлани Володимирівни
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 обраної теми дисертаційного дослідження. Актуальність теми дисертаційного дослідження полягає у вирішенні важливих фундаментальних наукових завдань щодо молекулярних механізмів розвитку постковідних ускладнень, а також подоланні медико-соціальних наслідків пандемії COVID-19. Незважаючи на завершення гострої фази пандемії, проблема віддалених наслідків SARS-CoV-2-інфекції не втрачає своєї актуальності. Останні міжнародні дослідження показують, що мільйони людей у світі стикаються з проявами постковідного синдрому (Long COVID), який характеризується тривалим збереженням різноманітних клінічних симптомів та функціональних порушень після елімінації вірусу з організму. Особливістю цього стану є його мультисистемний характер, що охоплює серцево-судинну, дихальну, нервову, ендокринну та імунну системи, а також здатність суттєво знижувати якість життя, працездатність і соціальну активність пацієнтів. Водночас патогенетичні механізми формування та підтримання постковідного синдрому досі залишаються недостатньо з'ясованими та вивченими. Особливе занепокоєння викликає той факт, що тривалі порушення можуть розвиватися не лише після тяжких форм COVID-19, але і в осіб із легким або навіть безсимптомним перебігом захворювання. Відсутність чітких прогностичних критеріїв і недостатня вивченість механізмів персистенції патологічних змін значною мірою обмежують можливості своєчасної діагностики, профілактики та лікування постковідних ускладнень. Саме тому дослідження молекулярно-біохімічних механізмів розвитку довготривалих наслідків SARS-CoV-2-інфекції належить до пріоритетних напрямів сучасної біомедицини. Однією з ключових систем організму, яка зазнає суттєвих патологічних змін під час COVID-19, є система гемостазу. На сьогодні накопичено значний обсяг доказів того, що SARS-CoV-2-інфекція супроводжується розвитком ендотеліальної дисфункції, активацією коагуляційного каскаду, порушенням фібринолізу та формуванням протромботичного стану. Саме тромбоемболічні ускладнення є однією з основних причин тяжкого перебігу захворювання та летальності при COVID-19. Однак якщо зміни системи гемостазу в гострому періоді інфекції досліджені достатньо детально, то особливості її функціонування у віддалені терміни після перенесеного захворювання залишаються маловивченими. Особливої уваги потребує з'ясування причин тривалого збереження гіперкоагуляційного стану у клінічно здорових реконвалесцентів.

Важливим аспектом досліджуваної проблеми є також роль імунної системи у формуванні постковідних порушень. В останні роки з'являється дедалі більше даних про здатність SARS-CoV-2 індукувати утворення широкого спектра аутоантитіл та інших імунних факторів, які можуть тривалий час циркулювати в організмі після перенесеної інфекції. Встановлено, що такі антитіла здатні



впливати на функціонування ендотелію, тромбоцитів, системи комплементу та окремих факторів гемостазу, сприяючи підтриманню хронічного запалення і протромботичного стану. У зв'язку з цим особливого значення набувають дослідження, спрямовані на вивчення взаємозв'язку між рівнем антитіл до SARS-CoV-2 та функціональним станом системи гемостазу.

Безперечним науковим інтересом характеризується запропонований у роботі підхід до вивчення ролі нетипових білок-білкових взаємодій та ковалентних комплексів за участю антитіл і білків системи гемостазу. Такий напрям досліджень є відносно новим і недостатньо висвітленим у світовій науковій літературі, хоча саме подібні комплекси потенційно можуть бути важливими чинниками тривалого порушення коагуляційно-фібринолітичної рівноваги. Встановлення їхньої структури, функціональних властивостей та ролі у підтриманні протромботичного стану має не лише фундаментальне значення для розуміння патогенезу постковідного синдрому, але й може стати основою для пошуку нових біомаркерів та терапевтичних мішеней.

Слід також відзначити практичну спрямованість виконаного дослідження. Виявлення молекулярних механізмів розвитку порушень системи гемостазу, встановлення зв'язку між титром антитіл до SARS-CoV-2 та змінами коагуляційно-фібринолітичного балансу, а також пошук нових прогностичних маркерів тромботичних ускладнень можуть сприяти вдосконаленню підходів до лабораторної діагностики, моніторингу та персоналізованого ведення пацієнтів у постковідному періоді. Особливо актуальними такі дослідження є для осіб із супутніми хронічними захворюваннями, зокрема розсіяним склерозом та остеоартритом, у яких перенесений COVID-19 може додатково посилювати ризики гемостатичних порушень.

Таким чином, дисертаційна робота, присвячена дослідженню стану системи гемостазу та молекулярно-біохімічних механізмів постковідних порушень у осіб із різним рівнем антитіл до SARS-CoV-2, вирішує актуальну наукову проблему, яка перебуває на перетині біохімії, молекулярної біології, імунології та клінічної медицини. Її результати мають важливе значення для поглиблення сучасних уявлень про патогенез постковідного синдрому та можуть стати підґрунтям для розробки нових підходів до прогнозування, профілактики та корекції його ускладнень.

Зв'язок роботи із науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна 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, спричиненні 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. Дисертація представлена за традиційної схемою і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень,

результатів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел і додатків. Дисертація викладена на 389 сторінках, з них основна частина займає 320 сторінок, робота містить 15 таблиць та проілюстрована 69 рисунками. Список використаних літературних джерел нараховує 378 найменувань.

Вступ дисертаційної роботи викладено чітко і лаконічно, у ньому достатньою мірою обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету і завдання досліджень, наведено зв'язок робіт із науковими програмами, висвітлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів.

Аналіз літературних джерел викладено у двох підрозділах, у яких автор детально розглядає сучасні уявлення про патогенетичні механізми розвитку постковідного синдрому та узагальнює наявні дані щодо порушень функціонування системи гемостазу після перенесеної SARS-CoV-2-інфекції. Особливу увагу приділено ролі запальних процесів, ендотеліальної дисфункції, змін коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу, а також можливому внеску імунних механізмів у формування віддалених наслідків COVID-19. Наведений огляд літератури є змістовним, логічно структурованим і достатньою мірою обґрунтовує актуальність обраної теми, мету дослідження та сформульовані завдання.

Розділ «Матеріали та методи дослідження» включає перелік методів, які автор використав для вирішення завдань роботи і досягнення мети. Використані автором методи дослідження є сучасними, адекватними поставленій меті та достатніми для вирішення сформульованих завдань. Дослідження виконано на плазмі крові донорів, які перенесли COVID-19 та відрізнялися за титрами антитіл проти SARS-CoV-2, а також за участю пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом. Для оцінки стану системи гемостазу, дослідження залучення протеолітичних реакцій та аналізу внеску запальних процесів у формування постковідного синдрому використано комплекс біохімічних методів, у тому числі коагуляційні тести, афінну хроматографію, та хроматографію, що поділяє за розмірами, імуноферментний аналіз, електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності, ензим-електрофорез (зимографію), вестерн-блот аналіз, визначення активності ферментів та їх інгібіторів із використанням хромогенних субстратів. Отримані результати досліджень оброблено із застосуванням сучасних математичних методів статистичного аналізу, що забезпечує належний рівень достовірності зроблених висновків. Широкий спектр використаних методичних підходів дозволив автору дослідити проблему на різних рівнях організації - від функціонального стану системи гемостазу до молекулярних механізмів формування постковідних порушень.

Результати, отримані автором, викладено у шести розділах власних результатів та їх обговорення та узагальнено у заключенні. У першому розділі (Розділ 3 - відповідно до структури дисертації) наведено результати дослідження стану коагуляційної ланки системи гемостазу у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Автором встановлено зміни вмісту та активності ключових факторів згортання крові, що свідчать про збереження латентного

протромботичного стану у постковідний період. Четвертий розділ присвячено оцінці функціонування системи фібринолізу у осіб з різним титром антитіл проти SARS-CoV-2. Проаналізовано вміст та активність ключових факторів - плазміногену, тканинного активатора плазміногену, інгібітора активатора плазміногену-1 та α_2 -антиплазміну. Отримані результати свідчать про наявність порушень фібринолітичної ланки гемостазу. У п'ятому розділі досліджено протеолітичний профіль плазми крові осіб, що перенесли COVID-19. На основі отриманих результатів автором зроблено висновок, що у постковідний період відбувається посилення протеолізу, опосередковане матриксними металопротеїназами, із варіабельністю внеску окремих ферментів залежно від титру антитіл проти SARS-CoV-2. Зростання концентрації серинових протеїназ виявлено лише у плазмі крові донорів із титрами антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Index (S/C), 55 ± 5 Index (S/C), 150 ± 5 Index (S/C). Шостий розділ присвячений аналізу запальних, стрес-асоційованих та ангіогенних маркерів. Автором показано збереження ознак хронічного низькорівневого запалення та дисбалансу про- і протизапальних факторів, які можуть бути важливими складовими патогенезу постковідного синдрому. Зміни вмісту ростових і транскрипційних факторів - VEGF, FGF-2, PDGF, NF- κ B та HIF-1 α носять різноспрямований характер залежно від титру антитіл проти SARS-CoV-2 та свідчать про порушення механізмів регуляції й реалізації регенераційного потенціалу організму у постковідний період. У сьомому розділі представлено результати очищення з плазми крові осіб, що перенесли COVID-19, комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження та наведено їх первинну характеристику. Поєднуючи низку біохімічних методів автор доводить ковалентну природу взаємодій складових комплексу та підтверджує наявність у складі комплексів молекул плазміногенового походження, які виявляють ферментативну активність. Саме цей розділ містить найбільш оригінальні результати дисертаційної роботи. У восьмому розділі досліджено особливості функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом, які перенесли COVID-19. Показано, що постковідні зміни можуть посилювати наявні порушення гемостазу та сприяти підвищенню тромботичних ризиків у пацієнтів із хронічними захворюваннями. У розділі «Заключення» автор узагальнює отримані результати, формує цілісну концепцію розвитку постковідних порушень системи гемостазу та обґрунтовує можливу роль ковалентних комплексів антитіл із молекулами плазміногенового походження як одного з ключових механізмів підтримання гемостатичної дисфункції після перенесеної SARS-CoV-2-інфекції.

Текст дисертаційної роботи викладено у чіткому науковому стилі, відзначається логічною послідовністю викладення матеріалу, належним рівнем аргументації та коректним використанням сучасної наукової термінології. Робота добре структурована та ілюстрована достатньою кількістю рисунків і таблиць, які є інформативними та сприяють кращому сприйняттю й інтерпретації отриманих результатів. Аналіз дисертації та наведених публікацій дає підстави стверджувати про дотримання автором принципів академічної доброчесності. За змістом, методологічним рівнем виконання та спрямованістю досліджень дисертаційна

робота Карбовського В.Л. повністю відповідає паспорту спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Ідентичність реферату та основних положень дисертації. Автореферат у повному обсязі відображає матеріали дисертаційної роботи. Основні положення і висновки є ідентичними в дисертації та авторефераті. Дисертацію та реферат оформлено відповідно до вимог МОН України.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором вперше проведено комплексне дослідження системи гемостазу в осіб, які перенесли COVID-19, з урахуванням титру антитіл проти SARS-CoV-2. Встановлено, що для постковідного періоду характерним є тривале збереження дисбалансу між процесами коагуляції та фібринолізу, який супроводжується розвитком латентного протромботичного стану, хронічного низькорівневого запалення та порушенням протеолітичного гомеостазу. Особливої уваги заслуговують результати, пов'язані з виявленням нового, раніше не описаного механізму підтримання постковідних порушень гемостазу. Вперше експериментально доведено існування в кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, ковалентних комплексів між антитілами класу G та молекулами плазміногенового походження. Автором не лише встановлено факт їх наявності, але й доведено ковалентний характер взаємодії компонентів, охарактеризовано їхній склад та функціональні властивості. Показано, що такі комплекси є не інертними утвореннями, а функціонально активними структурами, здатними впливати на перебіг процесів коагуляції, фібринолізу та протеолізу. Принципово новим є сформульоване та експериментально обґрунтоване положення про те, що нетипові білок-білкові взаємодії та накопичення в кровотоці ковалентних комплексів можуть бути одним із ключових механізмів тривалого збереження порушень системи гемостазу після перенесеної SARS-CoV-2-інфекції. Запропонована концепція суттєво розширює сучасні уявлення про патогенез постковідного синдрому та відкриває новий напрям досліджень, пов'язаний із роллю ковалентних імунобілкових комплексів у регуляції гемостатичних процесів. Крім того, вперше досліджено особливості функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом, які перенесли COVID-19. Встановлено наявність у них ковалентних комплексів, утворених між антитілами та білками плазміногенового і протромбінового походження, а також показано зростання їхнього рівня після перенесеної інфекції, що свідчить про можливу участь цих структур у підтриманні постковідних порушень гемостазу в осіб із хронічними захворюваннями. Таким чином, отримані результати мають безперечну наукову новизну, розширюють фундаментальні уявлення про механізми функціонування системи гемостазу у постковідний період та формують підґрунтя для пошуку нових діагностичних маркерів і терапевтичних підходів до корекції постковідних ускладнень.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення одержаних результатів полягає у розширенні можливостей лабораторної діагностики, прогнозування та моніторингу порушень системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19. Отримані дані дозволили встановити комплекс молекулярно-біохімічних показників, зміни яких асоціюються з розвитком постковідного прокоагуляційного стану та можуть бути використані для оцінки

ризик тромботичних ускладнень у реконвалесцентів. Визначені взаємозв'язки між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та параметрами ланок системи гемостазу і протеолізу створюють підґрунтя для впровадження персоналізованих підходів до лабораторного супроводу пацієнтів у постковідний період. Особливу практичну цінність становлять результати щодо виявлення та характеристики ковалентних комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження. Встановлено можливість їх використання як нових перспективних маркерів порушень гемостатичного гомеостазу та постковідного протромботичного стану. Отримані результати можуть бути основою для розробки нових діагностичних підходів, спрямованих на раннє виявлення осіб із підвищеним ризиком тромботичних ускладнень та оцінку ефективності профілактичних і лікувальних заходів. Практичне значення мають також результати дослідження особливостей функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом, які перенесли COVID-19. Виявлені закономірності можуть бути використані для вдосконалення алгоритмів клінічного спостереження та стратифікації ризиків у пацієнтів із хронічними неінфекційними захворюваннями. Основні результати дисертаційної роботи впроваджено в практичну діяльність медичного центру «Андроцентр» (м. Обухів), медичного центру «Біомед» (м. Київ) та ТОВ «Медбуд-Клінік» (м. Київ), де вони використовуються при розробці персоналізованих підходів до ведення пацієнтів із розсіяним склерозом та хронічним коронарним синдромом, які перенесли COVID-19, а також для моніторингу показників системи гемостазу та оцінки ризику тромботичних ускладнень.

Ступінь обґрунтованості і вірогідності наукових досліджень та висновків дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Карбовського В.Л. виконана на високому науково-методичному рівні та характеризується належним ступенем обґрунтованості й вірогідності отриманих результатів. Це свідчить про ґрунтовну теоретичну підготовку здобувача, його вміння формувати наукові гіпотези, планувати експериментальні дослідження та здійснювати комплексний аналіз одержаних даних. Достовірність наукових положень і висновків дисертаційної роботи забезпечується достатнім обсягом експериментального матеріалу, використанням сучасних методичних підходів, адекватних поставленим завданням, а також застосуванням сучасного лабораторного обладнання. Дослідження виконані з використанням широкого спектра біохімічних методів, що взаємно доповнюють один одного та дозволяють комплексно оцінити стан системи гемостазу у постковідний період. У роботі використано хроматографічні методи для очищення та характеристики білкових фракцій і комплексів антитіл з білками плазми крові, електрофоретичні методи та ензим-електрофорез для оцінки молекулярної маси білків і виявлення протеолітичної активності, імуноферментний аналіз для визначення вмісту цитокінів, матриксних металопротеїназ, факторів клітинної відповіді та компонентів системи гемостазу, а також коагуляційні та функціональні тести для оцінки стану коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу. Важливою перевагою роботи є використання взаємодоповнюючих методичних підходів, зокрема афінної хроматографії, вестерн-блот аналізу та методів визначення ферментативної активності, що

дозволило автору отримати переконливі докази існування та функціональної активності ковалентних комплексів антитіл з молекулами плазміногенового походження. Статистична обробка результатів проведена із застосуванням сучасних методів математичного аналізу, адекватних характеру отриманих даних та обсягу вибірок, що додатково підтверджує достовірність отриманих результатів і сформульованих висновків. У цілому наведені у дисертації наукові положення, висновки та практичні рекомендації є достатньо обґрунтованими, логічно впливають з отриманих результатів і не викликають сумнівів щодо їх вірогідності.

Повнота викладення основних наукових результатів роботи та апробація дисертації в опублікованих працях. Основні результати дисертаційного дослідження висвітлено у 21 науковій публікації, серед яких 12 статей опубліковано у наукових виданнях, що індексуються в міжнародній наукометричній базі Scopus, у тому числі 1 стаття – у виданні, віднесеному до квартилю Q2, та 2 та 9 статей – у виданнях квартилів Q3 і Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal & Country Rank. Крім того, результати дослідження опубліковано у 9 статтях у наукових фахових виданнях України та апробовано у 7 тезах доповідей на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях.

Не зважаючи на загальну позитивну оцінку дисертації під час ознайомлення з роботою виникли деякі запитання дискусійного характеру та зауваження:

1. Які на Вашу думку молекулярні механізми обумовлюють тривале підвищення рівня фібриногену як гострофазового білка у пацієнтів із постковідним синдромом, і як цей хронічний запальний статус може впливати на ендотеліальну функцію та ризики тромбоутворення?

2. Яка на Вашу думку роль патологічних білкових структур, а саме модифікованого фібриногену, зокрема, їх можливість взаємодії з рецепторами при утворенні фібриноїдів «амілоїдоподібних мікрозгустків» (amyloid-like microclots), які утворюються у постковідному синдромі?

3. Чи аналізували Ви відмінність між хронічно підвищеним фібриногеном у постковідному синдромі і його класичною гострофазовою відповіддю під час гострої інфекції, і чи може даний білок використовуватися як біохімічний маркер системного низькоінтенсивного запалення у хворих?

4. Які молекулярні механізми синергічної взаємодії тромбоцитів і плазміногену здатні регулювати гемостаз? Чи є відмінності у такій регуляції між постковідним синдромом та фізіологічною нормою?

5. Яку роль відіграють матриксні металопротеїнази у гемостазі з постковідним синдромом, оскільки не виявлено залежності від титру антитіл до SARS-CoV-2 (Рис. 5.1., Рис. 5.2.)?

6. Згідно результатів представлених на Рис. 3.1. час зсідання плазми крові - Індекс (S/C) в описі відмічено статистичну різницю при титрі антитіл проти SARS-CoV2 75 (4 стовпчик), а на рисунку позначено при 55 (3 стовпчик). Хоча вірогідним є показник при титрі антитіл 10 (2 стовпчик).

7. Які біохімічні маркери є інформативними у діагностиці для попередження негативних наслідків у системі гемостазу за постковідного синдрому?

Однак вказані зауваження не зменшують наукової значущості і практичної цінності результатів дисертаційної роботи Карбовського В.Л.

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 зі спеціальності 03.00.04 – біохімія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
завідувач кафедри фізіології,
біохімії рослин та біоенергетики
Національного університету біоресурсів
і природокористування України

Світлана ПРИЛУЦЬКА

