

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА,
доктора медичних наук, професора кафедри
кафедри мікробіології, вірусології та імунології
Тернопільського національного медичного університету
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
Камишного Олександра Михайловича
на дисертаційну роботу аспіранта
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України
Дубровського Євгена Ігоровича
«Молекулярно-генетичні та імунні механізми важкого перебігу
коронавірусної хвороби (COVID-19)»
подану до спеціалізованої вченої ради ID PhD 7451
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України
на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 "Медицина"

Актуальність обраної теми

Дослідження, проведене у дисертаційній роботі Дубровського Є.І. є актуальним і відповідає сучасним викликам медичної науки та практики. Пандемія COVID-19 продемонструвала, наскільки критичним є своєчасне прогнозування тяжкого перебігу хвороби, особливо серед пацієнтів із коморбідними станами, такими як ожиріння та цукровий діабет. Відомо, що гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС) є однією з основних причин ускладнень, пов'язаних із COVID-19, але існуючі прогностичні маркери часто виявляються недостатньо чутливими та специфічними. Вивчення таких молекулярних механізмів, як утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs), роль гіалуронової кислоти в інтерстиційному запаленні легень та її регуляції за участі довгих некодуючих РНК, а також взаємозв'язок експресії транскрипційного фактора HIF із гіпоксичними процесами, є надзвичайно важливим. У дослідженні зроблено спробу вперше інтегрувати ці механізми в єдину модель патогенезу COVID-19, що може мати вагоме значення для розвитку комплексних підходів до терапії респіраторних інфекцій та завчасному виявленню прогностично важких пацієнтів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках відомчої теми НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України № III-10-19: «Значення довгих некодуючих РНК в механізмах розвитку експериментальної та клінічної патології» (державний реєстраційний номер — 0118U007348, 2019-2023 рр.) за цільовою програмою «Підтримка пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) розробок

відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України (реєстраційний номер 0120U101281, 2021р.).

Науковий рівень роботи

Дисертація Дубровського Є.І. є завершеним науковим дослідженням, яке відзначається високим рівнем наукової новизни, чіткою структурою та логічним обґрунтуванням. Робота виконана з використанням сучасних методів, що дозволило отримати значну кількість достовірних результатів. Здобувачем продемонстровано ґрунтовне володіння методологією досліджень та глибоке розуміння актуальної наукової проблематики.

Дисертація написана чіткою та зрозумілою мовою, структура роботи включає всі необхідні розділи, що логічно взаємопов'язані. Огляд літератури охоплює сучасні джерела та містить аналіз останніх досліджень у галузі патогенезу COVID-19 та інших респіраторних захворювань, пов'язаних із гіпоксією.

Наукова новизна отриманих результатів

У дисертації було встановлено, що рівень утворення NETs у нейтрофілах пацієнтів з COVID-19 суттєво корелює з тяжкістю перебігу захворювання. Визначено, що підвищення рівня позаклітинної ДНК (пкДНК) та нейтрофільної мієлопероксидази (МПО) у плазмі крові є надійними прогностичними маркерами важкого перебігу COVID-19. Побудовані ROC-криві підтверджують ефективність цих маркерів для раннього прогнозування.

Дослідження довгих некодуючих РНК, таких як HAS2-AS1 та HIF1-AS1, стало унікальним аспектом роботи. Вперше показано, що рівень експресії HAS2-AS1 в лейкоцитах крові значно зростає у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19, а також є більш чутливим показником, ніж рівень гіалуронової кислоти в плазмі.

Дослідження експресії HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α продемонструвало різні патерни їх активації у пацієнтів із різною тяжкістю перебігу COVID-19. Співвідношення між цими ізоформами може вказувати на механізми адаптації або порушення відповіді на гіпоксію та використовуватися як маркер тяжкості захворювання.

Практичне значення роботи

Отримані результати мають значний потенціал для клінічного використання. Визначення рівнів позаклітинної ДНК та мієлопероксидази у плазмі крові може стати доступним та ефективним методом прогнозування не тільки тяжкого перебігу COVID-19, але й інших респіраторних захворювань, які супроводжуються ГРДС, що особливо важливо в умовах обмежених ресурсів. Включення додаткових маркерів, таких як HAS2-AS1 та HIF1-AS1, дозволяє суттєво покращити точність діагностики

та моніторингу захворювання. Результати дослідження сприятимуть оптимізації лікування та мінімізації ризиків для пацієнтів із групи ризику.

Ступінь обґрунтованості висновків

Мета дослідження логічно пов'язана із завданнями роботи, а отримані результати є достатніми для їхнього вирішення. Використані методи дослідження є сучасними та адекватними поставленій меті. Застосовані статистичні підходи дозволяють об'єктивно підтвердити отримані висновки.

Оцінка змісту, оформлення й обсягу дисертації

Дисертаційна робота викладена українською мовою на 164 сторінках друкованого тексту, структурована відповідно до класичних вимог і містить усі необхідні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи, власні результати з їх обговоренням, висновки та список використаних джерел, який включає 203 найменування. **Анотація** роботи точно відображає її основний зміст, а ключові слова повністю узгоджуються зі змістом.

Огляд літератури охоплює три тематичні підрозділи, у яких детально розглядаються патогенетичні механізми утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs), роль гіалуронової кислоти та її накопичення у респіраторних захворюваннях, а також вплив фактору HIF на гіпоксичні реакції при COVID-19. У процесі аналізу були розглянуті численні дослідження цих параметрів при інших захворюваннях, встановлено їхній потенційний взаємозв'язок у патогенезі COVID-19 та обґрунтовано можливість використання цих показників як прогностичних маркерів тяжкого перебігу хвороби. Окрема увага приділена недостатньо дослідженій ролі довгих некодуєчих РНК, зокрема HAS2-AS1 та HIF1A-AS1, у розвитку коронавірусної хвороби, що вказує на перспективність подальших досліджень їхньої прогностичної цінності для ранньої діагностики та прогнозування.

Мета і завдання дослідження чітко сформульовані та логічно пов'язані між собою. Об'єкт і предмет дослідження відповідають сформульованій меті, а використані методи є сучасними, релевантними для вирішення поставлених завдань і детально описані в роботі.

Розділ з **результатами досліджень** включає опис клінічних груп пацієнтів, результати клінічних, лабораторних, морфологічних і молекулярно-генетичних досліджень, проведених на біологічному матеріалі (зразки крові) хворих на COVID-19. Отримані дані представлені у вигляді трьох підрозділів, супроводжуються рисунками та таблицями з чіткими підписами і відповідною статистичною обробкою. Унікальність роботи підтверджується вперше отриманими даними щодо експресії довгих некодуєчих РНК HAS2-AS1 та HIF1A-AS1 і різних ізоформ транскрипційного фактору HIF у лейкоцитах пацієнтів із різною тяжкістю COVID-19. Також

встановлено кореляції між рівнями позаклітинної ДНК, мієлопероксидази, гіалуронової кислоти та важкістю перебігу хвороби. Ці результати дозволяють розглядати зазначені показники як перспективні інструменти для клінічного моніторингу хворих на респіраторні захворювання, що супроводжуються ГРДС.

У **заключному розділі** проведено детальний аналіз отриманих результатів з урахуванням сучасних наукових даних, що дозволило створити комплексну картину взаємозв'язків досліджуваних параметрів і механізмів їхнього впливу на розвиток ускладнень при COVID-19. Автор також запропонував схематичну модель виявлених механізмів.

Висновки логічно пов'язані з метою роботи, повністю розкривають поставлені завдання та узагальнюють ключові результати дослідження.

Повнота оприлюднення та публікації результатів дисертації

За темою дисертації опубліковано 8 наукових праць, з них 4 статті та 4 тез доповідей. Всі статті опубліковані в журналах, які представлені у базі даних Scopus (Q4). Тези опубліковані в матеріалах проведених конференцій.

Особистий внесок здобувача

Спільно з науковим керівником визначені ключові напрямки, мета і завдання дослідження, дизайн, обрані методи дослідження, сформульовані висновки і практичні рекомендації. Автор самостійно проаналізував сучасну наукову літературу, приймав участь у проведенні усіх досліджень, здійснив первинну обробку результатів досліджень, сформував електронну базу даних, статистично опрацював результати. Разом із співавторами написав та оформив наукові публікації.

Перевірка на наявність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності

Проведена уповноваженим органом Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України і показала відсутність ознак академічного плагіату, самоплагіату, фабрикації, фальсифікації; текст представлених матеріалів дисертації є оригінальним та не містить порушень академічної доброчесності, про що видана довідка встановленого зразку.

Відповідність дисертації спеціальності та профілю спецради

Дисертація відповідає паспорту спеціальності «Медицина» і профілю одноразової спеціалізованої вченої ради.

Зауваження та питання

При ознайомленні з роботою у мене виник ряд зауважень і обмежень щодо обраних автором підходів:

1. У дослідженні не зазначено інформацію про інші можливі супутні патології, які також могли впливати на перебіг COVID-19 та лабораторні показники. Не зазначені критерії включення і виключення в дослідження.
2. Зразки крові збиралися під час однієї хвилі пандемії (2020-2021 рр.), і результати можуть не враховувати змін, пов'язаних з новими штамми SARS-CoV-2 або зміненими стандартами лікування. Так само і динаміка COVID-19 може впливати на формування NETs, залежно від стадії хвороби на момент збору крові.
3. Тест-набір Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen) не дозволяє безпосередньо розрізнити еукаріотичну та бактеріальну позаклітинну ДНК. Його основна функція – кількісне визначення дволанцюгової ДНК (dsDNA) у зразках незалежно від її походження. Тим більше, він не може дати відповідь на питання - ця ДНК з нейтрофілів чи з інших клітин – лімфоцитів, моноцитів та інших? Таким чином, цей тест є корисним для загального кількісного визначення дволанцюгової ДНК, але для розрізнення її походження потрібні додаткові специфічні методи.
4. Використання лише форбол-12-міристат-13-ацетату (PMA) для визначення рівня індукovanого NETозу може не відображати фізіологічні умови, у яких NETоз ініціюється іншими патогенами або ендогенними факторами. Наприклад, бактеріальні або вірусні компоненти (LPS, патогенні ДНК/РНК) можуть викликати NETоз через альтернативні шляхи. Не зазначено, чи проводили інкубацію з нейтрофілами у присутності ROS-інгібіторів NETозу для верифікації, що PMA-індукований NETоз дійсно залежить від ROS.
5. Методика вимірювання концентрації мієлопероксидази (МПО) у плазмі крові за допомогою ELISA є цінним інструментом для оцінки активності нейтрофілів, однак підвищення рівня МПО у плазмі може відображати загальну активацію нейтрофілів, але не є специфічним для NETозу, оскільки МПО також може вивільнятися при інших формах активації чи загибелі нейтрофілів (наприклад, при дегрануляції). Крім того, тут відсутній контекст NETозу: МПО у плазмі не дозволяє диференціювати, чи є її підвищення є результатом утворення NETs, дегрануляції або загибелі клітин (апоптозу чи некрозу). Хоча МПО головним чином продукується нейтрофілами, її невеликі кількості можуть синтезуватися моноцитами, що також може вплинути на результати. Виявлення комплексів МПО-ДНК було б більш корисним. Те саме, відноситься і до вимірювання рівня нейтрофільної еластази в плазмі крові.

6. Лабораторні показники пацієнтів із коморбідними станами надаються лише на момент поступлення, тоді як бажано – в динаміці, щоб оцінити ефекти до- і після лікування.

Висловлені зауваження не є критичними і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Також, хочу почути думку автора на такі запитання:

1. Якщо коронавіруси як внутрішньоклітинні патогени здатні проникати безпосередньо в нейтрофіли, то який біологічний сенс у формуванні NETs в патогенезі COVID-19?
2. Здатність до вивільнення позаклітинних пасток (NETs), які містять ДНК, було виявлено в різних популяціях клітин, залучених як у вроджену, так і в адаптивну імунну відповідь – це не лише нейтрофіли, а й макрофаги, лімфоцити, тучні клітини, еозинофіли, базофіли, плазмоцитоїдні дендритні клітини. Враховуючи це, як ви ідентифікуєте, що ці пастки мають саме нейтрофільне походження?
3. Частина позаклітинної ДНК має не еукаріотичне походження. Як ви відрізняєте в своїй роботі еукаріотичну позаклітинну ДНК від бактеріальної?
4. Враховуючи, що NETs також можуть вивільнятися з живих клітин яким чином можна диференціювати два типи позаклітинних пасток — "суїцидальні" і "життєздатні", тобто з загибеллю клітини-продуцента або без неї?


Висновок про відповідність дисертації вимогам, які висуваються до наукового ступеня доктора філософії

Дисертаційна робота Дубровського Євгена Ігоровича «Молекулярно-генетичні та імунні механізми важкого перебігу коронавірусної хвороби (COVID-19)», подана на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина» є самостійною науковою працею, та відповідає вимогам, які висуваються до наукових праць на здобуття ступеня доктора філософії. Робота оформлена згідно з вимогами до оформлення дисертації, затвердженими Наказом Міністерства освіти та науки України від 12 січня 2017 р. № 40. За актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, методичним рівнем, теоретичним та практичним значенням, обсягом виконаних досліджень дисертація відповідає вимогам, передбаченим «Порядком підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», затвердженим постановою Кабінету Міністрів України від 23 березня

2016 року №261 (зі змінами і доповненнями від 3 квітня 2019 року №283, від 23 травня 2023 року №502 та від 3 травня 2024 року №507) та «Порядком присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженим Постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44 (зі змінами згідно з Постановою Кабінету Міністрів України від 21 березня 2022 р. №341, від 19 травня 2023 року №502 та від 3 травня 2024 року №507), вимогам до опублікування результатів дисертацій, а її автор, Дубровський Євген Ігорович, заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії в галузі знань «22 - Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина».

Офіційний опонент:

доктор медичних наук,
професор кафедри мікробіології,
вірусології та імунології
Тернопільського НМУ імені
І.Я. Горбачевського МОЗ України

 Олександр КАМИШНИЙ

Особистий підпис 
завіряю
Заступник ректора з кадрових питань
Тернопільського національного
медичного університету
