

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

профессора, доктора медицинских наук И.Ю. Малышева на диссертацию Шкурникова Максима Юрьевича «Роль генотипа главного комплекса гистосовместимости класса I и профиля микроРНК в патогенезе тяжелой и крайне тяжелой форм COVID-19», представленную на соискание учёной степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология

Актуальность избранной темы

Пандемия COVID-19, пришедшая в Российскую Федерацию в начале 2020 года, продемонстрировала необходимость в глубоком понимании патогенеза данного заболевания, потребность в разработке и внедрении в клиническую практику новых подходов к оценке риска развития его тяжелых форм. Данные запросы делают особенно заметными актуальность и практическую значимость темы диссертационного исследования Шкурникова М.Ю. В условиях стремительно развивавшейся пандемии старые подходы к прогнозу тяжести течения вирусной пневмонии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, в значительной степени утратили свою актуальность. Потребовалось более глубокое понимание индивидуальных особенностей формирования иммунитета к COVID-19. На потребности клинической медицины должны откликаться отечественные патофизиологи. Требуется более точный теоретический и методологический инструментарий патофизиологического обоснования тактики ведения пациентов. Особенно остро это ощущается при принятии решений в момент возникновения первых симптомов COVID-19 у пациентов, ранее не болевших данным заболеванием, в условиях ограниченных ресурсов системы здравоохранения. Этим объясняется тот факт, что избранная тема диссертации Шкурникова Максима Юрьевича, посвященная решению научно-практической проблемы установления роли генотипа главного комплекса гистосовместимости класса I и профиля микроРНК в патогенезе тяжелой и крайне тяжелой форм COVID-19 представляется актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, которые содержатся в диссертации, подтверждается внутренней непротиворечивостью результатов и логической целостностью работы, использованием значительного объема эмпирического материала, широкого представительства анализируемых научных публикаций и не вызывающих сомнения результатов исследований отечественных и зарубежных авторов. Всего по теме диссертации было проанализировано 419 источников.

Разработки соискателя базируются на основополагающих принципах молекулярной биологии, теории патогенеза. В исследовании были использованы сплошной и выборочный способы проведения наблюдения. Были обоснованно применены адекватные методы статистического анализа, математического

моделирования, клинического обследования, секвенирования следующего поколения, генотипирования ГКГС-I, оценки Т-клеточного ответа.

Соискателем проведена апробация результатов исследования на всероссийских и международных научных конференциях и в научных публикациях, верификация полученных теоретических результатов на данных пациентов, перенесших COVID-19. Всего по теме исследования было опубликовано 23 печатные работы, в том числе 18 статей в научных журналах и изданиях, входящих в международные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science, три патента на изобретения, одни клинические рекомендации, одно свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Таким образом, можно сделать вывод, что научные положения, выводы и рекомендации, которые содержатся в диссертации Шкурникова М.Ю., являются в достаточной степени обоснованными и достоверными.

Научная новизна и научно-практическая значимость исследования, и достоверность полученных результатов

Диссертация Шкурникова М.Ю. направлена на развитие представлений о роли генотипа главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГС-I) и профиля микроРНК пациентов в патогенезе тяжелой и крайне тяжелой форм новой коронавирусной инфекции COVID-19 для оптимизации оценки тяжести и прогноза течения заболевания. Для достижения данной цели автором были поставлены и решены задачи исследования, полученные решения нашли свое отражение в научных результатах, которые содержат элементы научной новизны.

Научные результаты, выносимые на защиту, их научная новизна и личный вклад автора раскрыты в следующих положениях, представленных в формулировках автора, с которыми можно согласиться.

1) Впервые установлено, что у пациентов в возрасте до 60 лет с вирусной пневмонией, вызванной двумя наиболее распространенными вариантами штамма Дельта SARS-CoV-2, в случае инфицирования вариантом AY.122 число высокоаффинных для их индивидуального набора молекул ГКГС-I пептидов вируса SARS-CoV-2 значительно сократилось по сравнению с инфицированием вариантом B.1.617.2.

2) Впервые продемонстрировано, что среди госпитализированных в третью волну пандемии COVID-19 пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, значительно снижено число носителей аллеля HLA-A*01:01 ГКГС-I. Установлено, что носители аллеля HLA-A*01:01 формируют Т-клеточный иммунитет к пептидам, кодируемым геном ORF1ab вируса SARS-CoV-2.

3) Продемонстрирована более высокая частота встречаемости иммунодоминантных эпитопов из белков гена ORF1ab вируса SARS-CoV-2 у носителей HLA-A*01:01 по сравнению с эпитопами из белков этого гена у носителей HLA-A*02:01 в когорте выздоровевших пациентов первой волны COVID-19.

4) Впервые на основании исследования взаимосвязи генотипа ГКГС-I с тяжестью течения заболевания у пациентов с вирусной пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, продемонстрирована взаимосвязь вероятности летального исхода заболевания и числа пептидов вируса SARS-CoV-2, высокоаффинных для индивидуального набора молекул ГКГС-I пациента.

5) Впервые изучено возможное влияние микроРНК ткани лёгких на эволюцию генома вируса SARS-CoV-2. Показано, что 5p- и 3p-нетранслируемые области вируса SARS-CoV-2 практически не имеют регионов связывания с характерными для ткани лёгких микроРНК.

6) Впервые выявлен механизм регуляции экспрессии генов ACE2 и TMPRSS2 человека молекулами микроРНК. Показано, что лизин-специфическая деметилаза 5B (JARID1B), кодируемая геном KDM5B, может опосредованно влиять на экспрессию ACE2/TMPRSS2 путем репрессии транскрипции hsa-let-7e/hsa-miR-125a и hsa-miR-141/hsa-miR-200. Впервые продемонстрирована взаимосвязь уровня циркулирующих в плазме крови микроРНК hsa-miR-25-3p и hsa-miR-19b-3p с крайне тяжелым течением COVID-19.

7) Впервые показано, что мутации вируса SARS-CoV-2 практически не затрагивают иммунодоминантные для российской популяции пептиды вируса SARS-CoV-2.

8) Впервые разработан и апробирован патогенетически обоснованный алгоритм диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I пациента.

Полученные в ходе исследования новые научные данные вносят вклад в углубление фундаментальных знаний о патогенезе новой коронавирусной инфекции COVID-19 с позиции обоснования роли ГКГС-I и микроРНК в формировании специфического иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, а также развития и стойкости постинфекционного иммунитета.

Полученные результаты по зависимости Т-клеточного ответа на вирус SARS-CoV-2 от генотипа ГКГС-I могут стать основой для создания высокоэффективных вакцин на основе пептидов, кодируемых регионом ORF1ab генома вируса.

Практическая значимость заключается в том, что разработанные в процессе исследования и научно обоснованные патофизиологические подходы к анализу индивидуальных особенностей генотипа ГКГС-I пациентов позволят совершенствовать прогноз развития тяжелых и крайне тяжелых форм COVID-19, а значит более эффективно оказывать медицинскую помощь в условиях продолжающейся эпидемии и в периоды ее повторного возникновения.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности в целом

Поставленная цель и задачи исследования определили логику проведения исследования и изложения результатов, структуру диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных результатов и их обсуждения, выводов,

заклучения, списка используемых сокращений и списка использованной литературы, приложения. Работа изложена на 216 страницах и содержит 32 рисунка, 20 таблиц и 419 литературных ссылок.

Изложение научной работы представляет логически обоснованную последовательность решения задач исследования и представления решений как научных результатов в виде научных положений, выводов и рекомендаций, обладающую внутренним единством и отличающейся аргументированностью, высокой степенью детализации и визуализации излагаемого материала.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, корректно сформулированы цель и задачи, определены объект и предмет исследования, методология исследования, теоретическая и практическая значимость выполненной работы, приведены основные научные результаты, сведения об апробации.

В первой главе представлен литературный обзор. Обзор посвящен современным представлениям патогенеза COVID-19, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2; формирования иммунитета к SARS-CoV-2. Представляют интерес данные о врожденном иммунитете в борьбе с SARS-CoV-2, приобретенном иммунитете к SARS-CoV-2. Приведены данные о роли ГКГС-I в формировании противовирусного иммунитета, роли микроРНК в противовирусном иммунитете. Важными являются сведения о молекулярно-генетических особенностях SARS-CoV-2. Клинически значимыми являются оценка факторов прогноза тяжести течения COVID-19, роль демографических факторов риска и метаболических заболеваний.

Вторая глава посвящена описанию материалов и методов исследования. В ней представлены программа и основные этапы, материалы и методы исследования. Кроме того, в главе представлен методический опыт оценки роли циркулирующих микроРНК.

Глава три посвящена описанию методических основ оценки тяжести течения COVID-19 в зависимости от генотипа ГКГС-I, варианта вируса SARS-CoV-2. Разработанный способ оценки риска развития тяжелой формы COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I продемонстрировал более высокую точность прогнозных оценок течения COVID-19 по сравнению со способом-прототипом, что является важным для выбора тактики лечения пациента. Данный способ был реализован в форме программного обеспечения «Аффисенс» для клинической оценки риска развития тяжелой формы течения коронавирусной инфекции COVID-19, получено свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Глава четыре посвящена исследованию мутаций SARS-CoV-2 и их взаимосвязи с тяжестью течения COVID-19. Анализ результатов одноклеточного фенотипирования Т-клеток у выздоровевших пациентов показал, что преобладающим фенотипом у носителей HLA-A*01:01 являются Т-клетки центральной памяти. Сделан вывод, что преобладание Т-лимфоцитов данного

фенотипа может способствовать формированию длительного Т-клеточного иммунитета у носителей данного аллеля. Полученные результаты могут стать основой для создания высокоэффективных вакцин на основе пептидов ORF1ab.

Глава пять посвящена определению роли микроРНК в патогенезе COVID-19. Показано, что (+)РНК вирусы способны эволюционировать под влиянием микроРНК клеток-хозяина. Также была изучена роль циркулирующих микроРНК в прогнозе исхода COVID-19.

Сделано заключение, что у пациентов, выздоровевших после крайне тяжелой формы COVID-19, в плазме крови значимо повышен уровень miR-19b-3p. Данная микроРНК представлена в плазме крови в значимых количествах и способна связываться с регионами SARS-CoV-2, кодирующими белки, подавляющие внутриклеточные механизмы иммунитета. Показано, что микроРНК способна стимулировать функциональную активность и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов – одного из ключевых компонентов адаптивного клеточного иммунитета против SARS-CoV-2. На основании вышеизложенного сделано заключение, что результаты исследования могут быть использованы при разработке противовирусных препаратов на основе РНК-интерференции, а также при разработке прогностических тест-систем для оптимизации тактики лечения пациентов с COVID-19.

Глава шесть посвящена разработке и проверке клинической значимости патогенетически обоснованного алгоритма диагностических мероприятий для прогноза тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 на основе анализа генотипа ГКГС-I. Доказана эффективность разработанного на основе полученных в исследовании данных подхода к диагностике и прогнозу тяжести COVID-19.

Следует отметить, что автор в конце каждой главы делал резюме, посвященное проведенному исследованию с выделением наиболее важных полученных результатов и их обсуждением.

В заключении автор кратко проводит анализ представленного исследования с приведением наиболее значимых результатов по каждой задаче. В итоге представлены концептуальные, патогенетические схемы, отражающие патогенетический вклад генотипа ГКГС-I в COVID-19 средней, тяжелой и крайне тяжелой степеней тяжести.

Принципиальных замечаний по содержанию диссертации нет. Имеющиеся стилистические неточности и немногочисленные орфографические ошибки не имеют принципиального значения и не уменьшают значимость исследования.

При общей положительной оценке диссертационного исследования Шкурникова М.Ю. следует отметить ряд дискуссионных вопросов:

- 1) Почему автором анализируется только генотип ГКГС-I, хотя известно, что за формирование нейтрализующих антител к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2 в значительной степени отвечают молекулы ГКГС-II?

2) Автором разработан способ прогноза развития тяжелой формы COVID-19. Хотелось бы понять, на сколько этот метод применим в условиях инфекционного отделения больницы, прежде в сего в силу необходимости применения NGS секвенирования?

Заключение

Диссертационное исследование Шкурникова Максима Юрьевича на тему «Роль генотипа главного комплекса гистосовместимости класса I и профиля микроРНК в патогенезе тяжелой и крайне тяжелой форм COVID-19», представленная на соискание ученой степени доктора медицинских наук, является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований решена научная проблема – установлена роль генотипа главного комплекса гистосовместимости класса I и профиля микроРНК пациентов в патогенезе тяжелой и крайне тяжелой форм новой коронавирусной инфекции COVID-19 для оптимизации оценки тяжести и прогноза течения заболевания, имеющая важное социально-экономическое значение для Российской Федерации.

По актуальности решаемой проблемы, объёму и глубине выполненных исследований, качеству анализа полученных данных, доказательной научной и практической ценности выводов и практических рекомендаций диссертация полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Шкурников Максим Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени доктора медицинских наук по специальности 3.3.3. Патологическая физиология.

Официальный оппонент:

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Российский Университет Медицины» Минздрава России

Игорь Юрьевич Малышев

22 января 2024

Подпись Малышева И.Ю. заверяю:
Проф. д.м.н.



(Васюк Ю.А.)

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский Университет Медицины» Минздрава России, 127006, г.Москва, вн.тер.г.муниципальный округ Тверской, ул.Долгоруковская, д.4, тел.: +7 (495) 609-67-00, эл. почта: info@rosunimed.ru, <https://www.rosunimed.ru>