

## ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук Авдаляна Ашота Меружановича на диссертацию Одилова Акмалжона Адхамжоновича «Патоморфологическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование легких при COVID-19», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.2. – Патологическая анатомия

### Актуальность темы исследования

Пандемия COVID-19 стала причиной около 400 тысяч случаев смерти в Российской Федерации и более 6 млн случаев во всем мире. Основной причиной смерти пациентов стало развитие острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС), обусловленного SARS-CoV-2-ассоциированным поражением легких. Неуклонный рост числа смертей пациентов на фоне применения самой современной противовирусной и любой другой терапии делает актуальными более углубленное и комплексное исследование характера патоморфологических изменений и их возможную этиопатогенетическую связь с вирионами SARS-CoV-2.

Однако, верификация этиопатогенетической роли частиц SARS-CoV-2 в острых поражениях различных тканей, требует разработки новых адекватных способов не только детекции, но и количественной оценки уровня вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 в пораженных тканях легких и других жизненно важных органов. Тем не менее, большинство молекулярно-генетических исследований основано на выявлении рибонуклеиновой кислоты (РНК), а не самой частицы SARS-CoV-2. Более того, неоднозначность методики ПЦР (любого типа) для выявления РНК SARS-CoV-2 в гистологических препаратах, связанных с артефициальными, как положительными ввиду контаминации при фиксации в одной емкости и проводке в одном стейнере (чаще), так и отрицательными (значительно реже) результатами, тем более требует изменения концептуальности подхода в выявлении истинной инфицированности органов и систем. Иммуногистохимическая (ИГХ) детекция SARS-CoV-2 основана на выявлении специфичных белков коронавируса с использованием анти-spike и анти-нуклеокапсидных моноклональных антител (мкАт), но не самой частицы SARS-CoV-2. Это всё делает актуальным применение трансмиссионного электронно-микроскопического исследования для визуализации вирионов SARS-CoV-2 в пораженных клетках и тканях.

В настоящее время недостаточно хорошо изученным остается ряд вопросов, касающихся несовершенства молекулярно-генетических методов выявления РНК коронавируса и количественной оценки вирусной нагрузки (ВН) SARS-CoV-2 в тканях

различных органов. Также не установлена связь между уровнем ВН SARS-CoV-2 в легких и паттерном гистопатологических изменений легочной ткани при COVID-19. Не до конца раскрыты патогенетические механизмы внелегочного распространения частиц SARS-CoV-2. Более того практически отсутствуют сведения о частоте внелегочных диссеминаций и уровне ВН SARS-CoV-2 в тканях различных жизненно важных органов при COVID-19. Только комплексные патологоанатомическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследования тканей легких и других органов могут прояснить механизмы патогенеза и танатогенеза COVID-19.

С этой точки зрения, актуальность темы представленной диссертационной работы Одилова Акмалжона Адхамжоновича не вызывает никаких сомнений.

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

Обоснованность научных положений, выводов и практических рекомендаций, а также достоверность полученных результатов исследования вытекает из актуальности выбранной темы, четко поставленных цели и задач исследования, адекватного выбора когорты пациентов и биоматериалов, а также спектром комплексных исследований.

Для решения вопроса присутствия коронавируса SARS-CoV-2 в тканях легких и других органов, был разработан и синтезирован оригинальный набор олигодезоксирибонуклеотидов. Количественная оценка уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях различных органов была осуществлена с применением разработанных Одиловым А.А. и соавторами нового способа, признанного изобретением и защищенный патентом на изобретения RU 2761358 C1 от 07.12.2021 года. Для решения вопроса о штаммовой принадлежностью SARS-CoV-2 с активным участием диссертанта были разработаны девять пар оригинальных праймеров и проведено секвенирование по Сэнгеру нуклеотидной последовательности гена белка Spike коронавируса, результаты которого опубликованы в рецензируемом журнале первого квартала МБД Scopus и WoS. Результаты молекулярно-генетических исследований по выявлению РНК коронавируса и количественной оценки ВН SARS-CoV-2 в тканях легких и других органов дополнены проведением ИГХ исследований в тех же образцах тканей. При этом для ИГХ исследований диссертантом отобраны моноклональные антитела к Spike белку SARS-CoV-2, показавшие высокую специфичность и чувствительность в предыдущих исследованиях. Неоспоримость результатов молекулярно-генетических и ИГХ исследований, основанных на выявлении РНК и белков SARS-CoV-2 достигнута применением трансмиссионной электронной микроскопии в целях визуализации самой частицы коронавируса SARS-CoV-2 в тех же образцах тканей. В

результате настоящего исследования впервые в мире удалось получить электронную микрофотографию частиц коронавируса в цитоплазме лимфоцита в капилляре в легких. Диссертантом проведена корректная статистическая обработка полученных результатов с обоснованием методов обработки. Все это позволяет считать результаты исследования достоверными, а научные положения, выводы и практические рекомендации обоснованными. Результаты исследовательской работы отражены в 10 опубликованных печатных работах. Также, результаты исследования доложены на конференциях различного уровня, включая международные.

### **Новизна полученных результатов**

Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений. Впервые созданы набор синтетических олигодезоксирибонуклеотидов и генно-инженерная конструкция на основе плазмидного вектора со встроенным участком кДНК SARS-CoV-2 и участком кДНК ABL1. Разработанные набор реагентов и способ количественной оценки ВН SARS-CoV-2 признаны изобретением и защищены патентом RU 2761358 C1 от 07.12.2021 года. В рамках диссертационной работы впервые осуществлена количественная оценка уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях различных органов оригинальным способом, отличающимся тем, что истинная копия кДНК SARS-CoV-2 и ABL1 вычисляется относительно стандартной кривой, построенной на основе серийных разведений плазмидного вектора со встроенным участком кДНК SARS-CoV-2 и участком кДНК ABL1, а вирусная нагрузка выражается числом копий кДНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена ABL1. Сравнение результатов молекулярно-генетических и гистоморфологических исследований впервые наглядно подтверждает наличие сильной прямой корреляционной связи между уровнем ВН SARS-CoV-2 в очагах поражения легочной ткани и характером гистопатологических изменений в данном участке ткани легких пациентов с COVID-19. В диссертационном исследовании впервые представлены убедительные данные об отсутствии прямой патогенетической связи между значениями уровня ВН SARS-CoV-2 в тканях печени, сердца, почек и значениями биохимических маркеров их функциональной недостаточности. При электронно-микроскопических исследованиях впервые доказана возможность прямого инфицирования лимфоцита частицами SARS-CoV-2, что проливает свет на патогенетически обусловленные осложнения, связанные с иммунными реакциями.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Данное исследование одно из первых отечественных работ, глубоко рассматривающих непосредственную связь возбудителя с гистоморфологическими

нарушениями в тканях легких и других органов пациентов, умерших с COVID-19. Комплексное исследование ткани легких и других органов пациентов, умерших с COVID-19 с одномоментным использованием гистоморфологических, оригинального молекулярно-генетического исследования с количественной оценкой ВН SARS-CoV-2, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований, ранее не проводилось. Разработанный способ молекулярно-генетического исследования SARS-CoV-2 в тканях различных органов пациентов с COVID-19 значительно расширяет диагностический арсенал лабораторий, позволяя не только выявлять наличие, но и проводить количественную оценку уровня вирусной нагрузки. Значения уровня вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в легких, наряду с паттерном гистопатологических изменений в легких, могут использоваться в качестве прогностического маркера масштабов мульти-органной диссеминации коронавируса. Результаты иммуногистохимического исследования существенно дополняют имеющиеся данные о клеточном и тканевом тропизме коронавируса SARS-CoV-2. Электронно-микроскопическая визуализация коронавирусных частиц в эндотелиальных клетках различных органов проливает свет в патогенез тромбозов, часто развивающихся при COVID-19. Представленные электронно-микроскопические доказательства возможности прямого инфицирования лимфоцита коронавирусом SARS-CoV-2 позволит радикальным образом пересмотреть патогенез тяжелых лимфопений, способствующих развитию серьезных инфекционных осложнений при COVID-19.

#### **Соответствие диссертации паспорту специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.3.2. – Патологическая анатомия.

#### **Полнота освещения результатов диссертации в печати**

По теме диссертационной работы опубликовано 10 научных работ, 4 из которых в рецензируемых журналах, входящих в МБД Scopus и WoS, 1 – в издании из перечня РУДН. Получена 1 патент на изобретение (RU 2761358 C1 от 07 декабря 2021 г.). Также, результаты исследования освещены на научных конференциях различного уровня с опубликованием результатов в сборниках конференций. Все опубликованные автором работы соответствуют проблематике диссертации.

#### **Структура и содержание диссертации**

Диссертация Одилова А.А. построена по классическому образцу. Диссертация состоит из введения, глав: обзора литературы, материалы и методы, результатов собственных исследований, главы с обсуждением полученных результатов, заключения,

выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Текст изложен на 122 страницах, иллюстрирован 8 таблицами и 39 рисунками. Список литературы включает 194 источников, из них 12 отечественных и 182 иностранных.

Во **«Введении»** автор показал актуальность исследуемой проблемы, научную новизну, практическую значимость исследуемой проблемы, поставленные цели и задачи исследования, положения, вынесенные на защиту.

В главе **«Обзор литературы»** представлены обширные сведения о возникновении и распространении пандемии COVID-19, строении генома, филогенезе и классификации SARS-CoV-2. Достаточно широко рассматривается характер SARS-CoV-2 ассоциированных патоморфологических изменений в легких. Большая часть главы посвящена анализу технических возможностей, преимуществ и недостатков молекулярно-генетических исследований различных биообразцов пациентов, умерших с COVID-19. Прочтение данной главы позволяет получить четкое представление об исследовательском потенциале иммуногистохимических исследований тканей на предмет присутствия частиц коронавируса SARS-CoV-2. Также в данной главе представлен анализ литературных данных, касающихся специфичности и чувствительности ранее использованных моноклональных антител против различных белков SARS-CoV-2 в аутопсийных образцах тканей пациентов с COVID-19. Кроме того, в главе приведены подробные данные об электронно-микроскопических исследованиях тканей легких и других органов при различных коронавирусных инфекциях, включая SARS-CoV-2 при COVID-19. Литературный обзор, написанный диссертантом, позволяет получить полное представление о состоянии проблем, связанных с высокой смертностью пациентов, несовершенством используемых методов исследований и способствует созданию новой научной концепции, направленной на необходимость комплексного исследования патоморфологических изменений тканей легких и других органов пациентов, умерших с COVID-19.

Глава **«Материалы и методы»** содержит подробное описание материалов исследования и полную характеристику использованных современных методов исследования. Подробно описаны техника забора и пробоподготовка биоматериалов к стандартному гистологическому исследованию. Следует отметить широту исследовательского арсенала, состоящего из молекулярно-генетических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований. В данной главе описана техника пробоподготовки тканей и проведения ИГХ исследований с применением первичных МкАТ против S (spike) белка коронавируса SARS-CoV-2 компании «GeneTex» (клон 1A9, кат. №GTX632604), и кроличьих ПкАТ производства «Abcam» (кат. №ab272504). Важно подчеркнуть, что автором разработаны набор синтетических

олигонуклеотидов и новый способ расчета ВН SARS-CoV-2 в тканях различных органов, защищенные патентом на изобретение RU 2761358 C1 от 07 декабря 2021 г. Статистическая обработка полученных данных производилась на персональном компьютере в среде Microsoft Windows 10 с помощью программного обеспечения с открытым исходным кодом jamovi (версия 1.6).

**Третья глава** посвящена результатам собственных исследований диссертанта. Она состоит из пяти подразделов, посвященных общей характеристике пациентов и результатам патологоанатомических, молекулярно-генетических, иммуногистохимических и электронно-микроскопических исследований тканей легких и других органов пациентов, умерших с COVID-19. Результаты каждого исследования проиллюстрированы таблицами и рисунками. При этом каждый смысловой фрагмент главы содержит краткое обсуждение со сравнением собственных результатов с данными других исследований. Полученные автором результаты молекулярно-генетических исследований с использованием собственного способа оценки ВН SARS-CoV-2 в тканях легких показала, что уровень ВН может находиться в широком диапазоне и более высокие значения уровня ВН SARS-CoV-2 являются характерными для экссудативной фазы диффузно-альвеолярного повреждения (ДАП) в легких. Благодаря данному способу автору удалось доказать, что высокий уровень ВН и экссудативная фаза ДАП способствуют внелегочной диссеминации частиц коронавируса в жизненно важные органы, тяжелые дисфункции которых также внесли свой патогенетический вклад в танатогенез COVID-19. При этом автором показано отсутствие какой-либо патогенетической связи между уровнем ВН SARS-CoV-2 в тканях сердца, почек и печени с параметрами биохимических показателей их функциональной недостаточности. Диссертанту, при ИГХ исследовании, удалось описать мульти-ядерную синцитиальную клетку с яркой положительной реакцией цитоплазмы на анти-Spike антитела, что является отличительным цитопатическим признаком, характерным для SARS-CoV-2 инфекции. В результате электронно-микроскопических исследований диссертанту впервые удалось получить микрофотографию инфицированной коронавирусом SARS-CoV-2 лимфоцита в капиллярах легких.

В **четвертой главе** достаточно лаконично обобщены и проанализированы результаты собственных исследований в сравнении с данными литературы. Основной акцент сделан на сравнительный анализ результатов полученных с использованием собственного способа расчета ВН SARS-CoV-2, интерпретации сиквенсовых хроматограмм, анализу результатов ИГХ и сложностям идентификации ультраструктурных

элементов в электронно-микроскопических микрофотографиях аутопсийных тканей пациентов с COVID-19.

**Выводы диссертации** представлены в разделе «Заключение». Они вытекают из анализа полученных результатов и отражают суть исследования.

Сформулированные **практические рекомендации** могут быть использованы в работе лабораторий и специалистов, занимающихся патоморфологическими, молекулярно-генетическими и электронно-микроскопическими исследованиями тканей легких и других органов при различных инфекциях, включая COVID-19. Вслед за ними определены перспективы дальнейшей разработки темы.

Автореферат отражает основное содержание диссертации.

Несмотря на общую высокую оценку оформления работы, к ее содержанию можно высказать ряд небольших замечаний и пожеланий:

Выявленную позитивную окраску гиалиновых мембран, десквамированного эпителия бронхиол и многоядерных клеток синцитиального типа следует считать позитивными с осторожностью, как правило это артефакт окраски хромогена DAB в условиях использования буфера с рН 6,0, и с рН 9,0;

В рисунках с иммуногистохимической окраской следует точно указывать тип позитивной реакции: либо ядерная либо цитоплазматическая либо смешанная. Иногда неясно.

Кроме того, хотелось бы знать мнение автора по таким вопросам:

1. Автор описывает экспрессию белка при иммуногистохимическом исследовании в гладкомышечных клетках стенки сосудов почек. Но при электронной микроскопии вирусные частицы в них не описываются. Что вызвало позитивную окраску при ИГХ-исследовании гладкой мышцы?

2. В случае отсутствия специфического рецептора АПФ2 в клетке, каким образом происходит инфицирование казалось бы совсем неуязвимой клетки/органа/системы вирусом?

### **Заключение**

Диссертационная работа Одилова Акмалжона Адхамжоновича «Патоморфологическое, молекулярно-генетическое, иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование легких при COVID-19», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются важные научные задачи, касающиеся

поиска причин и понимания патогенетических механизмов приведших к смерти пациентов с COVID-19.

По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, раздела II Положения о присуждении ученых степеней в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утверждённого Ученым советом РУДН 23.09.2019 г., протокол № 12, а ее автор Одилов Акмалжон Адхамжонович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.2. – Патологическая анатомия.

Профессор кафедры  
патологической анатомии  
ФГБОУ ВО МГМСУ  
им. А.И. Евдокимова  
Минздрава России

доктор медицинских наук

/  / Авдалян А.М.

Дата: «5» мая 2023

Адрес: 108814, Москва, п. Сосенское п. Коммунарка, ул. Сосенский стан, д. 8, ТиНАО  
Телефон: +7 (495) 744-07-03; Адрес электронной почты: ashot\_avdalyan@mail.ru

Подпись д.м.н. А.М. Авдаляна заверяю  
Ученый секретарь ФГБОУ ВО МГМСУ  
им. А.И. Евдокимова  
Минздрава России доктор медицинских наук,  
Профессор, Васюк Юрий Александрович



Дата: «5» мая 2023

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова" Министерства Здравоохранения России (ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова МЗ России)**

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

Тел. 8(495) 609-67-00

E-mail: msmsu@msmsu.ru