КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КАРБОВСЬКИЙ ВІТАЛІЙ ЛЕОНІДОВИЧ

УДК 577.112.7: 612.115

ДИСЕРТАЦІЯ

СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД

03.00.04 - біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



В.Л. Карбовський

Київ-2026

АНОТАЦІЯ

Карбовський В.Л. Система гемостазу у постковідний період. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2026.

Дисертаційна робота присвячена оцінці стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19 та встановленню молекулярно-біохімічних механізмів постковідних порушень у системі гемостазу з урахуванням титру антитіл проти SARS-CoV-2. Пандемія COVID-19 залишила по собі не лише слід у вигляді гострих захворювань, а й сформувала нову реальність - постковідний синдром (Long COVID, пост-acute sequelae of COVID-19), який нині визнається однією з найбільш актуальних медичних та наукових проблем сучасності. У понад 10–30% осіб, які перенесли COVID-19, зберігаються хронічні симптоми протягом місяців або навіть років після гострої фази інфекції. При цьому патогенез цих станів залишається значною мірою незрозумілим, а лікування - переважно симптоматичним.

Незважаючи на значну кількість публікацій, присвячених вивченню Long COVID, механізми збереження симптоматики у «здорових» донорів із високими титрами анти-SARS-CoV-2 IgG досі не мають вичерпного пояснення. Частина осіб має нормальні показники загальноклінічних тестів, однак продовжує скаржитися на втому, когнітивні та серцево-судинні порушення або зниження толерантності до навантаження. Це змушує припустити наявність прихованих молекулярних детермінант, що діють незалежно від вірусного навантаження чи класичних запальних маркерів.

У рамках дисертаційної роботи було здійснено порівняльну оцінку показників коагуляційної ланки системи гемостазу у донорів, які перенесли SARS-CoV-2-інфекцію, з урахуванням рівня специфічних антитіл проти вірусу. Основну увагу приділено порівняльній характеристиці відхилень

вмісту/активності факторів системи гемостазу у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2.

Було встановлено, що загалом рівні протромбінового часу (ПЧ), активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ) та тромбінового часу (ТЧ) залишалися у межах референтних значень, проте при деталізованому порівнянні груп з різним рівнем анти-SARS-CoV-2 IgG виявлено достовірні відмінності. Зокрема, подовження АЧТЧ у групі з високим титром антитіл може свідчити про певне пригнічення внутрішнього шляху коагуляції, тоді як зменшення рівня фібриногену та зниження активності антитромбіну III в цій самій групі вказують на формування латентного протромботичного стану.

Показово, що зміни у параметрах коагуляції не завжди корелювали між собою, а отже можуть бути зумовлені різними патогенетичними ланками - як запальними, так і імунними. Активність природних антикоагулянтів, зокрема антитромбіну III, виявила тенденцію до зниження при високих титрах антитіл, що може бути результатом його підвищеного споживання або модифікації під впливом циркулюючих імунних факторів. Натомість показники часу зсідання крові у протромбіновому тесті не демонстрували суттєвих змін, що дозволяє припустити відносну стабільність функціонування зовнішнього шляху згортання.

Особливу увагу заслуговує також оцінка рівня фібриногену, оскільки це не лише основний субстрат для формування фібринового згустку, а й важливий гострофазовий білок, що бере участь у запаленні, репарації тканин і регуляції судинного тонусу. Виявлене достовірне зниження концентрації фібриногену у групі донорів з високим титром антитіл може свідчити про активне споживання фібриногену в умовах активізації коагуляції або протеолітичного розщеплення за участі ферментів зі зміненими внаслідок перенесеного захворювання властивостями.

Результати цього етапу дослідження підтверджують, що навіть у клінічно компенсованих осіб, які перенесли COVID-19 і не мають виражених відхилень гемостазу за загальними критеріями, можуть мати місце тонкі, але потенційно

значущі зміни у системі зсідання крові, особливо у зв’язку з формуванням специфічної імунної відповіді. Наявність таких змін в осіб з підвищеним титром анти-SARS-CoV-2 IgG може розглядатися як молекулярно-біохімічний маркер пролонгованого ризику тромботичних ускладнень**,** що потребує подальшого дослідження в контексті персоналізованої медицини.

Отримані дані обґрунтовують необхідність включення функціональних тестів на коагуляційну активність до постковідного скринінгу навіть у «здорових» донорів, а також поглибленого аналізу взаємодії між імунними факторами та ключовими білками системи згортання крові. У перспективі це відкриває нові підходи до моніторингу стану судинно-гемостатичної системи в постінфекційний період, а також до виявлення осіб із підвищеним ризиком розвитку пізніх судинних ускладнень.

Аналіз вмісту та активності протеолітичних ферментів у плазмі крові донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 виявив характерні зміни, що свідчать про порушення протеолітичного гомеостазу у постковідний період. Встановлено, що у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 спостерігаються зміни рівня матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-3, ММП-3, ММП-8, ММП-9), що залежать від титру антитіл. Зростання рівнів ММП, які виконують не лише роль маркерів тканинної активності, але й діють як функціональні регулятори, потенційно здатне впливати на фактори системи гемостазу, змінюючи її рівновагу в бік як гіперкоагуляції з ризиком тромбоутворення, так і гіпокоагуляції з підвищеною вірогідністю кровотеч. Одночасне збільшення вмісту та активності інгібіторів протеїназ у плазмі крові донорів, зокрема α_2-макроглобуліну, α_1-антитрипсину, α_2-антиплазміну, ПАІ-1 та ТІМП-1, відображає активацію компенсаторних механізмів, спрямованих на обмеження протеолітичного спалаху. Сукупність цих змін свідчить про включення регуляторних процесів, що забезпечують тимчасове утримання протеолітичної активності в межах адаптивної відповіді організму після перенесеного COVID-19.

Проведені дослідження показали, що у плазмі донорів з різними антитіл проти SARS-CoV-2 присутні стійкі комплекси антитіл з молекулами плазміногенового походження. Їхній вміст корелює із титром IgG проти SARS-CoV-2. Утворення та накопичення у кровотоці таких комплексів може відігравати визначальну роль у формуванні порушень гемостазу, мікрозапалення та судинної дисфункції у постковідний період. Ми припускаємо, що формування комплексів між антитілами та деградованими формами плазміногену/плазміну є критично важливим тригером у порушенні фібринолізу та коагуляції. Такі комплекси можуть функціонувати як неконтрольовані протеолітичні модулятори, здатні запускати або пригнічувати ланки гемостазу, порушуючи тонкий баланс між коагуляцією та антикоагуляцією. Вони можуть також ускладнювати діагностику, бо залишаються неідентифікованими класичними методами, однак мають суттєвий вплив на ендотелій, тромбоцити та протеоліз.

Використовуючи методи афінної хроматографії, електрофорезу в поліакриламідному гелі та вестерн-блот-аналізу, з плазми крові донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 було очищено та охарактеризовано білкові комплекси, до складу яких входять імуноглобуліни класу G та білки плазміногенового походження. Отримані дані підтвердили ковалентний характер взаємодії між компонентами комплексу, що свідчить про стабільність цих утворень у плазмі крові. Аналіз електрофоретичних профілів і вестерн-блот підтвердив наявність у складі комплексів молекул плазміногену різного ступеня деградації, що вказує на часткову активацію або деградацію плазміногену у постковідний період.

Показано, що очищені комплекси виявляють протеолітичну активність щодо хромогенного субстрату, специфічного для плазміну, а також здатні розщеплювати фібриноген, що підтверджує наявність каталітично активних центрів у складі деградованих форм плазміногену. Встановлено, що після інкубації зі стрептокіназою активність комплексів істотно зростає, що свідчить про присутність як активного плазміну, так і деградованих форм плазміногену, здатних до подальшої активації.

Отримані результати переконливо демонструють, що виявлені комплекси не є інертними утвореннями, а становлять функціонально активні структури, які можуть впливати на перебіг протеолітичних реакцій у плазмі та модулювати рівновагу між процесами коагуляції та фібринолізу. Таким чином, вони можуть виступати як активні учасники регуляції гемостатичних механізмів, що потенційно визначають характер постковідних змін гомеостазу.

Виявлення циркулюючих у кровотоці ковалентних комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження створює підґрунтя розробки та запровадження нових протеомних та імунохімічних маркерів, орієнтованих не на циркулюючі білки, а на їх комплекси з імуноглобулінами. Крім того, це відкриває перспективи біотехнологічного втручання - від селективного видалення таких комплексів до створення інгібіторів їх утворення.

Ключові слова: система гемостазу, постковідний період, титри антитіл проти SARS-CoV-2, протеоліз, запалення, ковалентні білкові комплекси.

Наукові праці,
в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Krenytska, D.I**.,** **Karbovskyy, V.L.,** Abenavoli, L., Falalyeyeva, T.M., Scarlata, G.G.M., Raksha, N.G., Vovk, T.B., Kot, L.I., Savchuk, O.M., Gambardella, M.L., Kovalchuk, O.I., Pankiv, V.I., & Ostapchenko, L.I. (2025). The levels of inflammatory, angiogenic, and stress biomarkers in plasma of donors depending on anti-SARS-CoV-2 IgG titers. Mìžnarodnij Endokrinologìčnij Žurnal, 21(2), 112–120. https://doi.org/10.22141/2224-0721.21.2.2025.1507 **(Scopus, Q4)** (здобувачем самостійно виконано визначення рівнів білків теплового шоку HSP60 та HSP70 у плазмі донорів, проведено комплексний аналіз отриманих експериментальних даних та їх статистичне опрацювання, а також здійснено підготовку рукопису публікації)

2. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Tsyryuk, O., Penchuk, Y., Kot, L., Raksha, N., Falalyeyeva, T., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2025). Analysis

of key parameters of the hemostatic system in patients with osteoarthritis after COVID-19. *Minerva Biotechnology and Biomolecular Research, 37*(2), 61–71. https://doi.org/10.23736/S2724-542X.25.03239-0 **(Scopus, Q4)** (здобувачем виконано аналіз параметрів системи фібринолізу, зокрема визначено концентрацію плазміногену та оцінено його відносну активність, досліджено рівні тканинного активатора плазміногену (tPA) та інгібітора активатора плазміногену-1 (PAI-1), а також встановлено інгібіторний потенціал α2-макроглобуліну та α1-антитрипсину. Проведено узагальнення та інтерпретацію отриманих результатів, а також взято участь у підготовці та написанні рукопису публікації.)

3. Halenova, T., Rachkovska, A., Krenytska, D., Kostiuk, O., **Karbovskyy, V.,** Vovk, T., Raksha, N., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2024). Abnormal proteolytic activity profile in blood plasma of healthy volunteers depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. Journal of Biological Research, 97, Article 12567. https://doi.org/10.4081/jbr.2024.12567 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-3, ММП-3/10, ММП-8, ММП-9) та їх інгібітора ТІМП-1 у плазмі крові, очищено та проаналізовано пептидні пули з плазми крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

4. Halenova, T.I., Raksha, N.H., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L**., Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., Tomchuk, V. A., & Savchuk, O. M. (2024). Proteolytic imbalance in plasma of patients with multiple sclerosis following COVID-19. *International Neurological Journal (Ukraine), 20*(5), 221–227 https://doi.org/10.22141/2224-0713.20.5.2024.1089 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-3, ММП-3/10, ММП-8, ММП-9) та їх інгібітора ТІМП-1 у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

5. Halenova, T.I., Raksha, N.G., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L.,** Sholomon, S.M., Melnyk, V.S., & Savchuk, O.M. (2024). Characteristics of fibrin/fibrinogen

degradation products in multiple sclerosis following SARS-CoV-2 infection. *International Neurological Journal (Ukraine)*, 20(2), 104–109. https://doi.org/10.22141/2224-0713.20.2.2024.1060 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення концентрації фібриногену, розчинних фібрин-мономерних комплексів та вмісту D-димеру, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

6. Halenova, T. I., Raksha, N. H., Vovk, T. B., **Karbovskyy, V. L.,** Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., & Savchuk, O. M. (2024). Cytokine profile in multiple sclerosis patients with and without COVID-19. *Wiadomości Lekarskie (Medical Advances), 77*(4), 640–645. https://doi.org/10.36740/WLek202404104 **(Scopus Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів про- та протизапальних цитокінів у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

7. Halenova, T.I., Raksha, N.G., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L.,** Sholomon, S.M., Melnyk, V.S., & Savchuk, O.M. (2024). Coagulation and anticoagulation parameters in multiple sclerosis patients with and without COVID-19. *Клінічна та профілактична медицина*, **3(33)**, 36–45. https://doi.org/10.31612/2616-4868.3.2024.05 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів протромбіну, плазміногену, тканинного активатора плазміногену, інгібітора активатора плазміногену-1 та протеїну С, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

8. Rachkovska, A., Strubchevska, K., Kozyk, M., Goldstein, B., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Falalyeyeva, T., Kovalchuk, O., & Ostapchenko, L. (2024). Prothrombin changes and suggested correlation with the titers of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in recently recovered from SARS-CoV-2 infection healthy volunteers. Minerva Biotechnology and Biomolecular Research, 36(1), 13–20. https://doi.org/10.23736/S2724-542X.24.03051-7 **(Scopus, Q4)** (здобувачем проведено визначення часу зсідання плазми крові у хронометричних тестах, а також визначено вміст молекул протромбінового

походження та потенційну активність протромбіну, здійснено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів)

9. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Halenova, T., Vovk, T., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2023). A study of fibrinolytic system components in donor groups depending on various titers of circulating anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 34(7), 439–445. https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001248 **(Scopus, Q3)** (здобувачем особисто здійснено визначення інгібіторного потенціалу α2-антиплазміну, α1-антитрипсину та α2-макроглобуліну, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

10. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Halenova, T., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Liubenko, D., Falalyeyeva, T., & Ostapchenko, L. (2023). Characteristics of products of fibrinogen origin in the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. Reviews on Recent Clinical Trials, 18, 69–75. https://doi.org/10.2174/1574887118666221219115856 **(Scopus, Q3)** (здобувачем особисто здійснено визначення концентрації фібриногену та розчинних фібрин-мономерних комплексів, досліджено вміст D-димеру, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

11. Strubchevska, K., Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Kozyk, M., Secor, B., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Falalyeyeva, T., Kaminsky, R., & Ostapchenko, L. (2023). Coagulation parameters in post-COVID-19 condition in relation to various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. *International Journal of General Medicine, 16*, 6127–6135. https://doi.org/10.2147/IJGM.S425496 **(Scopus, Q2)** (здобувачем особисто здійснено визначення концентрацій тромбомодуліну, протеїну С та антитромбіну ІІІ, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

12. Галенова, Т., Калашнікова, М., **Карбовський, В.,** Шоломон, С., & Мельник, В. (2023). Біохімічні показники крові у хворих на розсіяний склероз, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія»*, 4(95), 13–19. DOI:

10.17721/1728.2748.2023.95.13-19 (здобувачем проведено визначення активності сироваткових ферментів аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, гамма-глутаматтрансферази, лужної фосфатази, лактатдегідрогенази та амілази, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

13. Калашнікова, М., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2023). Optimization of an enzyme electrophoresis method for using collagen as a substrate. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(94), 41–45. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.41-45 (здобувачем запропоновано підходи до оптимізації умов проведення ензим-електрофорезу з використанням колагену як субстрату, а також здійснено порівняльний аналіз ефективності різних варіантів методу)

14. Krenytska, D., Rachkovska, A., Savchuk, O., & **Karbovskyi, V.** (2023). Amylase concentration in donor groups depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 2(93), 18–21. DOI 10.17721/1728.2748.2023.93.18-21 (здобувачем особисто здійснено визначення концентрації амілази у сироватці крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

15. Krenytska, D., Rachkovska, A., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Ostapchenko, L., & Halenova, T. (2023). Cytokine profile depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in the blood plasma of healthy volunteers. Journal of Biological Research, 96(2), Article 11256. https://doi.org/10.4081/jbr.2023.11256 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів про- та протизапальних цитокінів, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

16. Rachkovska, A., Kuntsova, M., Krenytska, D., Savchuk, O., & **Karbovskyi, V.** (2023). Parameters of the lipid profile in donors who had suffered from COVID-19 and had various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma.Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Серія «Біологія», 1(92), 22–26. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.92.22-26 (здобувачем особисто проаналізовано ліпідний профіль у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

17. Креницька, Д., Рачковська, А., Павлівський, Ю., Чижик, Ю., & **Карбовський, В.** (2022). Біохімічні параметри печінки за наявності у кровотоці анти-SARS-CoV-2 IgG. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 1(88), 33–41. DOI 10.17721/1728.2748.2022.88.33-40 (здобувачем проведено визначення концентрації загального, прямого та непрямого білірубіну, а також досліджено кореляцію між активністю аланінамінотрансферази та С-реактивним білком у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

18. Krenytska, D., Rachkovska, A., Savchuk, O., & **Karbovskyi, V.** (2022). Characteristics of iron-dependent parameters in donors under the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG in the blood. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(91), 10–15. DOI 10.17721/1728.2748.2022.91.10-14 (здобувачем проведено визначення концентрації феритину та трансферину у плазмі крові донорів, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

19. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2022). Біохімічні параметри функціонування нирок у донорів за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(90), 45–52. DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.20-25 (здобувачем узагальнено результати щодо змін показників функціонування нирок у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 IgG, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

20. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В**. (2021). Показники згортання крові у вагітних жінок, хворих на COVID-19. Вісник

Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(86), 34–39. DOI 10.17721/1728.2748.2021.86.34-39 (здобувачем визначено час згортання крові у хронометричних тестах АЧТЧ та ПЧ, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

21. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & Карбовський, В. (2021). Біохімічні параметри функціонального стану печінки у хворих на гепатит В за умови коінфекції SARS-CoV-2. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(87), 12–18. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2021.87.12-17 (здобувачем визначено активність АЛС, АСТ, лужної фосфатази, ГГТ, концентрацію загального та прямого білірубіну у сироватці крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Kalashnikova M., Popovych K. and **Karbovskiy V.** (2024). Analysis of changes in proteolytic activity in adipose tissue during obesity induction and its prevention with corrective peptides. In: 1st International scientific and practical online conference «Modern achievements of experimental, clinical, environmental biochemistry and molecular biology». Kharkiv, Ukraine, 7 March 2024, pp. 555-557.

2. Kalashnikova M., Yefimenko T. and **Karbovskiy V.** (2024). Serine protease content in blood plasma of donors with different titers of IgG anti-SARS-CoV-2. In: XXI International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: Advancements in Life Sciences». Kyiv, Ukraine, 24-26 April 2024, pp. 188-191.

3. Raksha N., Krenytska D. and **Karbovskyy V.** (2024). Dysfunction of fibrinolytic system in post-COVID-19 period. In: 7th International Scientific Conference «Current Problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology». Dnipro, Ukraine, 3–4 October 2024, pp. 109–110.

4. Savchuk O.O., Halenova T.I. and **Karbovskyy V.L.** (2024). Proteolytic balance alterations in blood plasma of donors depending on anti-SARS-CoV-2 IgG titer. Науково-практична конференція за участю молодих вчених «Організаційно-прикладні аспекти клінічної та профілактичної медицини в умовах сучасних викликів і загроз: Проблеми та перспективи інноваційного розвитку», 30–31 October 2024, / Клінічна та профілактична медицина, №7(37), p.180.

5. Rachkovska A., Krenytska D. and **Karbovskiy V.** (2023). Concentrations of fibrinogen and D-dimer in blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. In: The 66th International Conference for students of Physics and Natural Sciences «Open Readings 2023». Vilnius, Lithuania, 18–21 April 2023, p.406.

6. Рачковська А.М., Креницька Д.І., **Карбовський В.Л.** Зміни параметрів протеїну С у плазмі крові людей з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. «Актуальні питання біології та медицини», Лубни, Україна, 2 червня 2023 року, стр.36-40.

7. Rachkovska A., Savchuk O. and **Karbovskyy V.** (2023). Plasminogen as a key component of the fibrinolytic system in the blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. In: 20th Horizons in Molecular Biology Conference. Göttingen, Germany, 11–14 September 2023, p.32.

ABSTRACT

Karbovskyy V.L. The hemostatic system in the post-COVID period. – Qualification scientific work with the manuscript copyright. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2026.

The dissertation is devoted to the assessment of the hemostatic system in individuals who have recovered from COVID-19 and to the elucidation of the molecular and biochemical mechanisms underlying post-COVID disturbances in hemostasis, taking into account the antibody titer against SARS-CoV-2. The COVID-19 pandemic has left behind not only the burden of acute disease but has also shaped a new medical reality - the post-COVID syndrome (Long COVID, post-acute sequelae of COVID-19), which is now recognized as one of the most pressing medical and scientific challenges of our time. In more than 10–30% of individuals who have recovered from COVID-19, chronic symptoms persist for months or even years after the acute phase of infection. The pathogenesis of these conditions remains largely unclear, and treatment is still predominantly symptomatic.

Despite the substantial number of publications devoted to the study of Long COVID, the mechanisms underlying the persistence of symptoms in “apparently healthy” donors with high titers of anti-SARS-CoV-2 IgG remain insufficiently explained. Some individuals demonstrate normal results in routine clinical tests, yet continue to report fatigue, cognitive impairment, cardiovascular disturbances, or reduced exercise tolerance. This suggests the possible presence of latent molecular determinants acting independently of viral load or classical inflammatory markers.

Within the framework of this dissertation, a comparative assessment of the coagulation parameters of the hemostatic system was carried out in donors who had recovered from SARS-CoV-2 infection, taking into account the levels of virus-specific antibodies. Particular attention was paid to the comparative analysis of alterations in

the content and activity of hemostatic factors in donors with different anti-SARS-CoV-2 antibody titers.

It was established that, overall, the levels of prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and thrombin time (TT) remained within reference ranges. However, detailed comparison between groups with varying anti-SARS-CoV-2 IgG titers revealed statistically significant differences. Specifically, prolonged APTT in the high-antibody-titer group may indicate a certain suppression of the intrinsic coagulation pathway, while the decrease in fibrinogen levels and antithrombin III activity within the same group points to the formation of a latent prothrombotic state. Notably, the observed alterations in coagulation parameters did not always correlate with one another, suggesting that they may arise from distinct pathogenic mechanisms - both inflammatory and immune-mediated.

The activity of natural anticoagulants, particularly antithrombin III, tended to decrease in individuals with high antibody titers, which may reflect increased consumption or structural modification of the molecule under the influence of circulating immune factors. In contrast, prothrombin time values remained largely unchanged, indicating a relative stability of the extrinsic coagulation pathway.

Special attention should also be given to fibrinogen levels, since fibrinogen is not only the primary substrate for fibrin clot formation but also a key acute-phase protein involved in inflammation, tissue repair, and vascular tone regulation. The observed significant decrease in fibrinogen concentration in the high-antibody-titer group may indicate active fibrinogen consumption under conditions of coagulation activation or proteolytic degradation mediated by enzymes whose properties may have been altered as a result of prior infection.

The findings of this stage of the study confirm that even in clinically compensated individuals who have recovered from COVID-19 and show no overt hemostatic abnormalities by routine criteria, subtle yet potentially meaningful changes may occur within the coagulation system - particularly in association with the formation of a specific immune response. The presence of such changes in individuals with elevated anti-SARS-CoV-2 IgG titers may serve as a molecular and biochemical marker of

prolonged thrombotic risk, warranting further investigation within the framework of personalized medicine. The obtained data support the inclusion of functional coagulation assays in post-COVID screening, even among “apparently healthy” donors, as well as a more detailed analysis of the interactions between immune factors and key coagulation proteins.

In the future, this approach may open new perspectives for monitoring the vascular–hemostatic system during the post-infectious period and for identifying individuals at increased risk of late-onset vascular complications. Analysis of the content and activity of proteolytic enzymes in the plasma of donors with varying titers of antibodies against SARS-CoV-2 revealed characteristic alterations indicative of disturbances in proteolytic homeostasis during the post-COVID period.

It was established that donors with different anti-SARS-CoV-2 antibody titers exhibited changes in the levels of matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-9) that correlated with antibody titer, as well as differences in the molecular weight profiles of these enzymes between groups, particularly when compared with donors having undetectable antibody levels. An increase in MMP levels - which function not only as markers of tissue activity but also as functional regulators - may influence hemostatic factors, thereby shifting the balance of the coagulation system toward either hypercoagulation (with an increased risk of thrombosis) or hypocoagulation (with a higher probability of bleeding). Simultaneous elevation of the content and activity of plasma protease inhibitors, including α_2-macroglobulin, α_1-antitrypsin, α_2-antiplasmin, PAI-1, and TIMP-1, reflects the activation of compensatory mechanisms aimed at limiting the proteolytic surge.

Taken together, these findings indicate the involvement of regulatory processes that help transiently maintain proteolytic activity within the range of an adaptive post-COVID response.

The conducted studies also demonstrated the presence of stable immune complexes between antibodies and plasminogen-derived molecules in the plasma of donors with different antibody titers. The abundance of these complexes correlated positively with anti-SARS-CoV-2 IgG levels. The formation and accumulation of such

complexes in the bloodstream may play a decisive role in the development of hemostatic disturbances, microinflammation, and vascular dysfunction during the post-COVID period. We hypothesize that the formation of complexes between antibodies and degraded forms of plasminogen/plasmin represents a critical trigger of fibrinolytic and coagulation imbalance. These complexes may act as uncontrolled proteolytic modulators, capable of activating or suppressing specific components of the hemostatic system and thereby disrupting the delicate equilibrium between coagulation and anticoagulation. Moreover, they may complicate diagnostic evaluation, as they often remain undetected by conventional assays, yet exert significant effects on the endothelium, platelets, and proteolytic activity.

Using affinity chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, and Western blot analysis, protein complexes composed of immunoglobulin G and plasminogen-derived proteins were purified and characterized from the plasma of donors with varying titers of antibodies against SARS-CoV-2. The obtained data confirmed the covalent nature of the interaction between the complex components, indicating the stability of these formations in blood plasma. Analysis of electrophoretic profiles and Western blots revealed the presence of plasminogen molecules of various degrees of degradation within the complexes, suggesting partial activation and/or degradation of plasminogen during the post-COVID period.

It was shown that the purified complexes exhibited proteolytic activity toward a chromogenic substrate specific for plasmin, as well as the ability to degrade fibrinogen, confirming the presence of catalytically active centers within the degraded plasminogen forms. Incubation with streptokinase significantly increased the activity of the complexes, indicating the presence of both active plasmin and degraded plasminogen forms capable of further activation.

These findings convincingly demonstrate that the identified complexes are not inert structures, but rather functionally active entities capable of influencing proteolytic reactions in plasma and modulating the balance between coagulation and fibrinolysis. Thus, they may serve as active participants in the regulation of hemostatic mechanisms, potentially determining the nature of post-COVID alterations in systemic homeostasis.

The detection of circulating covalent IgG complexes with plasminogen-derived molecules provides a foundation for the development and implementation of novel proteomic and immunochemical biomarkers focused not on individual circulating proteins but on their immune complexes. Furthermore, this opens up prospects for biotechnological interventions - from the selective removal of such complexes to the design of inhibitors preventing their formation.

Keywords: hemostatic system, post-COVID period, anti-SARS-CoV-2 antibody titers, proteolysis, inflammation, covalent protein complexes.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……. 22-22

ВСТУП……... 25-32

РОЗДІЛ 1. Постковідний синдром: патогенетичні механізми та гемостатичні порушення…….…….. 33

1.1. Ключові механізми розвитку ускладнень у постковідний період …….. 33-48

1.2. Основні причини виникнення порушень у функціонуванні системи гемостазу у постковідний період…… 48-56

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ…… 57

2.1 Характеристика дослідних груп донорів…….. 57-60

2.2 Реактиви та обладнання……. 60-61

2.3 Коагуляційні тести……. 61

2.3.1 Визначення активованого часткового тромбопластинового часу зсідання плазми крові…… 61-62

2.3.2 Визначення тромбінового часу зсідання плазми крові…….. 62

2.3.3 Визначення протромбінового часу зсідання плазми крові та міжнародного нормалізованого відношення……... 63

2.4 Очищення з плазми крові антитромбіну III……. 63-64

2.5 Очищення з плазми крові фракції вітамін К-залежних білків та аналіз методом хроматографії, що поділяє за розмірами……. 64-65

2.6 Очищення з плазми крові фракції середньомолекулярних метаболітів та аналіз пептидної складової фракції середньомолекулярних метаболітів метод хроматографії, що поділяє за розмірами…… 65-66

2.7 Очищення з плазми крові комплексів антитіл з білками…… 66

2.7.1 Афінна хроматографія на бензамідин-сефарозі……... 66

2.7.2 Афінна хроматографія на протеїн А-сефарозі……. 66
2.7.3 Афінна хроматографія на лізин-сефарозі……. 66
2.8 Очищення з плазми крові фракції серинових протеїназ……. 67
2.9 Визначення концентрації фібриногену…… 67-68
2.10 Визначення концентрації фібриногену…… 68-69
2.11 Визначення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів……... 69
2.12 Визначення концентрації D-димеру……. 69-70
2.13 Визначення інгібіторного потенціалу антитромбіну III……. 70
2.14 Визначення активності протеїну С……... 70-71
2.15 Визначення потенційної активності плазміногену…… 71
2.16 Визначення потенційної активності тканинного активатора плазміногену……... 71
2.17 Визначення інгібіторного потенціалу α_2-антиплазміну…….. 72
2.18 Визначення інгібіторного потенціалу α_2-макроглобуліну….. 72
2.19 Визначення інгібіторного потенціалу α_1-антитрипсину……. 72-73
2.20 Визначення вмісту матриксних металопротеїназ, тканинного інгібітору металопротеїназ, про- і протизапальних цитокінів, ростових факторів, шаперонів та деяких факторів системи гемостазу методом імуноферментного аналізу …… 74-75
2.21 Визначення концентрації креатиніну та сечовини у сироватці крові……..... 75
2.22 Визначення концентрації ліпопротеїнів високої щільності, ліпопротеїнів низької щільності, тригліцеридів та загального холестеролу у сироватці крові……... 76
2.23 Визначення активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, гамма-глутамілтранспептидази та лужної фосфатази у сироватці крові…….. 76-77

2.24 Одновимірний диск-електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію…….. 77
2.25 Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідому гелі за присутності додецилсульфату натрію…….. 78-79
2.26 Визначення загальної протеолітичної активності…….. 79
2.27 Визначення концентрації білка методом Бредфорда…….. 80
2.28 Вестерн-блот аналіз…… 80
2.29 Статистична обробка результатів дослідження…….. 81
РОЗДІЛ 3. СТАН СИСТЕМИ ЗГОРТАННЯ КРОВІ У ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ПРОТИ SARS-CoV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД…….. 82-136
РОЗДІЛ 4. ОЦІНКА СТАНУ СИСТЕМИ ФІБРИНОЛІЗУ У ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ДО SARS-COV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД……. 137-163
РОЗДІЛ 5. ПРОТЕОЛІТИЧНИЙ ПРОФІЛЬ ПЛАЗМИ КРОВІ ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ПРОТИ SARS-CoV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД…… 164-205
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ЗАПАЛЬНИХ ТА СТРЕС-АСОЦІЙОВАНИХ МАРКЕРІВ У ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ПРОТИ SARS-CoV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД…….. 206-232
РОЗДІЛ 7. КОМПЛЕКСИ АНТИТІЛ З МОЛЕКУЛАМИ ПЛАЗМІНОГЕНОВОГО ПОХОДЖЕННЯ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ТРИГЕРИ ПОРУШЕНЬ ГОМЕОСТАЗУ У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД…… 233-272
РОЗДІЛ 8. ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД У ПАЦІЄНТІВ З РОЗСІЯНИМ СКЛЕРОЗОМ ТА ОСТЕОАРТРИТОМ…… 273-301
РОЗДІЛ 9. ЗАКЛЮЧЕННЯ……. 302-315
ВИСНОВКИ …….. 316-319

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ……. 320-369

ДОДАТОК А. Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації…..…… 370-377

ДОДАТОК Б. Витяги з протоколу засідання комісії з питань біоетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка……..... 378-384

ДОДАТОК В. Акти впровадження результатів дисертаційного дослідження……. 385-389

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АПФ-2	ангіотензинперетворювальний фермент-2;
АТ ІІІ	антитромбін ІІІ;
АЧТЧ	активований частковий тромбопластиновий час;
ГРВІ	гостра респіраторна вірусна інфекція;
ГРДС	гострий респіраторний дистрес-синдром;
ДВЗ	дисеміноване внутрішньосудинне згортання;
ДСН	додецилсульфат натрія;
ІМТ	індекс маси тіла;
ІФА	імуноферментний аналіз;
ЛДГ	лактатдегідрогеназа;
ЛПДНЩ	ліпопротеїни дуже низької щільності;
ЛФ	лужна фосфатаза;
МНВ	міжнародне нормалізоване відношення;
ПАІ-1	інгібітор активатору плазміногену 1 типу
ПС	протеїн С;
ПЧ	протромбіновий час;
РС	розсіяний склероз;
РФМК	розчинні фібрин-мономерні комплекси;
СММ	середньомолекулярні метаболіти;
СРБ	С-реактивний білок;
ТАГ	триацилгліцероли;
ТЕУ	тромбоемболічні ускладнення;
ТЕЛА	тромбоемболія легеневої артерії;
ТМ	тромбомодулін;
ТЧ	тромбіновий час;
ОА	остеоартрит;
ЦД1, ЦД2	цукровий діабет 1 типу, цукровий діабет 2 типу;
α_2-АП	α_2-антиплазмін;

α_1-АТ	α_1-антитрипсин;
α_2-МГ	α_2-макроглобулін;
ADAMTS-13	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (дезінтегрин і металопротеїназа з тромбоспондиновим мотивом);
ACE2	angiotensin I converting enzyme 2 (ангіотензинперетворювальний фермент 2)
BAPNA	Nα-benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (Nα-бензоїл-L-аргінін 4-нітроанілід гідрохлорид);
COVID-19	coronavirus disease-2019 (короновірусна хвороба-2019);
DAD	diffuse alveolar damage (дифузне альвеолярне пошкодження);
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота);
FGF-2	fibroblast growth factor 2 (фактор росту фібробластів);
HIF-1α	hypoxia-inducible factor 1 alpha (гіпоксія-індукований фактор 1α);
HSP	heat shock proteins (білки теплового шоку);
IL	interleukin (інтерлейкін);
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1 (моноцитарний хемоаттрактантний білок-1);
NETs	neutrophil extracellular traps (позаклітинні нейтрофільні пастки);
NF-κB	nuclear factor kappa B (ядерний фактор каппа B);
PDGF	platelet-derived growth factor (тромбоцитарний фактор росту);
PIVKA-II	protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (білок, індукований відсутністю або антагоністами вітаміну К-II);

RBD	receptor-binding domain (рецептор-зв'язувальний домен);
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 (важкий гострий респіраторний синдром-2);
TGF-β	transforming growth factor beta (трансформуючий фактор росту β);
TFPI	tissue factor pathway inhibitor (інгібітор шляху тканинного фактору);
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2 (трансмембранна протеаза, серин 2);
TNF-α	tumor necrosis factor-alpha (фактор некрозу пухлини-α);
TLR4	toll-like receptor 4 (Тол-подібний рецептор 4);
tPA	tissue-type plasminogen activator (активатор плазміногену тканинного типу);
uPA	urokinase-type plasminogen activator (активатор плазміногену урокіназного типу);
VEGF	vascular endothelial growth factor (фактор росту ендотелію судин);
VLDLR	very low-density lipoprotein receptor (рецептори ліпопротеїнів дуже низької щільності);
vWF	von Willebrand factor (фактор фон Віллебранда).

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Пандемія COVID-19 не лише спричинила глобальну кризу охорони здоров'я, а й залишила по собі тривалі наслідки, що позначаються на здоров'ї мільйонів людей по всьому світу [1,2]. Одним із наслідків перенесеного захворювання є розвиток постковідного синдрому (Long COVID), який характеризується широким спектром хронічної мультисистемної симптоматики, що зберігається протягом тижнів або місяців після перенесеної гострої фази SARS-CoV-2-інфекції [3,4]. Цей стан не обмежується ізольованими залишковими симптомами, а часто супроводжується загостренням вже наявних хронічних захворювань, рецидивами раніше контрольованих патологій, а в окремих випадках - виникненням нових порушень на рівні імунної, серцево-судинної, дихальної, нервової, ендокринної або інших систем організму [5,6]. Такі зміни мають не лише медичне, а й соціальне значення, оскільки вони істотно погіршують якість життя пацієнтів, знижують працездатність і потребують тривалого медичного супроводу, навіть у клінічно «здорових» на перший погляд осіб.

Незважаючи на значну кількість клінічних та епідеміологічних досліджень, патогенетичні механізми збереження симптомів у постковідний період залишаються недостатньо з'ясованими, що обумовлює необхідність подальших фундаментальних досліджень у цій сфері. Загальновідомо, що клінічні прояви постковідного синдрому не завжди корелюють із тяжкістю перебігу гострої інфекції. Зокрема, навіть у осіб із легким або безсимптомним перебігом COVID-19 можуть зберігатися стійкі порушення, включаючи хронічну втому, когнітивну дисфункцію, серцево-судинну нестабільність та симптоми мікросудинного ураження. Така гетерогенність клінічних проявів, поряд із відсутністю єдиних діагностичних критеріїв, вказує на участь нетипових або досі маловивчених механізмів у формуванні довготривалих наслідків захворювання.

На тлі класичних інфекційних уражень, патогенез SARS-CoV-2 вирізняється мультисистемністю та суттєвими відхиленнями у функціонуванні

імунної системи. Одним із феноменів, який привертає дедалі більше уваги дослідників, є наявність у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, різноманітних аутоантитіл - зокрема до інтерферонів, фосфоліпідів, кардіоліпіну, а також антинуклеарних та антинейтрофільних антитіл [8,9]. Ці аутоантитіла мають потенційно патогенний вплив, адже їх взаємозв'язок з розвитком і перебігом різних аутоімунних захворювань є доведеним, зокрема у контексті системного червоного вовчака, ревматоїдного артриту, склеродермії, аутоімунного тиреоїдиту та розсіяного склерозу. Встановлено, що частина з них здатна впливати на функцію ендотелію, порушувати регуляцію комплементу, активувати тромбоцити, або інгібувати цитокінові сигнальні шляхи, що у сукупності сприяє хронічному запаленню, мікросудинному ураженню та тромботичним ускладненням.

Це дає підстави вважати, що постковідна симптоматика може формуватися за участю не лише залишкового запалення чи вірусної персистенції, а й за рахунок нетипових, опосередкованих імунною системою механізмів, де особливу роль можуть відігравати циркулюючі антитіла, аутоантитіла чи їх комплекси з білками.

Однією з ключових систем, що зазнає значних порушень під час гострої фази COVID-19, є система гемостазу. Встановлено, що SARS-CoV-2-інфекція призводить до дисбалансу між коагуляційною та фібринолітичною ланками, розвитком гіперкоагуляційного стану, ендотеліальної дисфункції та мікротромбозів, що нерідко завершуються летальними наслідками. Саме тромбоемболічні ускладнення - включаючи тромбози глибоких вен, тромбоемболію легеневої артерії, інфаркти та інсульти - становлять один із головних чинників смертності при тяжкому перебігу COVID-19. Хоча патогенез коагуляційних порушень у гострий період інфекції вже досить добре досліджено, стан системи гемостазу у постковідний період залишається недостатньо вивченим. Зважаючи на те, що ці зміни можуть відбуватися на тлі відсутності клінічних симптомів або загальноклінічних показників, їх виявлення потребує поглибленого біохімічного та молекулярного аналізу.

Отже, актуальним є питання вивчення функціонального стану системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19, зокрема з огляду на рівень антитіл проти SARS-CoV-2. Це дозволить не лише зрозуміти потенційні механізми збереження симптоматики, а й визначити прогностично значущі біомаркери ризику тромботичних ускладнень у постковідний період, що, у свою чергу, може мати значний клінічний і соціальний резонанс.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконано 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 постковідний період» (№д/р 0122U001909, 2022-2024 рр.) та виконання завдань Перспективного плану розвитку наукового напряму «Біологія та охорона здоров'я» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (№д/р 0121U112939, 2021-2025 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було оцінити стан системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19 та встановити молекулярно-біохімічні механізми постковідних порушень у системі гемостазу з урахуванням рівня антитіл до SARS-CoV-2.

Відповідно до мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Дослідити функціональний стан основних ланок системи гемостазу (систем зсідання та фібринолізу) у постковідний період у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2.

2. Проаналізувати ключові показники системи протеолізу (вміст матриксних металопротеїназ, концентрацію та активність серинових протеїназ, профіль протеолітичних ферментів за молекулярною масою) у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 та визначити їх зв’язок із рівнем антитіл проти SARS-CoV-2.

3. З’ясувати роль запальних процесів і внесок ключових факторів клітинної відповіді (HIF-1α, VEGF, NF-κB, FGF-2, PDGF) у формування постковідних ускладнень.

4. Очистити з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 комплекси антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження.

5. Визначити роль комплексів антитіл з молекулами плазміногенового походження як потенційних тригерів порушень у системі гемостазу у осіб, що перенесли COVID-19.

6. Проаналізувати стан системи гемостазу у пацієнтів з хронічними неінфекційними захворюваннями (розсіяний склероз, остеоартрит), які перенесли COVID-19, та оцінити ступінь посилення тромботичних ризиків у цих когортних групах.

7. Сформувати узагальнюючу концепцію участі комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження, у молекулярно-біохімічних механізмах підтримання та/чи індукції протромботичного стану у осіб у постковідний період.

Об’єкт дослідження – функціонування системи гемостазу у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 та потенційні чинники збереження порушень у системі гемостазу у постковідному періоді.

Предмет дослідження – фактори системи гемостазу, чинники протеолітичного дисбалансу, цитокіни, ростові та транскрипційні фактори, ковалентні білкові комплекси.

Методи дослідження – хроматографічні методи (очищення комплексів антитіл з білками, одержання фракції серинових протеїназ, аналіз білково-пептидного складу фракцій); електрофоретичні методи (визначення молекулярної маси білків, виявлення протеїназ різної субстратної специфічності, контроль на етапах очищення цільових білків); спектрофотометричні методи (визначення активності ферментів, вмісту окремих сполук); метод імуноферментного аналізу (визначення вмісту цитокінів, матриксних металопротеїназ, факторів клітинної відповіді); тести для характеристики стану

системи гемостазу, зокрема хронометричні тести, а також статистичні та математичні методи аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження стану системи гемостазу у постковідний період, зокрема в осіб із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Виявлено порушення у функціонуванні системи зсідання крові та фібринолізу, що зумовлюють зміщення рівноваги в бік переважання процесів коагуляції на тлі пригнічення фібринолізу. Встановлено, що однією з причин таких змін є збереження низькоінтенсивного запального процесу та посилення протеолізу, опосередкованого матриксними металопротеїназами. Вперше експериментально підтверджено, що причиною збереження порушень у системі гемостазу в осіб, які перенесли COVID-19, є формування нетипових білок-білкових взаємодій та накопичення в кровотоці білкових комплексів, до складу яких входять молекули зі зміненими властивостями. Такі комплекси здатні впливати на активність окремих факторів системи гемостазу, визначаючи спрямованість і характер реакцій у межах цієї системи. Вперше встановлено ковалентний характер взаємодій білків у складі очищених комплексів та доведено, що до їхнього складу входять антитіла класу G і молекули плазміногенового походження. Вперше встановлено ковалентний характер взаємодій між антитілами класу G і молекулами плазміногенового походження у складі комплексів. Досліджено стан системи гемостазу у пацієнтів із хронічними неінфекційними захворюваннями, зокрема розсіяним склерозом (РС) та остеоартритом (ОА), після перенесеного COVID-19. Вперше доведено наявність у плазмі крові пацієнтів із РС та ОА ковалентних білкових комплексів, утворених між антитілами та білками плазміногенового і протромбінового походження, а також встановлено, що їхній рівень достовірно зростає після перенесеного COVID-19

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати мають важливе практичне значення для лабораторної та клінічної діагностики постковідних ускладнень, зокрема порушень у системі гемостазу. Встановлені особливості змін у системі гемостазу у поєднанні з оцінкою титру антитіл проти

SARS-CoV-2 можуть бути використані для раннього виявлення схильності до тромбоутворення у реконвалесцентів після COVID-19. Виявлені кореляційні взаємозв'язки між рівнем антитіл і ключовими параметрами системи гемостазу (фібриноген, розчинні фібрин-мономерні комплекси (РФМК), протромбін, протеїн С, тромбомодулін, плазміноген, інгібітор активатору плазміногену 1 типу (ПАІ-1), α_2-антиплазмін) дають можливість використовувати їх як потенційні біомаркери для оцінки ступеня порушень у системі «коагуляція–фібриноліз» та моніторингу ефективності антикоагулянтної терапії у постковідний період. Практичну цінність становить виявлення ковалентних комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження, які можуть розглядатися як нові діагностичні маркери постковідного гіперкоагуляційного стану. Їхня ідентифікація може бути використана для поглибленої оцінки ризику тромботичних ускладнень та контролю за динамікою відновлення гемостатичного гомеостазу після інфекції. Основні результати дослідження впроваджені в роботу лікувально-профілактичних закладів, а саме використані в медичному центрі «Андроцентр» (м. Обухів), медичному центрі «Біомед» (м. Київ) та медичному центрі ТОВ «Медбуд-Клінік» (м. Київ) для розробки персоналізованих підходів до лікування пацієнтів з розсіяним склерозом та хронічним коронарним синдромом, які перенесли COVID-19, включаючи моніторинг факторів системи гемостазу (акти впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи від 10.12.2023 р., 24.10.2024 р., 12.12.2024 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням. Дисертантом самостійно сформульовано концепцію роботи, обґрунтовано мету та завдання роботи, розроблено методологію експериментів, проведено пошук і аналіз літературних джерел. Автор зробив основний особистий внесок у дисертаційну роботу на всіх етапах її практичного виконання, обговорення та узагальнення результатів, формулювання висновків, написання статей і тез доповідей. Формування стратегії досліджень було здійснено спільно з завідувачем кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та

медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка д-р біол. наук Савчуком О.М. Дисертант висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу у проведенні експериментів, співучасть яких у виконанні роботи відображена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи було представлено на 1st International scientific and practical online conference «Modern achievements of experimental, clinical, environmental biochemistry and molecular biology» (Kharkiv, Ukraine, 7 March 2024); XXI International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: Advancements in Life Sciences» (Kyiv, Ukraine, 24-26 April 2024); 7th International scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology (Dnipro, Ukraine, 3-4 October 2024); науково-практичній конференції за участю молодих вчених «Організаційно-прикладні аспекти клінічної та профілактичної медицини в умовах сучасних викликів і загроз: проблеми та перспективи інноваційного розвитку» (Київ, Україна,30-31 жовтня 2024); 65th international conference for students of Physics and Natural sciences «Open Readings 2023» (Vilnius, Lithuania, 18-21 April 2023); Актуальні питання біології та медицини (Лубни, Україна, 2 червня 2023); 20th Horizons in Molecular Biology (Gottingen, Germany, 11-14 September 2023).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 статтю: 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.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень, заключення, висновків та списку використаних літературних

джерел, який нараховує 378 найменувань. Робота викладена на 389 сторінках (основна частина становить 320 стр.), містить 15 таблиць та 69 рисунків.

РОЗДІЛ 1
ПОСТКОВІДНИЙ СИНДРОМ: ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ТА ГЕМОСТАТИЧНІ ПОРУШЕННЯ

1.1. Ключові механізми розвитку ускладнень у постковідний період

На початок 2024 року було зареєстровано понад 770 млн. підтверджених випадків COVID-19 [9]. Відповідно, з моменту першого зареєстрованого випадку інфікування вірусом SARS-CoV-2 у 2019 році відбувалося стрімке поширення захворювання COVID-19 у світі, що й спричинило пандемію. Однак захворювання COVID-19 – це не єдина проблема, з якою зіткнулися науковці та медики. Нині не менше уваги зосереджено на проблемі пост-COVID-19 синдрому. За оцінкою ВООЗ серед людей, які перехворіли COVID-19, приблизно 10-20% мають негативні наслідки перенесеного захворювання COVID-19 [10]. Таким чином наукові зусилля все більше і більше охоплюють тематику пост-COVID-19 станів з метою встановлення їх етіології, симптомів та лікування.

Попри те, що мільйони людей у світі страждають від симптомів Long COVID, однією з найпомітніших його особливостей залишається надзвичайна клінічна гетерогенність симптоматичних проявів [11]. Це частково зумовлено тим, що термін охоплює низку різних клінічних станів, кожен з яких має специфічні патобіологічні механізми. З часом сформувалися кілька назв, які використовуються різними авторами - «Long COVID» і «Long Haul COVID» (терміни, запропоновані пацієнтами), «Post-Acute Sequelae of COVID-19» (визначення Національного інституту здоров'я США та Центрів контролю та профілактики захворювань) та «Post-COVID-19 Condition» (термін ВООЗ). Незважаючи на різні походження, між цими підходами до класифікації досягнуто певного консенсусу: усі вони описують загальну клінічну картину, а саме - наявність тривалих симптомів у пацієнтів, які перенесли гостру інфекцію SARS-

CoV-2, але продовжують відчувати симптоматику протягом кількох місяців після завершення гострої фази хвороби.

Найчастіше у літературі можна зустріти термін Long COVID, під яким розуміють хронічний мультисистемний синдром порушень, що розвивається у пацієнтів після перенесеної COVID-19 [12]. Згідно з визначенням Центрів з контролю та профілактики захворювань США (CDC) та Національного інституту здоров'я США (NIH), Long COVID охоплює патологічні стани, що тривають понад чотири тижні після первинного інфікування. Водночас, Національний інститут охорони здоров'я та якості медичної допомоги Великої Британії (NICE) класифікує постковідний синдром (Long COVID, L-C19) за двома категоріями: 1) «тривалі симптоми COVID-19» - за наявності симптомів у період від 4 до 12 тижнів після початку захворювання, та 2) «постковідний стан» - якщо симптоматика зберігається понад 12 тижнів від моменту початку хвороби. Окрім цього, в науковій та клінічній літературі використовуються й інші терміни, що відображають тривалість та стійкість симптомів, зокрема: «постгострі наслідки інфекції SARS-CoV-2», «персистуючі симптоми COVID-19», «постковідний синдром» (PCS), «довготривалі наслідки» або «постковідні прояви» [13,14].

Важливо зазначити, що у пацієнтів із постковідним синдромом вірус більше не виявляється в носовій порожнині. Водночас, наявність вірусного білка та/або РНК SARS-CoV-2 була зафіксована у тканинах репродуктивної та серцево-судинної систем, головному мозку, м'язах, очах, нюховому епітелії, лімфатичних вузлах, апендиксі, молочній залозі, печінці, легенях, а також у плазмі крові, мікробіомі кишечника та сечі [15,16].

У своїй роботі ми надалі будемо використовувати термін «постковідний синдром чи період», оскільки він є одним з найбільш поширених у медичних колах, хоча ще раз наголошуємо, що всі вищезазначені терміни описують один і той самий клінічний феномен.

З огляду на широкий спектр клінічної симптоматики постковідного синдрому, достовірне визначення самого синдрому, його клінічних проявів, патогенетичних чинників та часових меж залишається складним завданням. За

оцінками, щонайменше 65 мільйонів осіб у світі страждають на Long COVID [17]. Клінічні спостереження свідчать, що приблизно 87% пацієнтів, які перенесли COVID-19 та були виписані зі стаціонару, зберігають принаймні один симптом Long COVID протягом 60 днів. З них 32% мають один або два симптоми, а 55% - три або більше [18,19]. Найбільш поширеними симптомами є: втома (53,1%), задишка (43,4%), біль у суглобах (27,3%) та біль у грудях (21,7%) [20,21]. Іншими, менш поширеними симптомами є кашель, шкірні висипання, серцебиття, головний біль та парестезії (відчуття "голок і поколювання"). Дослідження показують, що найчастішими проявами постковідного синдрому (Long COVID) є хронічна втома, когнітивні порушення (так званий "туман у голові"), задишка, а також болі у суглобах і м'язах [9]. Додаткові симптоми пов'язані з порушеннями функцій серцево-судинної, травної, дихальної, репродуктивної або шкірної систем. Згідно з нещодавнім метааналізом, п'ятьма найпоширенішими фізіологічними проявами постковідного синдрому є втома, головний біль, порушення уваги, випадіння волосся та задишка; дещо рідше зустрічаються шкірні висипання, серцебиття та діарея [22].

Як і у випадку з іншими поствірусними захворюваннями, для більшості пацієнтів із Long COVID характерне погіршення симптомів після фізичного чи розумового навантаження - так званий синдром постнавантажуваного загострення (PESE) [17,23]. Крім того, приблизно 50% осіб із Long COVID відповідають критеріям діагностики міалгічного енцефаломієліту/синдрому хронічної втоми (ME/CFS) [24,25].

Перелік симптомів пост-COVID-19 та їх частоту узагальнено на рисунку 1.1 [26].

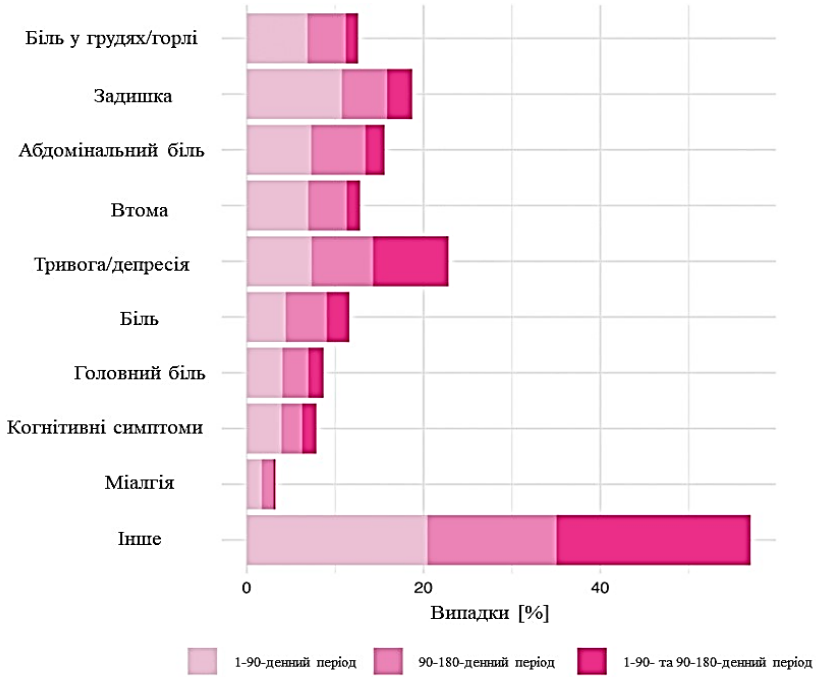


Рис. 1.1. Перелік та частота симптомів за розвитку пост-COVID-19 синдрому [26]

Окрім клінічних симптомів та змін у рівнях біохімічних маркерів, постковідний синдром впливає на низку регуляторних процесів, зокрема на транскрипційний рівень. Це пов'язано з тим, що під час гострої фази інфекції вірус «захоплює» транскрипційно-трансляційний апарат клітини-господаря, аби забезпечити масове продукування власних білків і РНК, водночас пригнічуючи трансляцію мРНК самої клітини [27]. Наприклад, у пацієнтів, які звернулися за медичною допомогою з приводу постковідного синдрому, через 24 тижні після інфікування виявлено стійкі зміни у транскриптомі крові: диференційовану експресію продемонстрували 446 генів, що достовірно відрізнялися від профілю осіб, які не мали постковідних симптомів.

Комплексний аналіз сигнальних шляхів у різних групах пацієнтів було виокремлено чотири типи транскриптомних профілів. Перша група пацієнтів характеризувалася транскриптоном, пов'язаними з Th1-подібними $CD4^+$ Т-клітинами, М1-подібними прозапальними моноцитами, цитотоксичними ефекторами з-поміж $CD8^+$ Т-лімфоцитів та NK-клітин. У другій групі домінували Th2-подібні $CD4^+$ Т-клітини, М2-подібні (протизапальні) моноцити і сигнатури

плазматичних В-клітин. У третій групі було виявлено проміжний імунний статус, що поєднував характеристики першого та другого типів. Четверта група демонструвала ознаки наївного імунного профілю - з переважанням сигнатур наївних Т- і В-клітин, а також «спокійних» (resting) NK-клітин [28-30].

Клінічна картина постковідного синдрому визначається певними факторами ризику та їх поєднанням. Одними з найсильніших прогностичних маркерів розвитку Long COVID є кількість і характер симптомів у період гострої інфекції. Зокрема, ймовірність розвитку Long COVID істотно зростає у пацієнтів, які мали понад п’ять симптомів протягом першого тижня хвороби - незалежно від віку чи статі [31-33]. До симптомів, які є особливо прогностично значущими, належать втома, головний біль, задишка та м’язові болі [32,33]. Іншими факторами ризику розвитку Long COVID є вік (ризик становить 47% серед осіб віком понад 50 років), а також супутні захворювання, зокрема артеріальна гіпертензія, дисліпідемія, серцево-судинні хвороби, порушення метаболічної та ендокринної регуляції - зокрема індекс маси тіла (ІМТ) понад 30 та цукровий діабет 2 типу (ЦД2) [34,35]. Для жінок загалом характерна вища поширеність постковідного синдрому, але нижча смертність, менш виражені запальні реакції, вищий рівень лімфоцитів та швидша продукція антитіл порівняно з чоловіками [36].

Попри інтенсивні дослідження, патогенез посковідного синдрому залишається до кінця не з’ясованим. Водночас, існують низка гіпотез, які передбачають участь різних патофізіологічних механізмів, серед яких:

- персистенція вірусу та тривала активація імунної системи, зокрема Т-лімфоцитів [37];
- реактивація латентних інфекцій;
- аутоімунні процеси;
- дисбіоз мікробіоти;
- утворення мікротромбів та персистентне запалення судинного русла;
- залишкові тканинні пошкодження.

Перераховані вище чинники можна згрупувати у дві категорії: ті, що обумовлені безпосередньо впливом вірусу чи його окремих фрагментів та ті, що пов'язані з відповіддю організму-хазяїна.

У ряді випадків причиною розвитку постковідних ускладнень може слугувати персистенція вірусу SARS-CoV-2. Відомо, що віруси можуть зберігатися в організмі хазяїна у хронічно літичній та/або латентній формі після початкової фази інфекції [38-43]. Персистуючі інфекції характеризуються нездатністю організму повністю елімінувати мікроорганізм або його фрагменти після первинного інфікування [42]. Деякі віруси, такі як вірус вітряної віспи та оперізувального лишаю (VZV), ВІЛ, вірус гепатиту С (HCV), вірус Епштейна–Барр (EBV) і вірус папіломи людини (HPV), добре відомі своєю здатністю тривало персистувати в організмі без прояву патологічних ознак [40]. На основі таких даних було сформульовано гіпотезу про присутність в організмі-хазяїна латентних форм SARS-CoV-2 після закінчення початкової фази інфекції. Наразі цю гіпотезу було підтверджено низкою доказів того, що у деяких пацієнтів із постковідним синдромом вірус SARS-CoV-2 може зберігатися в тканинних резервуарах після завершення гострої фази інфекції [41-44]. Ці приховані вірусні резервуари можуть ініціювати повторну імунну відповідь, що сприяє збереженню симптомів. Через декілька місяців після інфікування мРНК та спайковий білок SARS-CoV-2 було виявлено в травній системі та сечовивідному тракті пацієнтів із Long COVID методом імунофлуоресценції та ПЛР-аналізу біоптатів кишківника [45]. Інші дослідження виявили наявність SARS-CoV-2 у багатьох органах і в калових масах, що вказує на тривале виділення вірусу [46–48]. Реалізація впливу вірусу згідно цієї концепції включає наступний перебіг подій: вірус SARS-CoV-2 проникає в клітини організму через рецептори ангіотензинперетворювального ферменту 2 (ACE2) та трансмембранної серинової протеази 2 (TMPRSS2), а також за участі позаклітинного виментину. S1-субодиниця вірусного спайкового білка відповідає за зв'язування з рецепторами, тоді як S2-субодиниця забезпечує проникнення та злиття вірусу з мембраною клітини [49-50]. Після проникнення до клітини починається

реплікація вірусу [51-53]. Збірка віріонів відбувається у проміжному компартменті між ендоплазматичним ретикулумом і комплексом Гольджі або безпосередньо в апараті Гольджі, після чого вірус покидає клітину через біосинтетичний секреторний шлях. Крім того, SARS-CoV-2 може ховатися в позаклітинних везикулах, основна функція яких полягає у транспортуванні молекулярного вмісту до сусідніх або віддалених клітин з метою підтримання гомеостазу [54,55]. У такий спосіб вірус SARS-CoV-2 може повторно атакувати різні тканини й органи через систему кровообігу.

Останні дослідження показують, що причиною розвитку пост-COVID-19 може бути бактеріофагоподібна поведінка SARS-CoV-2. Раніше вважалося, що вірус SARS-CoV-2 здатен до реплікації та виживання виключно в еукаріотичних клітинах ссавців. Втім, нещодавно було висунуто припущення, що SARS-CoV-2 може інфікувати та реплікуватися також у кишкових бактеріях, що потенційно вказує на його здатність діяти подібно до бактеріофага [56-57]. Така форма вірусної персистенції може мати особливу стійкість і патогенний потенціал, а також частково пояснювати розвиток дисбіозу кишечника у пацієнтів із постковідним синдромом. Імовірна бактеріофагоподібна активність SARS-CoV-2 може прямо сприяти надмірній реплікації окремих бактеріальних штамів, порушуючи баланс мікробіоти кишечника. Це, у свою чергу, здатне посилювати хронічне запалення, ендотеліальну дисфункцію та гіперкоагуляційні явища, характерні для постковіду. Є дані, які доводять, що COVID-19 може спричиняти дизбіоз мікробіому та віробіому. Зокрема, одне з досліджень показало, що мікробіом бронхоальвеолярної рідини у пацієнтів з COVID-19 мав підвищену частку патогенних бактерій, а також більшу кількість представників нормальної мікрофлори ротової порожнини та верхніх дихальних шляхів порівняно зі здоровими особами. Крім того, кишковий мікробіом пацієнтів з COVID-19 характеризується зростанням кількості умовно-патогенних мікроорганізмів і зменшенням частки корисних бактерій [58].

У проспективному дослідженні Su та співавт. [44] для вивчення довготривалих змін у кишковому мікробіомі пацієнтів із COVID-19 було

застосовано метод метагеномного секвенування типу «shotgun». Встановлено, що дисбіоз кишкової мікрофлори зберігався у 78,7% пацієнтів із постгострим синдромом COVID-19 (PASC) навіть через 14 місяців спостереження. У межах іншого дослідження Liu та співавт. [45] проведено багатодоменний аналіз мікробіому, за результатами якого кластер 1 - із переважанням *Ruminococcus gnavus*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Aspergillus flavus*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* (*C. albicans*), мікобактеріофага MyraDee та вірусу *Pseudomonas Pf1* - виявився достовірно асоційованим як із тяжким перебігом COVID-19, так і з розвитком PASC. Отримані результати вказують на потенційну діагностичну та прогностичну цінність багатодоменного аналізу мікробіоти у пацієнтів із COVID-19.

Дизбіоз мікробіому або віробіому може порушувати гомеостаз і функціонування сигнальних шляхів організму-хазяїна, сприяючи розвитку хронічних захворювань. Такі зміни, як правило, супроводжуються запаленням, яке може спричинити дисфункцію та руйнування епітеліального бар'єру кишечника [59]. Унаслідок цього зростає проникність епітелію, що дає змогу патогенам транслокуватися в кровотік, де їх присутність може провокувати системні запальні реакції. Такі процеси здатні спричинити ендотеліальні ушкодження та гіперкоагуляцію [60].

Один з механізмів виникнення постковідного синдрому та формування відповідних симптомів може включати реактивацію латентних вірусів. Відомо, що, організм людини може бути носієм латентних вірусів, які тривалий час зберігаються в неактивному стані без прояву патологічних ознак [40]. Проте у разі ослаблення, порушення чи дизрегуляції імунної відповіді ці латентні віруси можуть знову активізуватися, змінюючи експресію генів, синтез білків та механізми імунної регуляції в організмі людини [40]. Цей феномен було підтверджено як під час, так і після перенесеної інфекції COVID-19, коли спостерігалася реактивація раніше латентних вірусів, зокрема вірусу Епштейна–Барр, вірусу простого герпесу та вірусу гепатиту С, у різних органах [61,62]. Ці віруси асоціюються з розвитком низки хронічних патологій, зокрема хвороби

Альцгеймера, злоякісних новоутворень, ревматоїдного артриту та цукрового діабету 1 типу (ЦД1), що може частково пояснити розвиток хронічних захворювань у деяких пацієнтів після перенесеної COVID-19-інфекції.

Ще з періоду перших зареєстрованих випадків виникнення постковідного синдрому зроблено припущення щодо вагомої ролі хронічного запалення та імунної дисрегуляції у патогенезі постковідних ускладнень. У відповідь на проникнення вірусу SARS-CoV-2 у гостру фазу COVID-19 імунна система активує політклональні Т-лімфоцити та стимулює вивільнення різноманітних прозапальних молекул, зокрема цитокінів, інтерлейкінів та хемокінів [63,64]. Цей процес відомий як «цитокіновий шторм» і є характерною імунопатологічною ознакою COVID-19. У міру його прогресування в крові різко підвищуються рівні запальних маркерів, таких як сироватковий амілоїд А, фактор фон Віллебранда, інтерлейкіни IL-6, IL-8, IL-10 та фактор некрозу пухлин альфа. Крім того, доведено, що тяжкий перебіг COVID-19 супроводжується дефіцитом Т- і В-лімфоцитів, відомим як лімфопенія. Такий стан може, своєю чергою, призводити до гіперзапалення, оскільки лімфоцити беруть участь у завершенні запальної відповіді після інфекції. Зменшення кількості Т- і В-клітин також тісно пов’язане з персистенцією вірусу SARS-CoV-2, що може додатково сприяти хронічній імунній активації у постковідний період.

Говорячи про можливі причини виникнення збереження ускладнень у постковідний період не можна оминути увагою розвиток аутоімунних захворювань у відповідь на бактеріальні та вірусні інфекції. Існує кілька механізмів, що пояснюють виникнення аутоімунних реакцій внаслідок інфекцій. До них належать поширення епітопів, активація за механізмом «спостерігача» (bystander activation), молекулярна мімікрія та активація антиген-презентуючих клітин [65]. Наприклад, розвиток цукрового діабету 1 типу (ЦД1) пов'язують із вірусом Коксакі та ентеровірусами [66,67]. Існують припущення щодо зв’язку вірусу гепатиту С із системним червоним вовчаком, а також про участь антигенів бактерій роду *Proteus* у механізмах молекулярної мімікрії, що лежать в основі патології ревматоїдного артриту [68,69].

Подібно до прееклампсії, антіфосфоліпідні аутоантитіла було виявлено у 52% зразків сироватки госпіталізованих пацієнтів; їх наявність напряму корелює з гіперактивністю нейтрофілів і тяжчим клінічним перебігом захворювання. Ряд досліджень також показали присутність у кровотоці пацієнтів аутоантитіл до інтерферонів, нейтрофілів і циклічних цитрулінованих пептидів, антинуклеарних антитіл, антинейтрофільних цитоплазматичних антитіл, антіфосфоліпідних антитіл, а також антитіл, спрямованих проти різних позаклітинних антигенів [2,49,50,70]. Крім того, у сироватці крові пацієнтів із COVID-19 було виявлено функціональні аутоантитіла до рецепторів, зв'язаних із G-білками, що асоціюються з тяжкістю перебігу захворювання. У пілотному дослідженні показано, що нейтралізація таких аутоантитіл сприяла покращенню капілярного кровотоку та зменшенню втоми після перенесеної COVID-19-інфекції. Dobrowolska та співавт. [25] виокремлюють шість основних груп антитіл: 1) аутоантитіла до компонентів імунної системи; 2) аутоантитіла до структур серцево-судинної системи; 3) тиреоїдні аутоантитіла; 4) аутоантитіла, специфічні для ревматичних захворювань; 5) антитіла до рецепторів, з'єднаних із G-білками; 6) інші типи аутоантитіл.

Незважаючи на те, що дослідження спрямовані на вивчення утворення аутоантитіл при різноманітних патологічних станах, зокрема вірусних інфекціях, таких як SARS-CoV-2, є досить поширеними, точні молекулярні механізми порушення імунологічної толерантності до власних антигенів залишаються недостатньо вивченими. Утворенню аутоантитіл можуть сприяти такі чинники, як інтенсивність імунної відповіді, запальні процеси (зокрема цитокіновий шторм) або вірусні білки. Крім того, варіабельність клінічних симптомів і характер перебігу інфекції, включно з генетичними особливостями вірусних варіантів, також можуть впливати на рівень і спектр аутоантитіл. Існуючі наукові дані вказують на те, що ці процеси є багатофакторними: в більшості випадків одночасно активуються кілька патогенетичних шляхів, які сприяють генерації пулу циркулюючих аутоантитіл. Нижче наведено основні механізми, що

потенційно можуть пояснювати розвиток аутоантитіл при інфекції, спричиненій SARS-CoV-2.

1). Наявність природних аутоантитіл, які виявляються у більшості хребетних і, ймовірно, відіграють важливу роль у забезпеченні нормальних фізіологічних процесів. Вважається, що вони головним чином походять із субпопуляції B1-клітин. Ці аутоантитіла, як правило, характеризуються низькою специфічністю та поліспецифічністю, тобто здатністю зв'язуватися як з ендогенними, так і з екзогенними антигенами [71,72]. Існує гіпотеза, що мережі природних антитіл є еволюційними залишками, які передували появі специфічних адаптивних імунних відповідей [73].

2). Молекулярна мімікрія - у найпростішому розумінні цей феномен полягає в тому, що певні екзогенні антигени, зокрема вірусні білки, включаючи білки SARS-CoV-2, мають спільні епітопи з ендогенними антигенами [74,75]. Антитіла, утворені проти таких ділянок з високим ступенем гомології, у деяких випадках можуть бути крос-реактивними й набувати патогенного потенціалу щодо організму-хазяїна. Згідно з результатами *in silico* досліджень, численні лінійні послідовності були ідентифіковані як спільні для нуклеокапсидного фосфопротеїну, мембранного/матричного білка та спайкового глікопротеїну поверхні (Spike-білка) SARS-CoV-2, а також людських білків, що є мішенями для автоімунних реакцій [76,77].

Факт молекулярної мімікрії підтверджено для ряду вірусів, зокрема вірусу грипу, вірусу Зіка, вірусу Епштейна–Барр та інших [31]. Наприклад, мімікрія між ядерним антигеном EBV і білком центральної нервової системи - молекулою адгезії гліальних клітин - зумовлює утворення крос-реактивних антитіл, які виявляються приблизно у 25% пацієнтів із розсіяним склерозом [78]. Важливо зазначити, що молекулярна мімікрія не є бінарною моделлю за принципом «усе або нічого»; на процеси обробки антигенів та презентації пептидів можуть впливати як генетичні чинники, зокрема гаплотипи HLA, так і чинники довкілля, зокрема інфекції.

3). Антиідіотипові аутоантитіла (Ab_2), що утворюються проти варіабельної ділянки іншого антитіла (Ab_1). Такі антитіла (Ab_2) можуть зберігати структурні детермінанти, подібні до оригінального антигену, і в окремих випадках здатні зв'язувати відповідну мішень. У контексті спайкового білка SARS-CoV-2 у літературі можна знайти гіпотезу, згідно з якою антитіла до спайкового білка виступають як первинні антитіла (Ab_1), тоді як новоутворені антиідіотипові антитіла (Ab_2) здатні зв'язувати не лише антитіла Ab_1, але й потенційно білок ACE2.

4). Поширення епітопів (epitope spreading), зокрема інтермолекулярне поширення, виникає тоді, коли тривалий запальний процес, зокрема індукований вірусною інфекцією, спричиняє вивільнення аутоантигенів, які за нормальних умов залишаються ізольованими. Внаслідок цього специфічність Т- та В-лімфоцитів може поширюватися на власні антигени, які зазвичай не експонуються імунній системі. Хоча механізм поширення епітопів було виявлено за низки вірусних інфекцій, його роль у формуванні аутоантитіл, пов'язаних із інфікуванням SARS-CoV-2, залишається недостатньо підтвердженою. Водночас тканинні ушкодження, виникнення яких спостерігається при тяжкому перебігу COVID-19 дозволяють припустити, що механізм поширення епітопів є потенційно дійсним поясненням для виникнення окремих типів аутоантитіл, виявлених після перенесеної інфекції SARS-CoV-2.

5). Активація за механізмом «свідка» (bystander activation) розглядається як один із можливих механізмів активації Т- або В-клітин незалежно від специфічності їхніх BCR або TCR-рецепторів [79,80]. Цей антиген-незалежний шлях активації опирається на дію кількох ко-стимулювальних сигналів, які порушують залежність між активацією рецепторів BCR/TCR та впізнаванням відповідного антигену. До таких сигнальних чинників належать ліганди ко-стимулювальних рецепторів, патоген-асоційовані молекулярні патерни, а також цитокіни та хемокіни. Усі ці медіатори можуть продукуватися під час інфекції, створюючи локальне прозапальне мікросередовище, здатне ініціювати активацію сусідніх лімфоцитів за механізмом «свідка». Хоча прямих доказів активації

аутоімунних процесів за механізмом «свідка» при інфекції SARS-CoV-2 немає, той факт, що тяжкі форми ковіду супроводжуються масивним вивільненням прозапальних цитокінів, не виключає можливості залучення цього механізму для частини пацієнтів.

Більшість досліджень, присвячених вивченню аутоантитіл у пацієнтів, інфікованих SARS-CoV-2 або таких, що перебувають у фазі одужання після COVID-19, зосереджуються переважно на особах із тяжким клінічним перебігом з метою оцінки їх потенційної ролі в розвитку ускладнень. Відповідно, основна частина наявних публікацій стосується виявлення аутоантитіл саме у госпіталізованих хворих із тяжкими формами COVID-19, тоді як інформація щодо пацієнтів з легким або безсимптомним перебігом залишається обмеженою. Наразі чіткий причинно-наслідковий зв'язок між утворенням аутоантитіл та ступенем тяжкості захворювання ще не встановлено і потребує подальших досліджень.

У рамках нещодавнього дослідження було здійснено стратифікацію учасників за ступенем тяжкості перебігу COVID-19, включаючи контрольну групу здорових осіб. У результаті було встановлено, що з віком і збільшенням клінічної тяжкості інфекції зростає частота виявлення аутоантитіл, зокрема до кардіоліпіну, клаудину та тромбоцитарних глікопротеїнів [81]. З патофізіологічної перспективи тяжка форма інфекції SARS-CoV-2 може спричиняти тимчасове порушення імунної толерантності з боку Т-лімфоцитів. Як показали результати дослідження Woodruff та співавт., тяжкий перебіг COVID-19 асоціюється з розширенням популяцій В-лімфоцитів, що продукують антитіла з низьким ступенем соматичних гіпермутацій; після одужання ці популяції зменшуються, що може свідчити про транзиторне послаблення селективного тиску в імунній системі [82]. Подібні імунологічні зміни спостерігалися також при гострому респіраторному дистрес-синдромі, спричиненому бактеріальною пневмонією, що вказує на ймовірну універсальність цього механізму як частини загальної фізіологічної відповіді на тяжкі інфекційні ураження легень.

Варто підкреслити, що не всі аутоантитіла є патогенними; деякі з них, ймовірно, становлять інтегральну частину нормальної імунної фізіології. Так, у дослідженні Sjöwall та співавт. продемонстровано, що у пацієнтів із системним червоним вовчаком зниження рівня аутоантитіл до фактора некрозу пухлин альфа корелювало з загостренням перебігу захворювання [83]. Питання щодо того, чи мають аутоантитіла, асоційовані з інфекцією SARS-CoV-2, регуляторне значення у перебігу вірусної інфекції або в післяінфекційних фізіологічних процесах, залишається відкритим, проте становить вагомий науковий інтерес і потребує подальших досліджень.

Для постковідного синдрому характерним є персистуючі порушення функції внутрішніх органів, які не корелюють безпосередньо з тяжкістю первинного перебігу хвороби і можуть бути наслідком поєднання перерахованих вище механізмів. Численні дослідження виявили наявність уражень багатьох органів, асоційованих із COVID-19. У проспективному дослідженні, проведеному серед осіб із низьким ризиком, яке охоплювало оцінку стану серця, легень, печінки, нирок, підшлункової залози та селезінки, було встановлено, що у 70% з 201 пацієнта спостерігалося ураження щонайменше одного органа, а у 29% - мультиорганна патологія [84]. У подальшому річному спостереженні, проведеному тією ж дослідницькою групою за участю 536 осіб, виявлено, що 59% мали ознаки ураження одного органа, а 27% - множинне ураження органів [85].

Кардіологічні порушення у постковідний період включають міокардити, порушення ритму, ендотеліальну дисфункцію та гіпотензивні або гіпертензивні реакції. Описано випадки фіброзу міокарда та зниження фракції викиду, що ймовірно пов’язані як з прямою цитопатичною дією вірусу, так і з аутоімунними механізмами та гіпоксією внаслідок мікросудинного ураження. Аналіз бази даних Департаменту у справах ветеранів США (VA), що охоплював понад 150 000 осіб протягом одного року після інфікування SARS-CoV-2, продемонстрував достовірно підвищений ризик розвитку широкого спектра серцево-судинних захворювань — включно із серцевою недостатністю, аритміями та інсультом -

незалежно від тяжкості первинного перебігу COVID-19 [86]. Дані магнітно-резонансної томографії серця підтвердили наявність ознак міокардіального ураження у 78% зі 100 обстежених пацієнтів, які перенесли COVID-19 (середній термін обстеження - 71 день після інфекції) [87]. Аналогічні порушення виявлено у 58% осіб із постковідним синдромом, які проходили МРТ через 12 місяців після захворювання [88], що свідчить про потенційно стійкий характер ураження серцевого м'яза.

Навіть після клінічного одужання в багатьох пацієнтів зберігається задишка, зниження дифузійної здатності легень, фіброзні зміни, підтверджені на КТ. Ураження альвеолярного епітелію, персистенція імунних клітин та дисрегульована репарація сприяють формуванню інтерстиціального фіброзу.

Неврологічні та когнітивні симптоми - когнітивні порушення, головний біль, депресія, невропатії - є однією з ключових клінічних характеристик постковідного синдрому і вказують на ураження як центральної, так і периферичної нервової системи. Можливі механізми розвитку неврологічних порушень при постковідному синдромі включають нейрозапалення, судинне ушкодження на тлі коагулопатії та ендотеліальної дисфункції, а також безпосереднє ураження нейронів. Результати низки досліджень свідчать про активацію сигнальних шляхів, подібних до тих, що спостерігаються при хворобі Альцгеймера, у пацієнтів із Long COVID. Також виявлено пептиди, здатні до самозбірки в амілоїдні агрегати з нейротоксичними властивостями, широке поширення нейрозапальних процесів, а також зниження метаболічної активності у ділянках головного мозку та стовбура, що корелює зі специфічною клінічною симптоматикою [89,90]. Аномальні показники спинномозкової рідини були зафіксовані навіть у не госпіталізованих осіб із постковідними неврологічними проявами. Крім того, встановлено асоціацію між молодшим віком пацієнтів і пізнім початком неврологічних симптомів.

Окрім дихальної, серцево-судинної та нервової систем, постковідний синдром асоціюється з дисфункцією низки інших органів, зокрема: нирок - відзначаються ознаки субклінічного зниження швидкості клубочкової фільтрації,

а також порушення канальцевої реабсорбції, що вказує на ранні прояви нефронної дисфункції; печінки - описані порушення біохімічних показників, ознаки стеатозу та транзиторного цитолізу, що свідчить про залучення гепатоцитів у постінфекційне запалення; ендокринної системи - спостерігаються випадки дисрегуляції функції щитоподібної залози (у тому числі тиреоїдиту) та вторинної надниркової недостатності, що можуть зумовлювати неспецифічні симптоми втоми, нестабільності настрою та порушення метаболізму.

1.2. Основні причини виникнення порушень у функціонуванні системи гемостазу у постковідний період

Серед найбільш поширених системних ускладнень, спричинених COVID-19, особливої уваги заслуговують коагулопатії, що є доволі частим клінічним випадком під час лікування захворювання та у пост-COVID-19 періоді. Коагулопатія, асоційована з COVID-19 – це комплексний синдром, вперше ідентифікований в Італії за допомогою стандартних коагулометричних тестів [71]. Ключовими ознаками коагулопатії, асоційованої з COVID-19, є підвищене утворення тромбіну, тромбоцитоз на ранніх стадіях, тромбоцитопенія в пізніх важких станах, загальмований фібриноліз і високі рівні D-димеру. Визначено, що потенційними наслідками коагулопатії, пов’язаної з COVID-19, є порушення згортання крові, що вражають різні ділянки тканин та органів і варіюються від шкірного васкуліту до інфаркту міокарда. Як наслідок, циркулюючі мікро- та/або макротромби можуть призвести до ураження багатьох органів або недостатності [72, 73].

Наразі етіологія затяжної коагулопатії, спричиненої COVID-19, достеменно не вивчена. Вважається, що тріада Вірхова (ендотеліальна дисфункція, венозний стан і гіперкоагуляція) лежить в основі коагулопатії, пов’язаної з COVID-19. Відповідно, коагулопатія COVID-19 є моделлю імунотромбозу, який підтримується декількома механізмами, такими як дисбаланс ендотелію,

активація комплементу, гіперпродукція прозапальних цитокінів, посилене утворення позаклітинних пасток нейтрофілів, активація моноцитів і тромбоцитів, синтез прокоагулянтних аутоантитіл, порушення фібриноліз і зниження рівнів А дезінтегрин і металопротеаза з мотивом тромбоспондину 1 типу 13 (A disintegrin and metalloprotease with thromboSpondin type 1 motif 13; ADAMTS13) з відносним збільшенням великих мультимерів фактор фон Віллебранда (von Willebrand factor; vWF). Відповідно до виявлення підвищених циркулюючих рівнів маркерів ендотеліальних порушень, було припущено, що залучення ендотелію відіграє центральну роль у підтримці тромбофілічного стану під час COVID-19 [74].

На сьогодні окреслено три ключові, потенційно взаємопов'язані гіпотези, що можуть пояснювати розвиток гіперкоагуляційного стану у постковідний період: по-перше, це стійкі структурні порушення, насамперед ендотеліальні ушкодження, які сформувалися внаслідок гострої фази інфекції; по-друге, імунопатологічні зміни, спричинені хибною або дизрегульованою імунною відповіддю; по-третє, наявність персистуючого вірусного резервуару, що підтримує хронічне низькорівневе запалення. Всі три механізми не є взаємовиключними та, ймовірно, взаємно посилюють один одного, формуючи основу для тривалого запального та тромботичного фону при Long COVID.

Функціонування ендотелію судин є критичною ланкою у стабілізації, регуляції та підтримці нормального гомеостазу шляхом регуляції функціонування імунної системи, запалення та вазомоторного тонусу. Зокрема, ендотеліальні клітини виконують роль «сторожових», які вистилають внутрішній шар кровоносних судин, забезпечуючи функціонування мікро- та макросудин шляхом сприйняття сигналів патогенів/небезпеки та секреції вазоактивних молекул. Отож ендотеліальні клітини контролюють коагуляційну систему, забезпечуючи нетромбогенну внутрішню поверхню для підтримки нормального кровотоку без системного згортання або кровотечі. Відповідно, дестабілізація ендотеліальної складової може стати тригером розвитку ендотеліальної

дисфункції та поліорганних ураження, включаючи порушення згортання крові [91].

У багатофакторному аналізі ендотеліальна дисфункція була незалежним фактором ризику розвитку патологічних станів після COVID-19. Підтверджено, що у патогенезі таких порушень може брати участь стійка васкулопатія. COVID-19 пов'язаний із важким судинним запаленням як у легеневій, так і позалегеневій судинній системі, як на макро-, так і на мікросудинному рівні [92]. Це включає дифузне пошкодження ендотелію з піроптозом і апоптозом, а також прокоагулянтну зміну ендотелію судин. Все більше доказів свідчать про те, що інфекція SARS-CoV-2 призводить до розвитку станів ендотеліальної дисфункції, серед яких знижена біодоступність оксиду азоту, окислювальний стрес, пошкодження ендотелію, порушення бар'єрної функції глікокаліксу, гіперпроникність, запалення/адгезія лейкоцитів, старіння, гіперкоагуляція, тромбоз та багато інших.

Дослідження демонструють, що інфекція SARS-CoV-2 корелює зі зниженою експресією тромбомодуліну і рецептора ендотеліального ПС на ендотелії судин, і що підвищена коагуляція та знижений фібриноліз сприяють коагулопатії в легенях пацієнтів з COVID-19 [93]. Посмертне дослідження легеневих судинних русл пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 продемонструвало велике пошкодження ендотелію, судинний тромбоз із мікроангіопатією, оклюзію альвеолярних капілярів та ознаки неоангіогенезу. Порівняно з грипом мікротромбоз капілярів був у 9 разів більш поширеним при COVID-19 з 2,7 рази більшою кількістю нових судин [94].

Нещодавні дослідження показали, що ендотеліальне запалення (ендотеліїт), яке виникає при COVID-19, може мати довготривалі наслідки для судинної функції [95]. У пацієнтів із постковідним синдромом спостерігаються ушкодження та дисфункція ендотелію, які є надійними маркерами цього стану [96]. Деякі біомаркери ендотеліальних клітин, зокрема фактор фон Віллебранда і фактор VIII, виявляються значно підвищеними у пацієнтів, які одужують після COVID-19. Через вісім місяців після перенесеної легкої або середньої за

тяжкістю форми COVID-19 у хворих з Long COVID також виявлено дизрегуляцію інших ендотеліальних маркерів, таких як ендотелін-1 та ангіопоетин-2. У контексті постковідного синдрому існує гіпотеза, що приховані резервуари SARS-CoV-2, а також різноманітні прозапальні молекули можуть зв'язуватись із рецепторами на поверхні ендотеліальних клітин [97]. Це може призводити до активації ендотелію та підвищення експресії молекул клітинної адгезії, зокрема ICAM-1, VCAM-1, селектинів (Е-селектину та Р-селектину), прозапальних медіаторів та прокоагулянтних факторів, водночас пригнічуючи експресію антикоагулянтних молекул. Цитокіни можуть безпосередньо стимулювати експресію тканинного фактора та індукувати формування позаклітинних нейтрофільних пасток (NETs), що сприяє тромбоутворенню [98]. Крім того, запалений ендотелій активує процеси адгезії та гіперактивації тромбоцитів. Вірус SARS-CoV-2 також здатен безпосередньо зв'язуватися з тромбоцитами через рецептори ACE2 та TMPRSS2, сприяючи їх активації, адгезії та агрегації, що, у свою чергу, призводить до посилення коагуляційних процесів. Окрім цього, тромбоцити можуть набувати гіперактивованого фенотипу через підвищену експресію прозапальних і адгезивних молекул.

З'являється все більше даних, які вказують на існування зв'язку між аутоантілами, що присутні у кровотоці осіб, що перенесли COVID-19 та розвитком тромботичних ускладнень. Серед клінічних аутоімунних розладів, викликаних SARS-CoV-2 інфекцією, є синдром Гійєна-Барре та антифосфоліпідний синдром. У літературі повідомлено про понад 100 випадків різних типів синдрому Гійєна-Барре, найчастішим з яких є гостра запальна демієлінізуюча полінейропатія, пов'язана з попередньою інфекцією SARS-CoV-2. Більшість випадків розвитку синдрому Гійєна-Барре зафіксовано протягом 4 тижнів після одужання від COVID-19 [99]. Пошуки подібності між пептидними послідовностями SARS-CoV-2 і людськими аутоантигенами, пов'язаними з синдромом Гійєна-Барре, підтвердили спільну імуногенну послідовність між SARS-CoV-2 і білками теплового шоку HSP90B, HSP90B2 і HSP60 [100]. Ці

аутоантитіла причетні до багатьох аутоімунних неврологічних захворювань, що підтверджує цю гіпотезу.

У той же час дослідження та аналіз характеристик тромбоемболічних подій у пацієнтів пост-COVID-19 періоду підтвердили, що тромбози у постковідний період мають багато спільного з антифосфоліпідним синдромом. Дослідження показало, що антифосфоліпідні антитіла при COVID-19 відрізняються від тих, які виявляються при антифосфоліпідному синдромі, з точки зору їх епітопної специфічності. Тим не менш, *de novo* індукція аутоантитіл, пов'язаних з антифосфоліпідним синдромом, у COVID-19 змусила кількох дослідників припустити, що опосередкований SARS-розлад схожий на антифосфоліпідний синдром, через молекулярну мімікрію та наступну імуноопосередковану ендотеліальну дисфункцію, може достовірно пояснити, як відбувається тромбогенез у COVID-19 [101].

Один із шляхів впливу антифосфоліпідних антитіл на тромбоутворення реалізується через стимуляцію нейтрофілів до вивільнення NETs, а також активацію ендотеліальних клітин і тромбоцитів. Раніше також було показано, що APL-антитіла можуть безпосередньо спричиняти пошкодження ендотелію, зв'язуючись із рецепторами на поверхні ендотеліальних клітин [102]. Унаслідок цього зв'язування пригнічується активність синтази оксиду азоту, що призводить до зниження продукції оксиду азоту (NO). Відомо, що NO має виражені протизапальні та судинорозширювальні властивості. Зменшення його продукції може додатково сприяти ушкодженню ендотелію. Ендотеліальне ушкодження призводить до активації запального каскаду, зокрема до підвищеного вивільнення прозапальних цитокінів і залучення нейтрофілів унаслідок зростання їхньої адгезії. Ці процеси розвиваються на тлі зниження продукції оксиду азоту та активації системи комплементу. У результаті відбувається порушення цілісності судинної стінки та посилення агрегації тромбоцитів, що сприяє розвитку гіперкоагуляційного стану. У зв'язку з цим виявлення маркерів активації або пошкодження ендотелію, таких як фактор фон Віллебранда,

демонструє чітку асоціацію з тяжкістю клінічних проявів при постковідному синдромі [39].

Для ідентифікації та аналізу SARS-CoV-2 і білків крові людини, пов'язаних із коагулопатіями, використовувалися пошуки BLAST і LALIGN. Встановлено, що SARS-CoV-2 демонструє амінокислотну схожість з різними мімікрійними білками крові людини. Подібності підтверджено між репліказою 1a SARS-CoV-2 або спайковим білком і фосфодіестеразами тромбоцитів, білками групи крові Rh, а також протромбіном, комплементом C3, C4 і C5. Під час аналізу загального протеома SARS-CoV-2 було виявлено велику кількість подібностей до сироваткового альбуміну, факторів згортання крові, фосфодіестераз тромбоцитів, резус-білків групи крові, протромбіну, VWF, фактора IX, фактора Xa, ADAMTS13 і CD55/DAF [103].

Гіпоксія є одним із ключових патофізіологічних механізмів при COVID-19 і зберігає своє значення у постковідному періоді. У гострій фазі захворювання вона зумовлена ушкодженням альвеолярно-капілярного бар'єру, мікросудинною тромбозією та дисрегуляцією вентиляційно-перфузійного співвідношення. У постковідному періоді персистуюча тканинна гіпоксія може зберігатися навіть за нормального рівня сатурації кисню, зумовлюючи митохондріальні дисфункції, оксидативний стрес та хронічне низькорівневе запалення. Як універсальний стресор, гіпоксія активує HIF-залежні шляхи, сприяє неоангіогенезу, фіброзу, порушенням енергетичного обміну та імунної відповіді, виступаючи таким чином ключовим чинником розвитку постковідних ускладнень — зокрема з боку серцево-судинної, дихальної та нервової систем.

Хронічна гіпоксія тканин також відіграє важливу роль у формуванні гіперкоагуляційного стану. Вона здатна індукувати активацію транскрипційного фактора EGR-1, сприяти підвищенню експресії тканинного фактора та стимулювати продукцію інгібітора активатора плазміногену-1, що в сукупності призводить до посилення процесів коагуляції. Окрім цього, тривала гіпоксія може індукувати апоптоз ендотеліальних клітин, що супроводжується зниженням антикоагулянтного потенціалу ендотелію, порушенням судинної

проникності, зростанням адгезії лейкоцитів та посиленою генерацією мікрочастинок.

Крім того, гіпоксія сприяє активації та апоптозу ендотеліальних клітин, що зумовлює зниження їх антикоагулянтного потенціалу, підвищення судинної проникності, активацію адгезії лейкоцитів і посилену продукцію мікрочастинок [40]. Варто підкреслити, що тромбоз, спричинений гіпоксемією, може призводити до накопичення метаболічних токсинів, енергетичного виснаження, масивного ушкодження та загибелі клітин, що, у свою чергу, може сприяти розвитку поліорганної недостатності.

На сьогодні більшість дослідників і клініцистів погоджуються, що тривалі симптоми COVID-19 пов'язані зі здатністю SARS-CoV-2 порушувати функцію імунної системи. Імовірно, пертурбація або надмірна активація імунної системи може тривати після ліквідації вірусу або виникають внаслідок персистенції фрагментів вірусних часток і лежать в основі тривалих симптомів COVID-19. Деякі вважають, що основним механізмом розвитку патологічних наслідків у вигляді тромботичних ускладнень може бути тривала нерегульована активація імунної системи з подальшим хронічним запаленням. Запалення – це першочергова реакція імунної системи на пошкодження тканин, викликане інфекцією або травмою. Під час перебігу COVID-19 однією з важливих ознак є надмірна запальна відповідь під назвою «цитокіний шторм», що може бути небезпечним для життя. У цій гіперзапальній відповіді гіперцитокінемія індукує запальну клітинну відповідь із залученням прозапальних медіаторів, таких як TNF-α, IL-1-, IL-6 та IL-8, що призводить до артеріальної гіпотензії, поліорганної дисфункції, ГРДС (гострий респіраторний дистерс-синдром) і навіть смерті. Цей зв'язок між імунною активацією та коагуляцією відомий як «імунотромбоз», який у поєднанні з ендотеліальною дисфункцією вважається ключовим механізмом утворення тромбу при важкій інфекції COVID-19.

Імунна дизрегуляція, характерна для постковідного синдрому, включає підвищену продукцію інтерферону гама та інтерлейкіну IL-2, порушення в субпопуляціях $CD4^+$- і $CD8^+$-Т-лімфоцитів, а також змінений фенотип моноцитів

$CD14^+$ і $CD16^+$. Додатково спостерігаються функціональні зрушення у В-лімфоцитах та моноцитах. Переважаюча активація окисного фосфорилювання й генерація активних форм кисню зміщують запальну відповідь у бік процесів, менш залежних від TNF-α та IL-6, але здатних підтримувати персистенцію симптомів і прогресування Long COVID [43]. На цьому тлі хронічне запалення відіграє центральну роль у запуску активації ендотеліальних клітин, тромбоцитів і інших ефекторних імунних клітин. Це, у свою чергу, сприяє зростанню експресії прокоагулянтних факторів і порушенню бар'єрної функції судинного ендотелію, що зумовлює розвиток аномальної коагуляції. Таким чином формується патологічне коло зворотного зв'язку: запалення ініціює тромбоз, а тромботичні згустки підтримують запальний процес. Важливою ланкою цієї взаємодії є тромбін, який, розщеплюючи фібриноген, активує інтерлейкін IL-1α, забезпечуючи тим самим пряме функціональне поєднання між системами згортання крові та запалення.

Як було зазначено раніше, вірус SARS-CoV-2 може локалізуватися у позаклітинних везикулах, що дозволяє йому рециркулювати в організмі та повторно інфікувати різні тканини через кровоносну систему. Окрім своєї основної функції молекулярного транспорту, позаклітинні везикули відіграють важливу роль у процесах запалення, коагуляції та імунної регуляції. Доведено, що активність тканинного фактору, асоційованого з позаклітинними везикулами значно зростає у пацієнтів, госпіталізованих із COVID-19. Крім того, позаклітинні везикули, позитивні за експресією тканинного фактору, вивільняються в системний кровотік, що потенційно сприяє активації тромбоутворення.

Також було встановлено, що експресія фосфатидилсерину на зовнішній поверхні клітинної мембрани в умовах вірусної інфекції додатково стимулює коагуляційний каскад [46]. Екстерналізація фосфатидилсерину у пацієнтів із COVID-19 тісно асоціюється з підвищеним рівнем Д-димеру, а у хворих із тромбозом спостерігається достовірно вищий рівень екстерналізації фосфатидилсерину порівняно з пацієнтами без тромбозу [47].

Охарактеризовані вище механізми розвитку коагулопатії, спричиненої COVID-19, можуть бути попередниками затяжного COVID-19 або пост-COVID-19 коагулопатій. Таким чином патофізіологічні стани, викликані SARS-CoV-2 інфікуванням, можуть мати наслідки у розвитку коагулопатій. Важливо вчасно виявити потенційну фізіологічну дисфункцію, її причину та можливі наслідки ліквідувати за допомогою терапії проти конкретних мішеней.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика дослідних груп донорів

У дослідженні стану системи гемостазу у осіб з різним титром антитіл проти SARS-CoV-2 взяли участь добровольці, які перенесли COVID-19, і після одужання згодилися бути донорами плазми крові для біотехнологічного використання на підприємстві ТОВ «БІОФАРМА-ПЛАЗМА» (Україна). На момент забору крові всі учасники були клінічно здоровими. Віковий діапазон донорів становив 25-45 років. Забір плазми здійснювався через 3–6 місяців після одужання. Перед використанням у біотехнологічному виробництві плазма підлягала стандартному скринінговому контролю, що проводиться на підприємствах такого профілю; зразки з позитивними результатами скринінгу не включалися до подальшого аналізу.

Титри антитіл проти SARS-CoV-2 визначали за допомогою хемілюмінесцентного мікрочастинкового імуноферментного аналізу (Abbott Laboratories, Abbott Park, Іллінойс, США) згідно з протоколом виробника. Визначення проводилось на базі ТОВ «БІОФАРМА-ПЛАЗМА». Відбір донорів здійснювався на підставі титру антитіл проти SARS-CoV-2. Було сформовано групи донорів з різними значеннями титрів анти-SARS-CoV-2 IgG: 0 (n = 20) – донори, що не хворіли на COVID-19; 10 ± 3 (n = 20); 55 ± 5 (n = 20); 75 ± 5 (n = 20); 125 ± 5 (n = 20); 175 ± 5 (n = 20) за індексом (S/C), надалі в підписах до рисунків відповідно групи № 1, 2, 3, 4, 5 та 6. Зразки плазми з визначеними титрами антитіл класу IgG до SARS-CoV-2 були передані для проведення наукових досліджень.

З дослідження були виключені особи з серцево-судинними або цереброваскулярними захворюваннями, дефіцитом вітаміну К, з травматичними порушеннями системи згортання крові, ті, хто отримував

антикоагулянтну терапію, а також особи з іншими порушеннями, що могли б впливати на стан системи гемостазу та особи, які були вакциновані проти COVID-19.

Слід зазначити, що одним із обмежень дослідження стану системи гемостазу у осіб з різним титром антитіл проти SARS-CoV-2 є поділу учасників дослідження з огляду на тяжкість перебігу COVID-19, що не дозволяє оцінити можливий вплив цього чинника на досліджувані показники. Крім того, у роботі не проводився розподіл донорів за статтю, що обмежує інтерпретацію результатів з урахуванням потенційних статевих відмінностей у функціонуванні системи гемостазу.

Усі донори брали участь у дослідженні добровільно та надали письмову інформовану згоду. Проведення дослідження було погоджене Комітетом з питань біоетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 4 від 25 травня 2022 року).

У дослідженні стану системи гемостазу у осіб з РС взяли участь 97 пацієнтів із РС (34 чоловіки/63 жінки, середній вік - 43 роки), з яких 41 особа - це реконвалесценти після COVID-19, які мали позитивний статус упродовж попередніх 3-6 місяців, але на момент обстеження були негативними за результатами дослідження мазків із носоглотки (група пацієнтів з РС, що перенесли COVID-19; n=41), тоді як 56 пацієнтів раніше не хворіли на COVID-19 (група пацієнтів з РС; n=56). Обстеження проводилися на базі Університетської клініки Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) у період з січня 2021 року по серпень 2022 року. До контрольної групи входили 30 осіб, у яких на момент забору крові результат дослідження мазків із носоглотки на SARS-CoV-2 був негативним (група умовно здорових донорів; n=30). У дослідженні не брали участь особи із серцево-судинними та цереброваскулярними захворюваннями, ті, що отримували гемостатичну терапію, а також пацієнти з будь-якими гострими або хронічними захворюваннями, які могли впливати на стан системи

гемостазу. Від усіх учасників було отримано письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Плазму отримували зі свіжозібраної крові, стабілізованої цитратом натрію. Зразки крові центрифугували протягом 15 хв при 2500 g, аліквоти плазми крові зберігали при температурі −80 °C до подальшого використання. Перед аналізом заморожені зразки плазми крові поміщали у водяну баню при +37 °C на 10-15 хв.

У дослідженні стану системи гемостазу у осіб ОА взяли участь 36 пацієнтів із ОА колінного суглоба, які проходили лікування в стаціонарних або амбулаторних умовах в Ортопедичній спеціалізованій клініці «Медичний центр “Ортоклінік”» (м. Тернопіль, Україна). Вік пацієнтів становив від 45 до 68 років. Серед них було 12 чоловіків та 24 жінки. Відбір учасників дослідження включав комплексне обстеження, яке передбачало аналіз анамнезу, а також клінічні, лабораторні та функціональні методи дослідження. Діагноз ОА встановлювали на підставі клінічних і рентгенологічних критеріїв, визначених Американським коледжем ревматології (ACR), а також відповідно до рекомендацій, викладених у наказі Міністерства охорони здоров’я України № 676 від 12 жовтня 2006 року «Клінічний протокол надання медичної допомоги хворим на остеоартроз». Дослідження було схвалене комісіями з питань етики обох залучених установ: Медичного центру «Ортоклінік» (м. Тернопіль, Україна) та Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №3 від 12 квітня 2022 року). Від усіх пацієнтів було отримано письмову інформовану згоду, а обробка даних здійснювалася з дотриманням принципів анонімності. Для оцінки рентгенологічної тяжкості ОА використовували класифікацію Kellgren–Lawrence (KL) (градація від 0 до 4). До дослідження були відібрані пацієнти переважно з ранніми та помірними змінами остеоартриту колінного суглоба, що відповідало 2 та 3 ступеням за KL. Таким чином, до першої дослідної групи (пацієнти з остеоартритом) увійшли 14 добровольців із ОА колінного суглоба. До другої дослідної групи (пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19, n=14) були включені

пацієнти зі 2 та 3 стадіями остеоартриту, які перенесли COVID-19 легкої або середньої тяжкості приблизно 6–9 місяців до моменту дослідження. Попереднє підтвердження діагнозу COVID-19 у пацієнтів із суглобовою патологією здійснювали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (RT-PCR) на зразках мазків із носоглотки та/або шляхом визначення антитілпроти SARS-CoV-2.

2.2. Реактиви та обладнання

У роботі було використано наступні реактиви та матеріали: цитрат натрію; монойодоцтова кислота; оцтова кислота; о-фенантролін; трис(гідроксиметил)амінометан; Твін-20; знежирене молока; моноклональні антитіла (Santa Cruz Biotechnology, США) та поліклональні антитіла (Sigma-Aldrich, США); о-фенілендіамін, бензамідин; етилендіамінтетраоцтова кислота; акриламід; N,N´-метилен-біс-акриламід; персульфат амонію; N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-диамін виробництва GE Healthcare AB, Швеція. Діамінобензидин; пара-нітрофенілфосфат; β-меркаптоетанол, Nα-бензоїл-L-аргінін 4-нітроанілід гідрохлорид (БАПНА) (Sigma-Aldrich, США), а також хромогенні субстрати Nα-benzoyl-L-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, pyroGlu-Pro-Arg-pNA, Bz-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA, H-D-Val-Leu-Lys-pNA, N-α-p-tosyl-L-Arg-methylester (Chromogenix, Швеція); реагенти для проведення хронометричних тестів та плазми-калібратори (РенаУ, Україна); маркери молекулярної маси білків для електрофорезу (Fermentas, Литва); протеїн А-сефароза (Amersham Biosciences, AB, Швеція); сефадекс G15 (Bio-Rad, Hercules, США). Хімічні реактиви вітчизняного виробництва, такі як солі, кислоти та луги були кваліфікації «чда» та «хч».

У роботі було використано електрофоретичну систему Mini-Protean Tetra Cell; хроматограф низького тиску BioLogic LP System; спектрофотометр

SmartSpecTMPlus (Bio-Rad Laboratories, Inc, США); спектрофлюориметр RF-1501 (Shimadzu, Японія); мікропланшетний спектрофотометр μQuant (BioTek Instruments); коагулометр (Rayto Life and Analytical Sciences, Китай); автоматичний хемілюмінесцентний імуноаналізатор (Maglumi 1000, Snibe Co., Ltd., Китай); автоматичний аналізатор гемостазу Sysmex CS-2000i (Sysmex Corporation, Японія); центрифугу СМ-6М (ELMI, Латвія); центрифугу з холодильником AllegraTM64R (Beckman Coulter, США); концентратори центрифужні (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Усі допоміжні матеріали та устаткування, використані в дослідженні, відповідали вимогам міжнародного стандарту якості ISO 9001, що гарантує належний рівень виробництва та функціональну надійність.

Магнітні мішалки, автоматичні піпетки, термостати, шейкери, водяні бані та інше лабораторне обладнання постачалися фірмами, що сертифіковані за ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд, зокрема планшети для імуноферментного аналізу, планшети з несорбуючою поверхнею, а також мікропробірки типу «епендорф», були отримані від компаній Costar та ColeParmer (США). Скляний посуд (колби, мірні циліндри, пробірки, стакани тощо) постачався відомими виробниками Kimax і Wheaton (США).

Застосування сертифікованих матеріалів та обладнання забезпечило високу достовірність і відтворюваність результатів експериментів.

2.3. Коагуляційні тести

2.3.1. Визначення активованого часткового тромбопластинового часу зсідання плазми крові

Активований частково тромбопластиновий час (АЧТЧ) слугує індикатором функціонального стану внутрішнього шляху каскаду згортання крові [104]. Визначення цього показника проводили з використанням коагуляційного аналізатора Sysmex CS-2000i та реагенту Dade Actin (Siemens,

Німеччина) згідно з інструкціями виробника. Метод базується на активації факторів внутрішнього шляху згортання під дією фосфоліпідів (кефалінів) і поверхневого активатора (каоліну), що додаються до плазми. Після інкубації при температурі 37 °С протягом 3 хв до суміші вводять іони кальцію (0,1 мл 25 мМ $CaCl_2$), які запускають процес коагуляції. Час до формування згустку фіксується в секундах автоматично на коагулологічному аналізаторі. Усі вимірювання здійснювалися у пластикових кюветах шляхом додавання по 0,1 мл плазми та реагенту.

2.3.2. Визначення тромбінового часу зсідання плазми крові

Тромбіновий час (ТЧ) є чутливим показником функціонування заключного етапу каскаду зсідання крові, що відображає здатність тромбіну перетворювати фібриноген у нерозчинний фібрин. Визначення ТЧ здійснювали на коагуляційному аналізаторі Sysmex CS-2000i з використанням реагентів Dade Trombin (Siemens, Німеччина) відповідно до загальноприйнятої методики. Суть методу полягає у вимірюванні часу згортання розведеної плазми після додавання екзогенного тромбіну. Цей час є обернено пропорційним концентрації фібриногену в зразку. Застосований підхід базується на методі Клаусса, який полягає у порівнянні отриманого часу зсідання з еталонними значеннями, що відповідають стандартному розчину фібриногену.

Для аналізу у пластикову кювету вносили 0,1 мл плазми крові, попередньо інкубованої при 37 °С протягом 2 хв, після чого додавали 0,1 мл розчину тромбіну з активністю 6 МО/мл. Час утворення згустку фіксували у секундах автоматично за допомогою коагулологічного аналізатора.

2.3.3. Визначення протромбінового часу зсідання плазми крові та міжнародного нормалізованого відношення

Протромбіновий час (ПЧ) визначали за допомогою автоматичного коагуляційного аналізатора Sysmex CS-2000i із застосуванням реагенту Dade® Innovin® (Siemens, Німеччина). Цей реагент містить очищений рекомбінантний тканинний фактор (TF) людини, експресований у клітинах Escherichia coli, у поєднанні з синтетичними фосфоліпідами, іонами кальцію, буферною системою та стабілізаторами. Dade Innovin ініціює активацію каскаду згортання крові через зовнішній і загальний шляхи. Метод визначення ПЧ полягає у введенні до зразка плазми оптимальної кількості реагенту (тромбопластину з кальцієм), що призводить до активації протромбінового комплексу. Вимірювання часу згортання відбувається автоматично, і його значення відображає функціональний стан факторів згортання, пов'язаних із зовнішнім шляхом коагуляції.

Міжнародне нормалізоване відношення МНВ (мкг FEO/мл) розраховували відповідно до формули:

$$\text{МНВ} = (\text{А})^{\text{МІЧ}}, \text{де А} = \frac{\text{ПЧ досліджуваний}}{\text{ПЧ контрольний}} \quad (2.1)$$

де МІЧ – це міжнародний індекс чутливості тромбопластину (вказується в інструкції до набору реагентів).

2.4. Очищення з плазми крові антитромбіну III

Для отримання фракції антитромбіну III використовували метод афінної хроматографії на гепарин-сефарозі [105]. Перед нанесенням зразка колонку врівноважували 0,1 М трис-HCl буфером (pH 7,4), що містить 0,01 М цитрат та 0,225 М NaCl. Після нанесення проби колонку проводили перший

етап елюції використовуючи 0,1 М трис-HCl буфер (pH 7,4), що містить 0,01 М цитрат та 0,33М NaCl – цей етап забезпечує видалення неспецифічно зв'язані білків. Для елюції цільового білка використовували 0,1 М трис-HCl буфер (pH 7,4), що містить 0,01 М цитрат та 2 М NaCl. Нанесення проби та елюцію матеріалу проводили за швидкості 3 мл/хв. Для видалення надлишку солі та переведення проби у відповідний буфер використовували концентруючі системи з відсікаючою здатністю 3 кДа. Концентрацію білка в отриманих фракціях визначали за методом Бредфорда. Чистоту отриманої фракції АТІІІ оцінювали за допомогою диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію відповідно до стандартного протоколу (п.2.24).

2.5. Очищення з плазми крові фракції вітамін К-залежних білків та аналіз методом хроматографії, що поділяє за розмірами

Фракцію вітамін К-залежних білків (у тому числі й молекул протромбінового походження) виділяли з плазми крові шляхом сорбції на сірчанокислому барії [106]. Для цього до плазми крові додавали $BaSO_4$ з розрахунку 120 г $BaSO_4$ на 1 л плазми. Проби залишали при 4 °С на 60 хвилин помішуючи через кожні 10 хв. Після завершення інкубації проби центрифугували при 5000 g впродовж 15 хв. Осад двічі відмивали 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4) розведеним у 10 разів. Елюцію вітамін К-залежних білків проводили використовуючи 50 мМ трис-HCl буфер (pH 7,4), що містить 200 мМ NaCl, 20 мМ ЕДТА та 10 мМ бензамідин. Контроль складу фракцій вітамін К-залежних здійснювали методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (п.2.21).

Аналіз складу фракції вітамін К-залежних білків проводили методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 PG. Для цього аліквоти об'ємом 1 мл наносили на колонку, попередньо

врівноважену 0,05 М трис-HCl буфером (pH 7,4), що містив 130 мМ NaCl. Швидкість нанесення зразка та елюції матеріалу складала 0,75 мл/хв. Для калібрування колонки використовували маркерні білки з відомою молекулярною масою (гамма-глобулін великої рогатої худоби 158 кДа; тіреоглобулін 67 кДа; овальбумін курячий 44 кДа; міоглобін коня 17 кДа).

2.6. Очищення з плазми крові фракції середньомолекулярних метаболітів та аналіз пептидної складової фракції середньомолекулярних метаболітів методом хроматографії, що поділяє за розмірами

Фракцію середньомолекулярних метаболітів (СММ) одержували з плазми крові відповідно до методу [107]. Для цього до плазми крові додавали охолоджену 1,2 М $HClO_4$ у співвідношенні 1:1, після чого проби залишали на 30 хв за температури 4 °С. Проби центрифугували впродовж 15 хв при 10 000 g, надосадову рідину нейтралізували до pH 7,4 використовуючи 5 М КОН, витримували ще впродовж 15 хв та піддавали повторному центрифугуванню за вказаних вище умов. До надосадової рідини додавали 96% етиловий спирт у співвідношенні 1:5, проби витримували 15 хв при 4 °С та центрифугування (15 хв,10 000 g). Оптичну щільність проб вимірювали за довжини хвилі 210 нм. Концентрацію пептидів у складі фракції середньомолекулярних метаболітів розраховували за калібрувальною кривою, побудованою з використанням дипептиду CBZ-гліцил-гліцин.

Аналіз пептидної складової у фракції середньомолекулярних метаболітів проводили методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці Sephadex G15, яку перед початком роботи урівноважували 0,05 М трис-HCl буфером (pH 7,4), що містив 0,13 М NaCl. Зразки наносили за швидкістю потоку 0,5 мл/хв. Молекулярну масу пептидів визначали за калібрувальною

кривою, побудованою з використанням стандартної суміші, що містила лізоцим (14,3 кДа), інсулін (5,7 кДа) та вітамін В12 (1,35 кДа).

2.7. Очищення з плазми крові комплексів антитіл з білками

2.7.1. Афінна хроматографія на бензамідин-сефарозі

Плазму крові наносили на колонку попередньо врівноважену 20 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4), що містив 0,5 М NaCl. Після відмивання колонки від матеріалу, що не зв'язався з бензамідин-сефарозою, проводили елюцію використовуючи 80 мМ гліциновий буфер (pH 3,0) [108]. Отриману фракцію відразу нейтралізували до pH 7,4. Швидкість нанесення проб та елюції матеріалу становила 2 мл/хв.

2.7.2. Афінна хроматографія на протеїн А-сефарозі

Фракції, отримані на бензамідин-сефарозі, наносили на протеїн А-сефарозу попередньо врівноважену 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4), що містить 0,13 М NaCl. Після відмивки колонки від матеріалу, що не зв'язався, проводили елюцію матеріалу використовуючи 0,1 М гліцин-HCl буфер (pH 2,0). Швидкість на всіх етапах хроматографічного процесу становила 0,5 мл/хв. Отримані фракції відразу нейтралізували до значень pH 7,4.

2.7.3. Афінна хроматографія на лізин-сефарозі

Для очищення комплексів антитіл з молекулами плазміногенового походження, фракції, отримані після двох стадійної процедури очищення на

бензамідин-сефарозі і далі на протеїн А-сефарозі, наносили на лізин-сефарозу [109]. Колонку перед початком роботи врівноважували 0,05 М натрій-фосфатним буфером (pH 7,4). Після нанесення зразка колонку відмивали від неспецифічних білків 0,05 М натрій-фосфатним буфером (pH 7,4), що містив 0,2 М NaCl. Як буфер елюції використовували 0,05 М натрій-фосфатний буфер (pH 7,4), що містив 0,2 М ε-амінокапронову кислоту. Швидкість нанесення зразка та елюції матеріалу складала 2 мл/хв.

2.8. Очищення з плазми крові фракції серинових протеїназ

Для отримання з плазми крові фракції серинових протеїназ використовували метод афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі. Колонку попередньо промивали 20 мМ трис-HCl буфер, pH 7,4, що містив 0,5 М NaCl. Плазму крові розводили вдвічі буфером та наносили на колонку за швидкості 3 мл/хв. Після відмивки матеріалу, що не зв'язався з носієм, проводили елюцію використовуючи 80 мМ гліцин-HCl буфер (pH 3,0). Одержану фракцію відразу нейтралізували до pH 8,0 використовуючи NaOH.

2.9. Визначення концентрації фібриногену

Концентрацію фібриногену визначали спектрофотометрично відповідно до методу [110]. Для цього у скляні пробірки вносили 0,2 мл плазми крові, 1,7 мл 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,0), 0,1 мл розчину тромбіну (2 NIH) та 0,1 мл 0,04 М монойодоцтової кислоти. Проби інкубували при температурі 37 °С упродовж 30 хвилин. Утворений згусток фібрину вилучали з пробірки шляхом накручування на скляну паличку, далі промивали 2-3 рази охолодженим 0,13 М NaCl, надлишок рідини із згустку видаляли за допомогою фільтрувального паперу. Одержаний згусток розчиняли у 5 мл 1,5% оцтової кислоти.

Концентрацію фібриногену визначали спектрофотометрично за довжин хвиль 280 нм та 320 нм і розраховували відповідно до формули:

$$Ф = (E280 – E320)\ 255 / 1{,}506 \qquad (2.2)$$

де Ф – концентрація фібриногену, г/л;

255 – коефіцієнт перерахунку концентрації фібриногену в об'ємі зразка на його концентрацію в плазмі;

1,506 – коефіцієнт екстинкції для 1% розчину фібрину за довжини хвилі 280 нм.

2.10. Визначення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів

Концентрацію розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) визначали за допомогою о-фенантролінового тесту відповідно до методу [111], який ґрунтується на реєстрації часу утворення фібринових часток у плазмі крові після додавання 0,78% розчину о-фенантроліну за співвідношення 1:1. Результати оцінювали напівкількісно за формою осаду, що утворився: дрібні частинки - 0,035 мг/мл (1 у.о.); пластівчаста муть - 0,07 мг/мл (2 у.о.); пластівці або нитки - 0,105 мг/мл (3 у.о.), гелеподібний осад - 0,14 мг/мл (4 у.о.).

Після первинного визначення вмісту РФМК здійснювали додаткове очищення комплексів шляхом триразового промивання 0,9% NaCl. Для цього осаджені РФМК центрифугували при 3000 g впродовж 10 хв, після чого до осаду додавали 0,9% NaCl у об'ємі, еквівалентному початковому об'єму плазми крові. Отриману суспензію ретельно перемішували, після чого повторно центрифугували за вказаних вище умов. Після трьох циклів промивання надосадову рідину видаляли, а до осаду додавали 1 М KOH. Концентрацію РФМК виражали у мкг/мл.

Аналіз складу фракцій розчинних фібрин-мономерних комплексів проводили методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 PG. Для цього аліквоти об'ємом 1 мл наносили на колонку, попередньо врівноважену 0,05 М трис-HCl буфером (pH 7,4), що містив 130 мМ NaCl. Швидкість нанесення зразка та елюції матеріалу складала 0,75 мл/хв. Для калібрування колонки використовували маркерні білки з відомою молекулярною масою (тіреоглобулін 67 кДа; гамма-глобулін великої рогатої худоби 158 кДа; овальбумін курячий 44 кДа; міоглобін коня 17 кДа).

2.11. Визначення потенційної активності протромбіну та молекул протромбінового походження

Для визначення потенційної активності протромбіну та молекул протромбінового походження використовували екзогенний активатор екамулін - специфічну протеїназу з отрути змії *Echis multisquamatus*. Попередньо плазму крові розводили у співвідношенні 1:10 використовуючи 0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,4). Потенційну активність протромбіну оцінювали за здатністю тромбіну розщеплювати специфічний хромогенний субстрат S_{2238}, який додавали до проб у кінцевій концентрації 3 мМ. Оптичну щільність проб реєстрували за довжини хвилі 405 нм використовуючи мікропланшетний спектрофотометр.

2.12. Визначення концентрації D-димеру

Визначення концентрації D-димеру у плазмі крові здійснювали за допомогою імунохемілюмінесцентного аналізатора Maglumi 1000 (Snibe, Китай). Метод базується на принципі сендвіч-подібного імунного зв’язування з наступною хемілюмінесцентною детекцією. До реакційної суміші, що складалася зі зразка плазми, буферного розчину та магнітних мікросфер,

покритих моноклональними антитілами до D-димеру, додавали реагенти та інкубували при температурі 37 °С. У процесі інкубації формувалися імунокомплекси за типом «сендвіч», які осаджувались у магнітному полі. Після видалення супернатанту проводили цикл відмивання для усунення неспецифічного зв'язування. Далі до реакційної суміші додавали стартери 1 та 2, які запускали хемілюмінесцентну реакцію. Інтенсивність випромінювання реєструвалась фотоелектронним помножувачем впродовж 3 секунд і виражалась у відносних світлових одиницях (ВСО). Концентрацію D-димеру аналізатор розраховував автоматично, використовуючи калібрувальну криву, побудовану методом двоточкового калібрування та референсної кривої. Одиниці вимірювання - мкг ФЕО/мл (мікрограми фібриноген-еквівалентних одиниць на мілілітр) [112].

2.13. Визначення інгібіторного потенціалу антитромбіну III

Для визначення інгібіторного потенціалу антитромбіну III (АТІІІ) плазму крові розводили у співвідношенні 1:30 використовуючи 0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,4). До проб додавали тромбін у присутності гепарину до кінцевої концентрації 0,2 МО. Залишкову кількість тромбіну, яка не була інактивована АТІІІ, визначали за допомогою специфічного хромогенного субстрату для тромбіну S_{2238} у кінцевій концентрації 3 мМ. Для проведення аналізу використовували реагенти виробництва РЕНАУ, Україна. Оптичну щільність проб вимірювали на мікропланшетному спектрофотометрі за довжини хвилі 405 нм через кожні 5 хв впродовж 30 хв [113].

2.14. Визначення активності протеїну С

Для визначення активності протеїну С (ПС) до плазми крові додавали активатор ПС згідно з інструкцією виробника. Для визначення використовували комерційні набори (РЕНАУ, Україна). Специфічний для протеїну С хромогенний субстрат S_{2366} додавали у кінцевій концентрації 3 мМ. Оптичну щільність проб вимірювали за довжини хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі. Активність протеїну С розраховували за кількістю вивільненого пара-нітроаніліну, яка була прямо пропорційна активності протеїну С у зразку плазми [113].

2.15. Визначення потенційної активності плазміногену

Потенційну активність плазміногену визначали з використанням екзогенного активатора - стрептокінази, ферменту бактеріального походження, здатного формувати активний комплекс із плазміногеном. Зразки плазми попередньо розводили у співвідношенні 1:50 використовуючи 0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,4). До кожного зразка додавали стрептокіназу у кінцевій концентрації 50 МО/мл, проби інкубували при 37 °С. Для визначення потенційної активності плазміногену використовували специфічний хромогенний субстрат для плазміну S_{2251} у кінцевій концентрації 3 мМ. Оптичну щільність проб вимірювали на мікропланшетному спектрофотометрі за довжини хвилі 405 нм через кожні 5 хв впродовж 30 хв [114].

2.16. Визначення активності тканинного активатора плазміногену

Для визначення активності тканинного активатора плазміногену (ТАП) використовували модельну систему з додаванням відповідних субстратів. У лунки планшету вносили плазміноген у кількості 25 мкг, еуглобулінову фракцію плазми крові в об'ємі 25 мкл. Для отримання еуглобулінової фракції

у скляну конічну пробірку вносили 0,2 мл плазми крові, 1,8 мл дистильованої води та 150 мкл 0,25% оцтової кислоти. Після перемішування пробу інкубували впродовж 30 хв при 4 °С. Еуглобулінову фракцію осаджували центрифугуванням при 700 g впродовж 15 хв за температури 4 °С, після чого розчиняли у 250 мкл 0,05 М трис-HCl буфері (pH 7,4).

Для індукції активації плазміногену до проб вносили 12,5 мкг полі-D-лізину, після чого залишали на 5 хв при температурі 37 °С. Активність ТАП оцінювали використовуючи хромогенний субстрат $S_{2251,}$ який вносили до проб за кінцевої концентрації 3 мМ. Оптичну щільність проб реєстрували за довжини хвилі 405 нм використовуючи мікропланшетний спектрофотометр. Потенційну активність тканинного активатора плазміногену визначали за калібрувальною кривою, побудованою на основі серійних розведень стандартного розчину активатора [117].

2.17. Визначення інгібіторного потенціалу α_2-антиплазміну

Інгібіторний потенціал α2-антиплазміну (α_2-АП) визначали використовуючи хромогенний субстрат S_{2251}. В інкубаційне середовище послідовно вносили 0,05 М трис-HCl буфер (pH 7,4), плазму крові, 0,5 К.од/мл плазміну та хромогенний субстрат у кінцевій концентрації 3 мМ. Після 5 хв інкубації при 37 °С реєстрували оптичну щільність проб при довжині хвилі 405 нм використовуючи мікропланшетний спектрофотометр [114].

2.18. Визначення інгібіторного потенціалу α_2-макроглобуліну

Визначення інгібіторного потенціалу α_2-макроглобуліну (α_2-МГ) у плазмі крові проводили використовуючи триступеневу реакційну систему з додаванням хромогенного субстрату БАПНА [114]. До зразку плазми крові

додавали трипсин у кількості 0,1 мг та інкубували впродовж 5 хв при температурі 37 °С. Для інактивації залишкової активності трипсину до проб додавали соєвий інгібітор трипсину у кількості 0,03 мг. Після повторної інкубації за вище вказаних умов до реакційного середовища додавали субстрат БАПНА у кількості 0,13 мг. Об'єм інкубаційного середовища доводили до 250 мкл 0,05 М трис-HCl буфером (рН 7,4). Оптичну щільність проб вимірювали при довжині хвилі 405 нм використовуючи мікропланшетний спектрофотометр.

Розрахунок інгібіторного потенціалу α2-МГ проводили за формулою і виражали у міжнародних одиницях (МО/мл):

$$\text{Інгібіторний потенціал } \alpha_2\text{-МГ} = \frac{D_{405}^{60} \times 2.73 \times 60}{0.01}, \qquad (2.3)$$

де D_{405}^{60} – зростання оптичної щільності проб за 60 хвилин;

2,73– коефіцієнт перерахунку;

60 – час реакції;

0,01 – об'єм плазми крові

2.19. Визначення інгібіторного потенціалу α_1-антитрипсину

Для визначення інгібіторного потенціалу α1-антитрипсину (α1-АТ) у плазмі крові використовували модельну систему з екзогенним трипсином. До плазми крові, яку попередньо розводили у співвідношенні 1:10 додавали трипсин у кількості 0,1 мг, після чого проби інкубували 5 хв при температурі 37 °С. Після завершення інкубації до реакційної суміші додавали субстрат для трипсину БАПНА у кількості 0,13 мг. Зниження інтенсивності гідролізу субстрату відображало ступінь інгібіторної активності α1-АТ у зразку.

Контрольним слугував зразок без додавання плазми, що дозволяє врахувати максимальну ферментативну активність трипсину за відсутності інгібітору. Оптичну щільність проб вимірювали за довжини хвилі 405 нм використовуючи мікропланшетний спектрофотометр. Кількість вивільненого п-нітроаніліну прямо пропорційна залишковій активності трипсину та обернено пропорційна значенню інгібіторної активності α1-АТ.

Розрахунок інгібіторного потенціалу α_1-АТ проводили за формулою і виражали у міжнародних одиницях на 1 мл плазми крові (МО/мл):

$$\text{Інгібіторний потенціал } \alpha_1\text{-АТ} = \frac{(V_0 - V_s) \times 2.73 \times 10}{0.01} \qquad (2.4)$$

де V_0, V_s – швидкість гідролізу БАПНА трипсином у контрольному та дослідному зразках;

2,73 – коефіцієнт перерахунку;

0,01 – об’єм плазми крові;

10 – коефіцієнт розведення

2.20. Визначення вмісту матриксних металопротеїназ, тканинного інгібітору металопротеїназ, про- і протизапальних цитокінів, ростових факторів, шаперонів та деяких факторів системи гемостазу методом імуноферментного аналізу

Вміст матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ММП-10), тканинного інгібітору металопротеїнази-1 (TIMP-1), інтерлейкінів (ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-1 β, ІЛ-12 β, TNF-α, ІЛ-4, ІЛ-10), транскрипційних факторів HIF-1α та NF-κB, ростових факторів VEGF, FGF-2, PDGF, шаперонів HSP-60, HSP-70 та деяких білків системи гемостазу (протеїну С, тромбомодуліну, плазміногену, інгібітора активатора плазміногену-1,

тканинного активатора плазміногену та молекул протромбінового пулу) визначали методом імуноферментного аналізу [115].

Зразки плазми крові донорів попередньо розводили 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4) у співвідношенні 1:100 та вносили у лунки мікропланшету, після чого інкубували при температурі 37 °C впродовж 1 години. По закінченню часу інкубації планшети промивали 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4), що містив 0,05% Твін-20; сайти неспецифічного зв'язування блокували 3% розчином знежиреного молока у 50 мМ трис-HCl буфері (pH 7,4) з подальшою інкубацією впродовж 12 годин при 4 °C. Первинні (моноклональні) та вторинні (поліклональні) антитіла розводили відповідно до рекомендацій фірм-виробників, інкубацію з антитілами проводили при 37 °C впродовж 1 години. Для візуалізації результатів використовували субстрат для пероксидази хрону - 0,04% о-фенілендіамін та 3,5 мМ H_2O_2 у 100 мМ ацетатному буфері, pH 5. Реакцію зупиняли додаванням 2,5 М H_2SO_4. Оптичну щільність проб вимірювали за довжини хвилі 492 нм використовуючи мікропланшетний спектрофотометр μQuant.

2.21. Визначення концентрації креатиніну та сечовини у сироватці крові

Концентрацію креатиніну та сечовини в сироватці крові визначали спектрофотометрично з використанням біохімічного аналізатора Microlab 300. Вимірювання проводили при довжинах хвиль 500 нм (для креатиніну) та 340 нм (для сечовини) згідно з інструкціями виробника реагентів [116]. Для дослідження застосовували комерційні діагностичні набори фірми PLIVA-Lachema Diagnostika (Чехія). Метод визначення концентрації креатиніну ґрунтується на його реакції з пікриновою кислотою в лужному середовищі внаслідок чого утворюється стабільний комплекс помаранчево-червоного відтінку, інтенсивність якого прямо пропорційна концентрації креатиніну.

Визначення концентрації сечовини базувалося на її ферментативному розщепленні уреазою до діоксиду вуглецю та амонію. При взаємодії амонію з фенолом та гіпохлоритом за присутності в інкубаційному середовищі нітропрусиду натрію утворюється кольоровий комплекс інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна вмісту сечовини в пробі. Концентрацію креатиніну та сечовини виражали в ммоль/л.

2.22. Визначення концентрації ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ), ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), тригліцеридів та загального холестеролу у сироватці крові

Концентрацію ЛПВЩ, ЛПНЩ, тригліцеридів та загального холестеролу у сироватці крові вимірювали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300. У ході дослідження було використано стандартні набори для визначення концентрації відповідних компонентів виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Визначення проводили згідно з інструкціями виробника реагентів.

2.23. Визначення активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, гамма-глутамілтранспептидази та лужної фосфатази у сироватці крові

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), гамма-глутамілтранспептидази (ГГТ) та лужної фосфатази (ЛФ) визначали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатора Microlab 300 використовуючи стандартні набори виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Виміри проводили за довжини хвилі 340 нм для аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази, 400-430 нм для

гамма-глутамілтранспептидази, 405 нм для лужної фосфатази. Активність ферментів виражали в од/л.

2.24. Одновимірний диск-електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію

Електрофоретичний аналіз проводили методом диск-електрофорезу у поліакріламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію відповідно до методу [117]. Залежно від конкретних задач дослідження електрофорез проводили у пластинках 6%, 8% чи 10% поліакриламідного гелю за сили струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для розділяючого гелю. Перед внесенням у гель проби прогрівали 30-40 секунд на киплячій водяній бані. Для проведення електрофорезу за відновлювальних умов до проб спочатку додавали 5% β-меркаптоетанол, кип'ятили впродовж 50-60 секунд і лише після цього додавали буфер для приготування зразків (5 мМ трис(гідроксиметил)амінометан (pH 8,3), що містив 0,38 М гліцин, 5% сахарозу, 2% додецилсульфат натрію та бромфеноловий синій для контролю фронту переміщення). Для візуалізації результатів використовували 2,5% розчин барвника Кумасі діамантовий синій R-250 у суміші 10% етанолу, 10% оцтової кислоти та 15% ізопропанолу. Гелі відмивали від надлишку фарби поміщуючи їх у киплячу воду з додаванням 1% оцтової кислоти

Для встановлення молекулярних мас білків використовували маркерні суміші «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range» та «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, High Range», «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Peptides» (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.04.

2.25. Ензим-електрофорез (зимографія) у поліакриламідому гелі за присутності додецилсульфату натрію

Ензим-електрофорез (зимографію) проводили відповідно до методу [118]. Розділяючий гель полімеризували за присутності одного з субстратних білків (желатин, колаген чи фібриноген) з розрахунку 2 мг/мл розділяючого гелю. Концентрація розділяючого гелю складала 12% при використанні желатину та 15% при використанні колагену чи фібриногену. Проби для ензим електрофорезу не прогрівали. Електрофорез проводили за сили струму 19 мА для концентруючого гелю та 36 мА для розділяючого гелю. Після закінчення електрофоретичного розділення гелі поміщували у 2,5 % розчин тритону Х-100 на 60 хв, після чого промивали дистильованою водою та заливали 50 мМ трис-HCl буфером (pH 7,4), що містив 130 мМ NaCl. Гелі залишали на 12 годин при 37 °С, по закінченню часу інкубації гелі фарбували відповідно до стандартного протоколу використовуючи 2,5% розчин барвника Кумасі діамантовий синій R-250 у суміші 10% етанолу, 10% оцтової кислоти та 15% ізопропанолу. Як маркери використовували плазмін, його деградовані форми та трипсин. Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.04.

Фібриноген, який використовували як один із субстратів, виділяли з плазми крові людини шляхом висолювання сульфатом натрію [119]. Фібриноген очищали від домішок плазміногену методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі. Колонку перед початком роботи врівноважували 0,05 М натрій-фосфатним буфером (pH 7,4). Після нанесення зразка колонку відмивали від неспецифічних білків 0,05 М натрій-фосфатним буфером (pH 7,4), що містив 0,2 М NaCl. Як буфер елюції використовували 0,05 М натрій-фосфатний буфер (pH 7,4), що містив 0,2 М ε-амінокапронову кислоту. Швидкість нанесення зразка та елюції матеріалу складала 2 мл/хв. Чистоту отриманого фібриногену контролювали методом диск-електрофорезу у 10% ПААГ. Отриманий фібриноген зберігали за -20 °С.

Для оцінки наявності у складі очищених комплексів активних ферментів чи їх деградованих форм, здатних виявляти протеолітичну активність було використано модифікований метод ензим-електрофорезу. Спочатку проводили електрофоретичний поділ білків досліджуваних проб у пластинах 7% ПААГ відповідно до описаного вище методу проведення електрофорезу. Після закінчення електрофорезу здійснювали перенесення білків з пластин ПААГ на субстратний гель, який містив заполімеризований у 12% ПААГ фібриноген з розрахунку 0,5 мг на мл суміші для полімеризації розподільчого гелю. Перенесення відбувалося шляхом електротрансферу. Всі подальші етапи відповідали етапам проведення ензим-електрофорезу. Зразки для модифікованого методу ензим-електрофорезу попередньо інкубували із 50 Од стрептокінази, інкубація тривала 60 хв. Як контроль використовували суміш маркерних білків для електрофорезу та плазміноген, який інкубували з стрептокіназою подібно до алгоритму, описаного для досліджуваних зразків.

2.26. Визначення загальної протеолітичної активності

Для визначення загальної протеолітичної активності до проб, що містили 50-75 мкг білка додавали казеїн до кінцевої концентрації 1% і залишали на 30 хв при +37 °С. Реакцію зупиняли додаванням трихлороцтової кислоти (5%), після чого проби центрифугували при 10 000 g. Оптичну щільність проб вимірювали при 280 нм проти холостої проби, яка не містила досліджуваної проби.

Загальну протеолітичну активність розраховували відповідно до формули:

$$К.од./мг\ білка = (E_{280} \times 3,27) / a \quad (2.5)$$

3,27 – коефіцієнт перерахунку

а - концентрація білка у пробі, мг

2.27. Визначення концентрації білка методом Бредфорда

Концентрацію білка визначали методом Бредфорда [120]. Виміри проводили на мікропланшетному спектрофотометрі за довжини хвилі 595 нм. Концентрацію білка визначали за калібрувальним графіком побудованим з використанням бичачого сироваткового альбуміну.

2.28. Вестерн-блот аналіз

Для оцінки присутності у складі очищених комплексів антитіл та молекул плазміногенового походження було використано метод вестерн-блоту, який проводили відповідно до стандартного протоколу [121]. Після електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі білки переносили на нітроцелюлозну мембрану методом електротрансферу. Перенесення тривало 60 хвилин за сили струму 0,8–1 мА/см² гелю відповідно до рекомендацій виробника. Для контролю якості перенесення мембрану фарбували 0,1% Понсо. Після відмивки від барвника мембрану залишали на 12 годин при 4 °С у блокуючому розчині - 5% знежирене молоко у 50 мМ трис-HCl буфері (pH 7,4), що містить 0,13 М NaCl та 0,05% твін-20. Як первинні антитіла використовували поліклональні антитіла проти плазміногену, як вторинні антитіла – козячі антикролячі антитіла, кон’юговані з пероксидазою хрону. Для визначення присутності у складі комплексів антитіл було використано козячі антитіла проти людських імуноглобулінів класу G, кон’юговані з пероксидазою хрону. Для візуалізації результатів як субстрат використовували 3,3'-діамінобензидин у 0,1 М трис-HCl буфері (pH 7,4) та пероксид водню.

2.29. Статистична обробка результатів дослідження

Статистичну обробку експериментальних даних та побудову графічних зображень здійснювали з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США). Перед проведенням порівняльного аналізу для всіх вибірок виконували перевірку розподілу даних на відповідність нормальному закону із застосуванням критерію Шапіро-Вілка. З урахуванням того, що експериментальні групи відрізнялися за чисельністю та у ряді випадків не відповідали нормальному розподілу, застосовували як параметричні, так і непараметричні методи статистичного аналізу. У разі нормального розподілу дані представляли у вигляді середнього значення та стандартного відхилення (M ± SD). Для вибірок із ненормальним розподілом результати наводили у вигляді медіани (Me) та міжквартильного інтервалу (Q1-Q3). Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували: однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) з пост-хок тестом Тьюкі – у випадку нормального розподілу та гомогенності дисперсій; непараметричний критерій Краскела-Волліса з подальшим множинним порівнянням за критерієм Данна – у разі відхилення від нормального розподілу. Порівняльний аналіз проводили у двох варіантах залежно від експериментального дизайну: у першому варіанті кожну експериментальну групу порівнювали лише з контрольною групою (multiple comparisons vs control); у другому варіанті виконували множинні порівняння між усіма досліджуваними групами (all-to-all comparisons). Рівень статистичної значущості приймали при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3
СТАН СИСТЕМИ ЗГОРТАННЯ КРОВІ У ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ПРОТИ SARS-CoV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД

На сьогодні вже доведеним є факт, що гостра фаза COVID-19 супроводжується глибокими порушеннями системи гемостазу на всіх її рівнях, що безпосередньо пов'язано з підвищеним ризиком тромботичних ускладнень. Ці зміни, зокрема гіперкоагуляція, ендотеліальна дисфункція, підвищена агрегаційна активність тромбоцитів та надмірна продукція прозапальних цитокінів, є добре документованими у клініко-лабораторних дослідженнях [122].

Натомість ситуація в постковідному періоді залишається значно менш вивченою. Водночас накопичується все більше свідчень того, що постковідний синдром принаймні у частини пацієнтів, супроводжується астенічними проявами, дисфункцією дихальної й серцево-судинної систем, а також суттєвими порушеннями коагуляційного гомеостазу. У ряді досліджень продемонстровано персистенцію маркерів активації згортання крові, таких як підвищені рівні D-димеру, фібриногену, тромбіну, що свідчить про збереження стану гіперкоагуляції навіть у фазі клінічного одужання.

Особливе занепокоєння викликає той факт, що ознаки порушення системи гемостазу спостерігаються не лише у пацієнтів з тяжким перебігом захворювання, але й у осіб з легкими або помірними формами COVID-19. Це вимагає впровадження ретельного лабораторного моніторингу та стратифікації ризиків тромботичних подій у постковідний період. Наявна гіперкоагуляція може виступати потенційним патогенетичним чинником таких ускладнень, як венозна тромбоемболія, інфаркт міокарда, ішемічний інсульт, що істотно впливають на віддалений прогноз.

З огляду на складну, багатокомпонентну архітектоніку системи гемостазу, обґрунтованим є проведення комплексних досліджень, спрямованих на аналіз динаміки змін концентрацій основних коагуляційних факторів, а також вмісту D-

димеру, фібриногену, визначення протромбінового та тромбінового часу. Такий підхід дає змогу не лише виявити субклінічні ознаки дисбалансу в системі гемостазу, а й сформувати науково обґрунтовані підходи до профілактики та корекції гемостатичних порушень у осіб, які перенесли COVID-19.

Отже, дослідження змін у системі гемостазу в постковідному періоді набуває особливої актуальності, оскільки відкриває можливості для розробки ефективних стратегій профілактики тромботичних ускладнень, формування персоналізованих підходів до післяінфекційного нагляду та зменшення довготривалих наслідків перенесеного захворювання. Поглиблене розуміння особливостей коагуляційного дисбалансу також сприятиме ідентифікації ключових патогенетичних механізмів та дозволить знизити ризик розвитку ускладнень у періоді реконвалесценції.

На початковому етапі дослідження було здійснено оцінку функціонального стану системи зсідання крові шляхом проведення хронометричних коагуляційних тестів, що охоплюють три основні шляхи активації коагуляційного каскаду: внутрішній, зовнішній та загальний. Для цього використовували такі рутинні тести, як активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ), протромбіновий час (ПЧ) та тромбіновий час (ТЧ). ПЧ дозволяє оцінити стан зовнішнього шляху згортання, АЧТЧ - характеризує внутрішній шлях, а ТЧ відображає термінальну стадію гемостазу - перетворення фібриногену на фібрин [123].

У контексті оцінки порушень коагуляції у пацієнтів, які перенесли COVID-19, саме ці показники вважаються клінічно значущими маркерами ризику тромботичних ускладнень. Дані сучасних досліджень свідчать, що навіть через 4 тижні після клінічного одужання у частини пацієнтів зберігаються подовжені значення часу зсідання плазми крові у тестах ПЧ та АЧТЧ, що вказує на тривалі зміни коагуляційного балансу. Ще більш показовим є факт, що такі відхилення супроводжуються зниженням рівня коагуляційного фактору V, на тлі чого у літературі описано зростання концентрації та активності інгібіторів фактора V у постковідний період [124,125].

Аналіз результатів визначення часу зсідання плазми крові у тесті АЧТЧ у групах донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 не дозволяє зробити висновок про відхилення цього показника від значень у групі донорів з нульовим титром антитіл (рис.3.1). Можемо лише відзначити тенденцію до подовження часу зсідання плазми крові у тесті АЧТЧ із підвищенням титру антитіл. Лише у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) було відмічено статистично достовірне подовження значень АЧТЧ-тесту, що свідчить про порушення рівноваги між прокоагуляційною та антикоагуляційною ланками системи гемостазу.

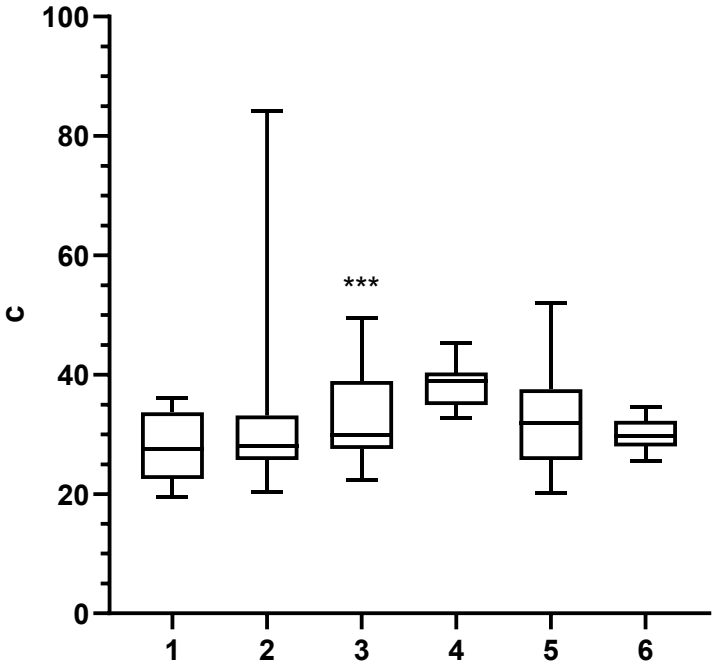


Рис. 3.1. Час зсідання плазми крові у тесті «активований частково тромбопластиновий час» у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2;

На рис.3.2 та рис.3.3 наведено результати дослідження, відповідно, часу зсідання плазми крові у тесті ПЧ і міжнародне нормалізоване співвідношення (МНС) у групах донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG.

Як бачимо, протромбіновий час був подовжений у донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5, 75 ± 5 Індекс (S/C) - цей показник був на 17,5% вищим ніж значення у групі донорів з нульовим титром антитіл. Наші результати співпадають з даними, отриманими іншими дослідниками. Так, у дослідженні von Meijenfeldt та співавт. (2021) встановлено, що через 4 місяці після виписки у пацієнтів, які перенесли COVID-19, зберігається подовжений час у тесті ПЧ, що свідчить про порушення зовнішнього шляху коагуляції при відсутності гострої інфекції [126].

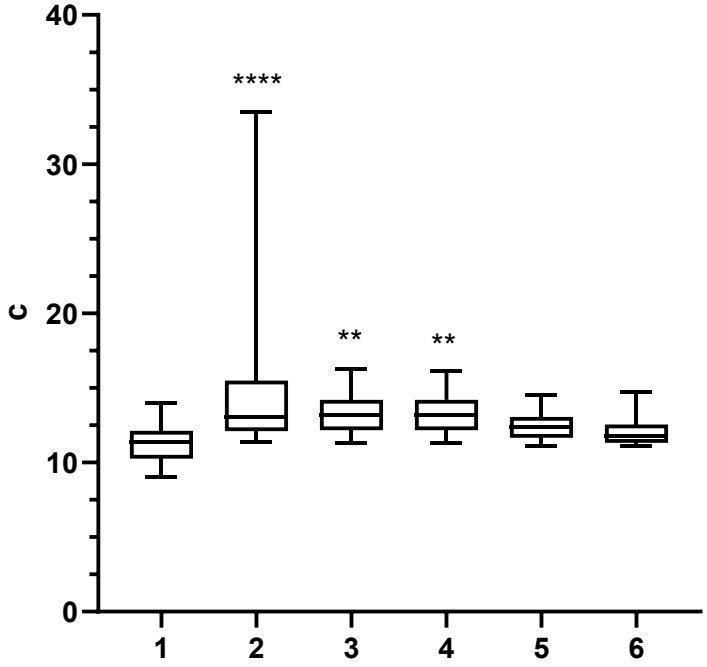


Рис. 3.2. Час зсідання плазми крові у тесті «протромбіновий час» у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Такі результати можуть бути свідченням нестачі факторів згортання крові, що задіяні у зовнішньому шляху зсідання – це, зокрема, фактори VII, X і II. А оскільки перераховані фактори належать до групи вітамін К-залежних білків, то

не виключено, що за нестачі вітаміну К – стану, який часто діагностується у постковідний період, можуть утворюватися функціонально неактивні форми (PIVKA), які не беруть участі у процесі зсідання крові.

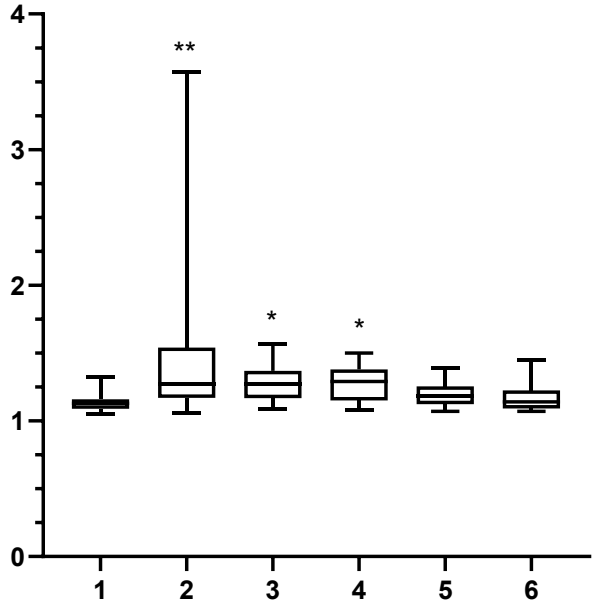


Рис. 3.3. Міжнародне нормалізоване співвідношення у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * p<0,05 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Відхилення показників міжнародного нормалізованого співвідношення фіксувалися у тих самих групах донорів, для яких було виявлено зміни часу зсідання плазми у тесті ПЧ, а саме - у групах з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG: 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C) та 75 ± 5 Індекс (S/C).

Також було оцінено час зсідання плазми крові у тесті «тромбіновий час». Як видно з даних, наведених на рис.3.4 статистично значуще подовження показників ТЧ спостерігалося лише у групі донорів з титром 10 ± 3 Індекс (S/C), що може свідчити про вибіркові зміни на кінцевому етапі каскаду перетворення фібриногену на фібрин у цієї категорії осіб.

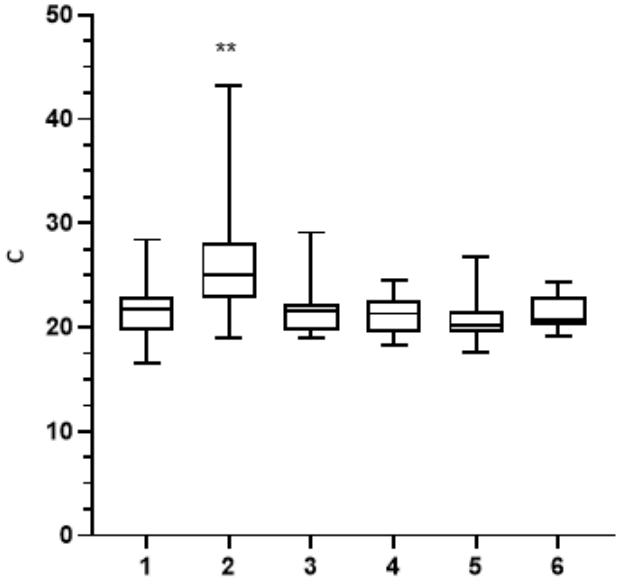


Рис. 3.4. Час зсідання плазми крові у тесті «тромбіновий час» у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Узагальнюючи результати, отримані у ході оцінки показників трьох ключових коагуляційних тестів, можна дійти висновку про наявність певних відхилень у коагуляційній ланці системи гемостазу, зокрема на рівні зовнішнього шляху активації згортання крові. Звертає на себе увагу той факт, що у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) спостерігалося подовження часу зсідання плазми у тестах ПЧ та АЧТЧ, що вказує на залучення як зовнішнього, так і внутрішнього коагуляційного шляху. Водночас у групі донорів з титром 10 ± 3 Індекс (S/C) було виявлено подовження ПЧ та ТЧ, що свідчить про можливу дисфункцію в термінальній фазі коагуляційного каскаду, пов’язану з перетворенням фібриногену на фібрин. Такі відмінності у коагуляційних профілях можуть відображати дещо відмінні патофізіологічні механізми, які лежать в основі порушень згортання крові у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, що перенесли COVID-19.

У літературі описано декілька потенційних причин подовження часу зсідання плазми крові у тестах АЧТЧ, ТЧ та ПЧ. Одним із основних механізмів вважається дефіцит або функціональні порушення прокоагулянтних факторів, зокрема факторів VIII та X, що відіграють критичну роль у внутрішньому та спільному шляхах коагуляції [127].

Водночас у певних клінічних ситуаціях можливо також зниження значень АЧТЧ, ТЧ та ПЧ, що, як правило, пов'язано з дефіцитом активності природних антикоагулянтів, таких як антитромбін III та протеїн С, - що обумовлює переважання прокоагуляційного потенціалу у системі гемостазу [128].

Не можна виключати, що виявлені порушення коагуляційного гомеостазу можуть бути зумовлені накопиченням у кровотоці аутоантитіл, утворення яких є одним із характерних наслідків перенесеної SARS-CoV-2-інфекції. Згідно з даними літератури, COVID-19 здатен індукувати продукцію широкого спектра аутоантитіл, які можуть зберігатися у кровотоці впродовж тривалого часу - навіть до одного року після одужання [129], і бути пов'язаними з розвитком симптомів постковідного синдрому.

Зокрема, у роботі [130] показано утворення аутоантитіл до білків нервової системи, що корелює з проявами нейрокогнітивних розладів і неврологічної симптоматики у реконвалесцентів. Окрім того, виявлення антинуклеарних антитіл та антинейтрофільних цитоплазматичних антитіл розглядається як один із механізмів поствірусної імунної дисрегуляції, що є типовим для постковідного періоду [129].

Цікаво, що у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 спектр аутоантитіл є значно ширшим і включає, зокрема антитіла до кардіоліпіну, клаудину та глікопротеїнів тромбоцитів, що може посилювати як коагуляційні, так і судинні ускладнення [131].

З огляду на наведені дані, не виключено, що у кровотоці донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 може циркулювати специфічний пул аутоантитіл, здатних здійснювати ефекторний вплив на ключові компоненти системи гемостазу, тим самим опосередковано або безпосередньо модифікуючи

коагуляційні процеси. Така імунна інтерференція може сприяти розвитку дисбалансу між про- та антикоагуляційними механізмами. Однак подібне припущення на даному етапі залишається гіпотетичним і потребує додаткової експериментальної верифікації з метою встановлення причинно-наслідкових зв'язків та характеру взаємодії антитіл з мішенями у системі згортання крові.

Особливу увагу в контексті постковідних порушень коагуляційного гомеостазу привертають випадки підвищення концентрації антифосфоліпідних антитіл, зокрема так званого вовчакового антикоагулянта (Lupus Anticoagulant) - одного з добре відомих чинників подовження часу у тесті АЧТЧ. У пацієнтів, які перенесли COVID-19, цей феномен набуває особливого клінічного значення, оскільки може відображати аутоімунно опосередковані механізми тривалого коагуляційного дисбалансу. Результати низки лабораторних досліджень продемонстрували, що через три місяці після одужання від COVID-19 у деяких осіб спостерігалося стійке подовження показників ПЧ та АЧТЧ, що, ймовірно, пов'язано з формуванням транзиторного або персистуючого антифосфоліпідного синдрому [132,133]. Подібні зміни можуть виступати патогенетичною ланкою постковідного тромботичного ризику й потребують уважного лабораторного моніторингу.

Беручи до уваги дані літератури та результати власних досліджень, ми припускаємо, що одним із можливих механізмів коагуляційних порушень у осіб, які одужали від COVID-19, може бути активація аутоімунних процесів, зумовлена імунною пам'яттю до SARS-CoV-2 або феноменом молекулярної мімікрії. У цьому контексті антитіла класу G проти SARS-CoV-2 можуть виступати тригером імунної перебудови, що призводить до так званого «аутоімунного вибуху». Одним із клінічно значущих наслідків цього процесу є накопичення антифосфоліпідних антитіл, які здатні дезорганізовувати функціонування системи гемостазу, спричиняючи дисбаланс між про- та антикоагулянтними механізмами. За нашими спостереженнями, характер і ступінь порушень у системі згортання крові можуть варіювати залежно від титру

анти-SARS-CoV-2 IgG, що свідчить про можливий імунозалежний характер виявленого коагуляційного дисбалансу в постковідному періоді.

Задля комплексної оцінки стану коагуляційного гемостазу було досліджено концентрацію фібриногену, вміст молекул протромбінового походження та потенційну активність протромбіну, а також концентрацію РФМК та D-димеру у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2.

Фібриноген є одним із ключових компонентів системи згортання крові, а його концентрація в плазмі розглядається як важливий прогностичний маркер низки патологічних станів, пов'язаних із порушеннями гемостазу. Дані численних епідеміологічних досліджень доводять існування тісного зв'язку між рівнем фібриногену та ризиком розвитку тромботичних ускладнень, оскільки саме фаза фібриноутворення відіграє визначальну роль у механізмах виникнення тромбозу. Від концентрації фібриногену залежить в'язкість крові, також рівень фібриногену впливає на процес агрегації тромбоцитів і еритроцитів та сприяє адгезії лейкоцитів.

Враховуючи важливу роль фібриногену, надалі було досліджено його концентрацію у плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Виявлено зростання концентрації фібриногену у всіх групах донорів за виключенням груп з титром анти-SARS-CoV-2 IgG на рівні 75 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C), де концентрація фібриногену була на рівні значень групи донорів з нульовим титром антитіл (рис.3.5). Примітно, що найвища концентрація фібриногену спостерігалась у донорів з найнижчим титром IgG – 460 мг/дл у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) проти 253 мг/дл у групі донорів з нульовим титром антитіл.

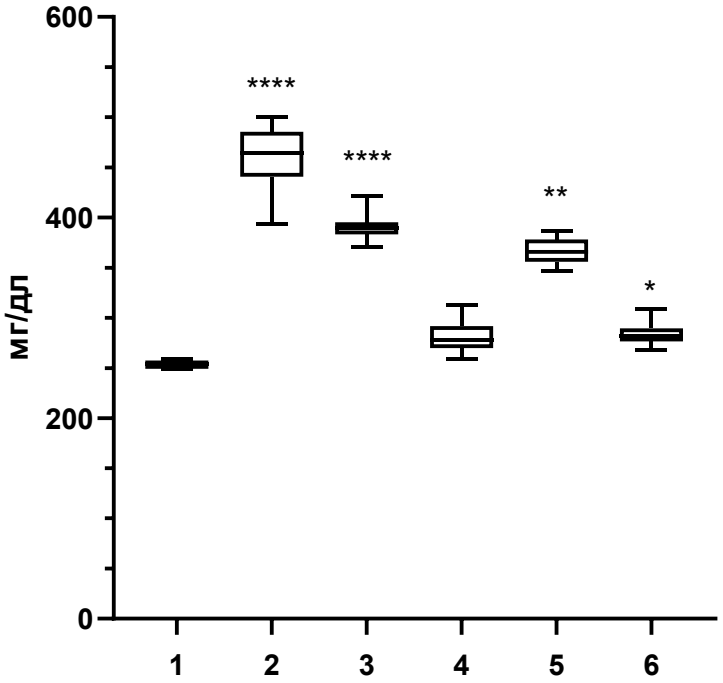


Рис. 3.5. Концентрація фібриногену у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C); ** $p\leq0,01$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C); * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C)

Отримані нами результати узгоджуються з даними Carpio та співавт. (2023), які показали, що у пацієнтів, які перенесли тяжку форму COVID-19, рівень фібриногену залишався підвищеним навіть через 4 місяці після інфікування [134]. У цих пацієнтів також були підвищені показники KL-6 (Krebs von den Lungen-6) - мукоподібного глікопротеїну, що синтезується альвеолярними клітинами II типу та є маркером альвеолоепітеліального пошкодження. Із значним зростанням KL-6 корелювали також підвищення рівнів феритину та D-димеру, що вказує на тривале системне запалення та розвиток фібротичних змін у легень. У дослідженні Korolova та співавт. (2022) відзначено тривале збереження підвищених рівнів фібриногену та протромбіну-1 у пацієнтів

з високим ризиком виникнення тромбозів, що свідчить про збереження протромботичного стану у системі гемостазу навіть через три місяці після одужання [135].

Підвищений рівень фібриногену, що зберігається у віддалені терміни після перенесеного COVID-19, становить значний ризик тромбоутворення. Цей стан асоціюється з розвитком таких ускладнень, як тромбоз глибоких вен, легенева емболія, інфаркт міокарду та ішемічний інсульт [136]. Підвищена концентрація фібриногену є фактором, що сприяє формуванню більш щільних «нефізіологічних» тромбів зі зміненими фізико-хімічними властивостями, що погіршують легеневу та системну гемодинаміку. Отже, визначення рівня фібриногену у пацієнтів, які перенесли COVID-19, має важливе клінічне значення для стратифікації ризиків тромботичних ускладнень і вибору стратегії тривалості антикоагулянтної терапії, особливо у періоді реконвалесценції.

Як відомо, рецептори ACE2 – першочергова мішень SARS-CoV-2, що забезпечує прикріплення вірусу до клітин хазяїна та реплікацію, яка сприяє розповсюдженню вірусних часток. Альвеолярні макрофаги швидко синтезують ACE2 на своїй поверхні, що, ймовірно, викликає безпосереднє захоплення та нейтралізацію SARS-CoV-2. Зауважимо, макрофаги – внутрішній первинний бар'єр імунної системи, який спрацьовує, як тільки в організм проник чужорідний матеріал. У тому числі атака макрофагів впливає на стінки альвеол, що призводить до пошкодження кровоносних судин. Активується тромбопластин, який накопичується у макрофагах, та викликає запуск коагуляційного каскаду. Очевидно, такий розвиток подій призводить до зростання концентрацій основних факторів згортання крові, у тому числі й фібриногену, у гостру фазу захворювання [137]. Під час інтенсивної імунної відповіді на SARS-CoV-2 макрофаги активуються та продукують значні кількості прозапальних цитокінів, насамперед IL-6, який відіграє ключову роль у формуванні системного прозапального стану. Такий стан, у свою чергу, асоційований з активацією ендотелію та тромбоцитів, спричиняючи порушення на рівні судинно-тромбоцитарної ланки гомеостазу. Підвищення рівня IL-6

вважається однією з ознак тяжкого перебігу захворювання та предиктором ризику тромботичних ускладнень. Результати дослідження Gudipati та співавт. (2025) демонструють, що пацієнти з COVID-19, зокрема особи з імуносупресією, мають суттєво підвищений ризик розвитку гіперінфламмації та асоційованих з нею коагуляційних порушень [138]. Таким чином, імунозапальні механізми, активовані SARS-CoV-2, сприяють виникненню тривкого коагуляційного дисбалансу, що зумовлює необхідність комплексного моніторингу маркерів запалення та гемостазу як у гострій, так і у відновній фазі захворювання. Автори підкреслюють, що цей ефект частково зумовлений надмірною активацією макрофагальної ланки імунної системи, яка сприяє активації тканинного фактору, секреції IL-6 та стимуляції коагуляційного каскаду. Тому роль макрофагів при перебігу COVID-19 двояка. З одного боку, вони забезпечують швидку імунну відповідь, з іншого – викликають запуск каскаду коагуляційних подій в організмі. Джерелом виступають ураженні вірусом та інактивовані клітини альвеол зі збагаченими на тромбопластин альвеолярними макрофагами. У нормальному фізіологічному стані активований тромбопластин забезпечує утворення тромбіну, який сприяє перетворенню фібриногену у фібрин з проміжною стадією формування РФМК та подальшим розщепленням фібрину до розчинних D-димерів та інших продуктів деградації.

Фібриноген є не лише ключовим компонентом системи згортання крові, але й належить до групи «білків гострої фази», синтез яких посилюється у відповідь на запальні процеси, стрес, інфекційні захворювання та травми. Як відомо, гостра фаза захворювання на COVID-19 характеризується гострим запальним процесом та інтенсивною імунною відповіддю організму на інфекцію SARS-CoV-2, що включає активацію вродженого та адаптивного імунітету. Цей процес супроводжується вивільненням низки прозапальних цитокінів, таких як IL-6, IL-1β, TNF-α та інтерферони [139]. Надмірне продукування цих медіаторів є причиною "цитокінового шторму", який асоціюється з важкими клінічними проявами та підвищеною смертністю у пацієнтів з COVID-19 [139]. Саме виражений запальний процес під час гострої фази COVID-19 може спричинити

пошкодження різних органів, включаючи легені, серце, нирки та центральну нервову систему. Зокрема, ураження легенів може призвести до гострого респіраторного дистрес-синдрому, що є основною причиною госпіталізації та необхідності впровадження інтенсивної терапії [140]. Крім того, системне запалення може викликати тромбоемболічні ускладнення, такі як венозна тромбоемболія та інсульт [140]. Для контролю надмірного запалення під час гострої фази COVID-19 застосовуються різні терапевтичні підходи. Кортикостероїди, такі як дексаметазон, показали ефективність у зниженні смертності серед пацієнтів з важкими формами COVID-19 [141]. Інші імуносупресивні препарати, такі як інгібітори IL-6 (наприклад, тоцилізумаб), також досліджуються для лікування надмірної запальної відповіді [142].

Тобто, виявлене в ході дослідження зростання концентрації фібриногену у плазмі крові осіб, що перенесли COVID-19, може бути свідченням наявності хронічного підгострого запалення, яке зберігається у постковідний період та може впливати на різні системи організму [143], провокуючи виникнення ускладнень на рівні окремих систем, зокрема, тривале запалення може призвести до фіброзу легеневої тканини, що проявляється задишкою та зниженням функції легень [144]; спричиняти міокардит, перикардит та ендотеліальну дисфункцію, підвищуючи ризик тромбозів та інших серцево-судинних ускладнень [144]. Доведено, що хронічне запалення може впливати на центральну та периферичну нервову систему, викликаючи когнітивні порушення, депресію та інші неврологічні симптоми [145,146].

Згідно літератури [147], після гострої фази захворювання на COVID-19 імунна система може залишатися активованою, що супроводжується тривалим вивільненням прозапальних цитокінів, таких як IL-6, IL-1β та TNF-α. Одним із механізмів, що пояснює взаємозв’язок між підвищеним рівнем фібриногену та запальними процесами, є підвищення концентрації IL-6, що часто спостерігається у осіб, що перенесли ковідну інфекцію. Ще однією причиною активізації імунної системи може бути персистенція вірусних антигенів або активізація аутоімунних реакцій, спричинена молекулярною мімікрією.

Сучасні дослідження свідчать, що низка вірусів здатна зберігатися в організмі хазяїна після завершення гострої фази інфекції у формі хронічно-літичної або латентної персистенції. Такий стан характеризується тим, що вірус або його компоненти не елімінуються повністю з організму, а залишаються у тканинах, створюючи так звані вірусні резервуари. Цей механізм добре описаний для вірусу варіцелла-зостер, ВІЛ, вірусу гепатиту С, вірусу Епштейна–Барр та вірусу папіломи людини, які здатні тривалий час підтримувати патологічну активність, навіть після зникнення клінічних ознак захворювання. Накопичується дедалі більше доказів, що подібна ситуація спостерігається й при SARS-CoV-2: у низці досліджень продемонстровано наявність вірусної РНК, білкових залишків або імунних маркерів вірусу в тканинах пацієнтів упродовж тривалого часу після перенесеної інфекції. Така тканинна персистенція може зумовлювати повторну активацію імунної системи, підтримуючи хронічний запальний стан та клінічні прояви постковідного синдрому.

Таким чином, наявність вірусних резервуарів SARS-CoV-2 розглядається як один із можливих механізмів розвитку постгострих ускладнень COVID-19, що включають порушення коагуляції, нейроімунну дисфункцію та формування фіброзних змін. Наявність генетичного матеріалу SARS-CoV-2 в організмі пацієнтів після завершення гострої фази інфекції отримала підтвердження у низці досліджень. Зокрема, мРНК та спайковий білок вірусу були виявлені у тканинах травного тракту та сечовидільної системи у пацієнтів із клінічно діагностованим постковідним синдромом навіть через кілька місяців після перенесеного COVID-19. Це вказує на можливу тривалу присутність вірусу або його фрагментів у периферичних тканинах. Крім того, інші дослідження демонструють наявність SARS-CoV-2 у зразках калових мас та різних органах, що свідчить про пролонговане вірусне виділення або тканинну персистенцію. Такі дані підтримують гіпотезу про те, що збереження вірусних компонентів може слугувати тригером для підтримки хронічного запалення та активації імунної відповіді, що лежить в основі постковідних ускладнень.

Основним фактором вірулентності SARS-CoV-2 є спайковий білок, який є ключовим елементом для прикріплення вірусу до клітин-мішеней через поверхневі рецептори ACE-2, рецептори TMPRSS-1 та позаклітинний віментин. Спайкові білки належать до класу I вірусних фузогенних білків і представлені на поверхні вірусу у вигляді виступаючих гомотримерів, що сприяють проникненню вірусу в клітини хазяїна. Ізольований спайковий білок має розмір від 180 до 200 кДа і містить позаклітинний N-кінцевий домен, трансмембранний домен, закріплений у мембрані вірусу, та короткий внутрішньоклітинний С-кінцевий сегмент. S1-субодиниця забезпечує зв'язування з рецептором клітини-хазяїна, тоді як S2-субодиниця сприяє вірусному злиттю та проникненню. Проте одного лише зв'язування з рецептором недостатньо для пояснення всіх клітинно-опосередкованих патологічних процесів, що виникають при цьому захворюванні. Спайковий білок може вивільнятися клітинами хазяїна, такими як нейтрофіли, моноцити, лімфоцити, тромбоцити, епітеліальні та ендотеліальні клітини у складі позаклітинних везикул та транспортуватися циркуляторною системою до віддалених тканин та органів, що, ймовірно, сприяє розвитку симптомів тривалого COVID.

Спайковий білок SARS-CoV-2 здатний зв'язуватися з фібриногеном у ділянці γ364–395, що є критично важливою для взаємодії фібриногену з інтегринами, а також із плазміном. Така конкуренція за зв'язування може порушувати природні функції фібриногену, спричиняючи утворення аномальних згустків фібрину, резистентних до фібринолізу, та ініціювати непередбачувану імунну відповідь. У цьому контексті ймовірним є залучення як механізмів вродженого, так і набутого імунітету, включно з активацією гуморальної відповіді.

Не виключено, що організм мобілізує комплексну імунну відповідь, спрямовану на нейтралізацію патологічного зв'язування фібриногену зі спайковим білком вірусу, що у підсумку може супроводжуватися різким підвищенням титрів антитіл проти SARS-CoV-2. Такий феномен може бути інтерпретований як імунна спроба опосередковано відновити функціональний

гомеостаз системи гемостазу через інгібування перехресної взаємодії вірусного білка з ключовими компонентами згортання.

На поверхні лейкоцитів, особливо нейтрофілів та моноцитів, локалізується рецептор MAC-1 (або αMβ2 інтегрин, або CD11b/CD18), що розпізнається позаклітинними РНК (в тому числі РНК SARS-CoV-2). Тоді ж фібриноген виступає у ролі ліганду MAC-1. Проникнення вірусу в організм стає пусковим механізмом для активації синтезу фібриногену як білка гострої фази запальної реакції, який насичує MAC-1. Утворений комплекс забезпечує адгезію лейкоцитів на поверхні ендотелію, що стимулює фагоцитарну здатність імунних клітин з метою пригнічення розповсюдження інфекційного процесу.

Нещодавно було висунуто припущення про наявність комплементарних сайтів зв'язування між N-білком SARS-CoV-2 та фібриногеном. Внаслідок взаємодії SARS-CoV-2 міг би вплинути на конформаційні особливості фібриногену, що призвело б до неспроможності зв'язування фібриногену з MAC-1. Такий перебіг подій блокував би адгезію лейкоцитів і, відповідно, пригнічував реакцій фагоцитозу вірусу, що дозволяло б SARS-CoV-2 стрімко поширюватися в організмі. Можливо, це ставало б причиною розвиток важкого респіраторного ураження пацієнтів, що потребують штучної вентиляції легень.

Є дані, що S-білок SARS-CoV-2 здатний зв'язуватися специфічно з фібриногеном у сайтах β119-129, γ163-181 та γ364-395. Зауважимо, що до складу сайту γ364-395 входить γ377-395, який забезпечує взаємодію фібриногену з MAC-1. Ми передбачаємо можливий розвиток двох процесів: або S-білок та MAC-1 конкурують за місце зв'язування, тоді S-білок прагне мобілізувати більшу кількість фібриногену плазми крові, щоб запобігти приєднання MAC-1 шляхом конформаційної зміни сайту γ364-395; або поява S-білку в організмі людини стає сигналом для активації фібриногену, який першочергово зв'язується з MAC-1, специфічно розпізнає і знешкоджує на чолі з фагоцитами S-білок SARS-CoV-2.

З огляду на вище зазначене можемо висунути припущення, що високий вміст фібриногену у плазмі крові донорів, які перехворіли на COVID-19 та мають

титр IgG проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C) є результатом персистентного запалення через антитілозалежні імунні реакції, у тому числі антитілозалежна активація нейтрофілів і моноцитів. Це спричиняє синтез тріади запальних цитокінів IL-6, TNF-α та IL-1β, які й викликають синтез білків гострої фази. Разом з тим, у осіб з вищими титром IgG проти SARS-CoV-2 спостерігалось зростання концентрації фібриногену порівняно з групою донорів з нульовим титром антитіл, однак не у таких високих концентраціях, як у групи з титром IgG проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C). До того ж S-білок, зв'язуючись з фібриногеном, призводить до формування аномальних згустків крові. Уже існують дослідження про виявлення аутоантитіл до фібрину у пацієнтів, які перехворіли COVID-19. Погіршення ситуації у важкохворих пацієнтів може бути спричинене тим, що імунна система не витримує навантаження, бо повинна працювати у двох напрямках – знешкодження вірусу та боротьба із наслідками його діяльності, у тому числі напрацювання аутоантитіл. Зростання концентрації фібриногену під час перебігу COVID-19 є особливо небезпечним у осіб із хронічними соматичними захворюваннями або у вагітних, для яких базовий рівень фібриногену фізіологічно підвищений [148].

У таких випадках додаткове зростання цього показника може призводити до надмірної активації коагуляційного каскаду, підвищення в'язкості крові та формування мікротромбозів, що суттєво підвищує ризик ускладнень.

Згідно з останніми дослідженнями, накопичення фібриногену у плазмі крові людей, які перенесли COVID-19, може бути ключовим чинником розвитку ускладнень коагуляції не лише у гострій фазі захворювання, але й у постковідний період. Зокрема, Kell та співавт. (2022) описали утворення амілоїдних мікрозгустків (fibrinaloid microclots) у кровотоці, які чинять негативний ефект [149]. Історично вважалося, що білки прагнуть до низькоенергетичних конформацій, а денатуровані структури зазвичай рефолдують у свою натуральну форму через енергетичну оптимізацію [150]. Однак у разі COVID-19 було продемонстровано, що спайковий білок SARS-CoV-2 або інші фактори можуть індукувати зміну конформаційної стабільності фібриногену, призводячи до

утворення стійких β-складчастих, амілоїдних агрегатів, які практично не піддаються фібринолізу, навіть у присутності тромбіну чи плазміну. Такі мікрозгустки можуть заблоковувати мікросудини, зменшуючи газообмін у тканинах - насамперед у легенях - та спричиняти хронічну гіпоксію, системне запалення та імунну реакцію, включно з продукцією аутоантитіл [149]. Цей механізм дозволяє пояснити численні симптоми постковідного синдрому — втомлюваність, задишку, когнітивні розлади, а також підвищений ризик тромботичних ускладнень. Оскільки амілоїдні мікрозгустки є резистентними до стандартного лікування, вони є перспективною мішенню для діагностики й терапії пацієнтів у постковідний період.

Набуття білками амілоїдної конформації асоційовано з розвитком низки захворювань, відомих під загальною назвою амілоїдози [150,151]. Так, амілоїдні форми описані у пацієнтів з хворобою Альцгеймера, хворобою Паркінсона, ЦД2 та ревматоїдним артритом [152-154]. Подібні феномени також спостерігалися при прееклампсії, у патогенезі якої встановлено мікробіологічний компонент. Цей феномен має надзвичайно важливе значення у контексті постковідних ускладнень, зокрема у змінах білків плазми, таких як фібриноген. Накопичуються дані, що фібриноген за певних умов (включаючи дію білків SARS-CoV-2 або цитокінів) може набувати амілоїдоподібної конфігурації, утворюючи стійкі до фібринолізу згустки. Ці структури морфологічно та біохімічно подібні до амілоїдів: вони містять впорядковані β-шари, піддаються фарбуванню тіофлавіном Т, конго червоним, або сучасними барвниками на основі кон’югованих оліготіофенів (Amytracker™). Це дає підстави розглядати змінений фібрин як фібриналоїд (структурно змінений фібрин амілоїдного типу) - структуру, що відіграє патогенетичну роль у розвитку постковідного синдрому, зокрема через мікротромбози, персистенцію запалення та порушення мікроциркуляції. Власне утворення мікротромбозів є наслідком системного запалення. І чим довше системне запалення персистує, тим більш виразним є мікротромбози і прогрусуватимуть тромбоемболічні явища.

Аналогічно до амілоїдної форми пріонного білка PrP^{Sc}, яка стійка до дії протеїнази K (використовується як діагностичний тест на наявність PrP^{Sc}) [155], фібрин у формі фібриналоїду також проявляє резистентність до протеолітичного розщеплення. Це пояснює його стійкість, тривалу персистенцію в циркуляції та, можливо, патогенетичну роль у постковідних порушеннях мікроциркуляції та імунного гомеостазу.

Окрім фібрину, до складу таких мікрозгустків також входять інші плазмові білки, зокрема α_2-антиплазмін, [156, 157]. Через свої розміри (1–200 мкм) вони здатні ефективно блокувати капіляри різного діаметру, значно обмежуючи доставку кисню до тканин та викликаючи гіпоксію.

Отже, підвищення концентрації фібриногену - це одночасно і тригер запуску каскаду коагуляційних подій і, разом з тим, активний учасник запальної відповіді, що має ключове значення для патогенезу багатьох захворювань - від атеросклерозу та інсульту до ревматоїдного артриту й COVID-19.

Беручи до уваги встановлене підвищення концентрації фібриногену в плазмі крові донорів усіх досліджуваних груп, надалі було досліджено вміст РФМК - характерних маркерів, що відображають стан тромбінемії та активації коагуляційного каскаду. РФМК - це високомолекулярні структури, до складу яких входять мономерний фібрин, фібриноген та продукти їхньої часткової деградації. Вони утворюються на ранніх етапах коагуляції, як проміжні комплекси у процесі перетворення фібриногену на фібрин під дією тромбіну. Підвищення рівня РФМК свідчить про активацію системи зсідання крові до моменту формування стабільного фібринового згустку, що робить їх чутливим індикатором ранньої коагуляційної активації. У нормі РФМК швидко елімінуються з кровотоку за умови збереженої активності системи фібринолізу. Проте при дисбалансі між компонентами системи гемостазу їх концентрація може залишатися підвищеною, що свідчить про наявність протромботичного стану та потенційно асоціюється з підвищеним ризиком розвитку тромбогеморагічних ускладнень.

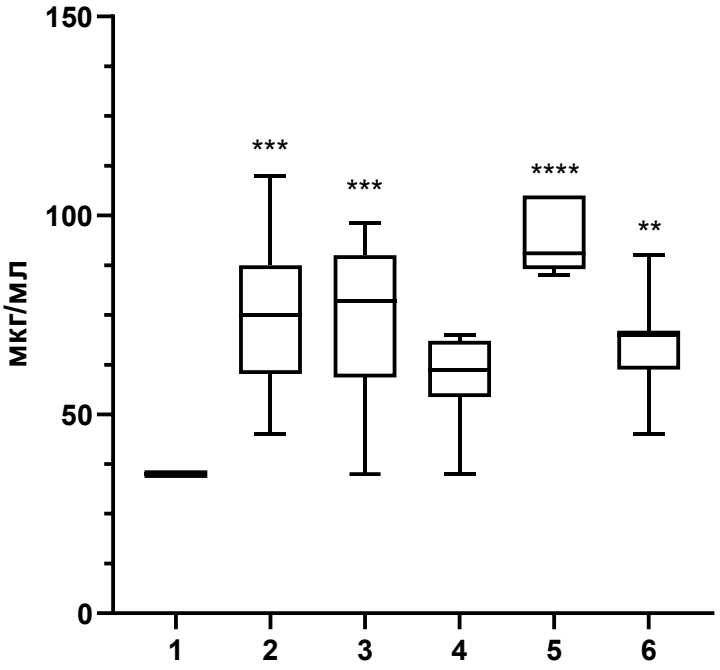


Рис. 3.6. Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Тобто РФМК присутні в кровотоці у певних кількостях навіть за умов відсутності патологічного процесу, адже РФМК – це неминучий етап перетворення розчинного фібриногену у нерозчинний фібрин у процесі активації процесу згортання крові, тому у плазмі донорів з нульовим титром анти-SARS-CoV-2 IgG також було визначено певну кількість РФМК (рис.3.6). Нами виявлено суттєве зростання концентрації РФМК у плазмі крові донорів всіх груп, проте найвищий показник було зафіксовано у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), який у 2,65 рази перевищував значення у групі донорів з нульовим титром; найменш виражене зростання вмісту РФМК було виявлено у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C).

Зростання концентрації РФМК свідчить про активацію процесу перетворення розчинного фібриногену у нерозчинний фібриновий згусток, а відтак є непрямим доказом підвищеної загрози тромбоутворення у віддалені терміни після перенесеної ковідної інфекції.

Варто наголосити, що РФМК не є інертними утвореннями: за їх накопичення зростає ймовірність спонтанної полімеризації мономерів фібрину у протофібрили (ланцюги з 20–25 мономерів), які можуть випадати в осад з утворенням мікротромбів. Такі мікротромботичні структури є недоступними для виявлення за допомогою стандартних лабораторних коагуляційних методик, що значно ускладнює їх діагностику. Крім того, розчинна форма РФМК сприяє їх широкому розповсюдженню в судинному руслі, що, у свою чергу, підвищує ризик формування тромбів у мікроциркуляторному руслі, зокрема в судинах життєво важливих органів. Таким чином, зростання рівня РФМК може бути не лише маркером, а й активним чинником прогресування тромботичних ускладнень.

Разом з тим, зростання концентрації РФМК може вказувати не лише на активацію системи згортання крові, але й бути непрямим підтвердженням порушення динамічної рівноваги між процесами коагуляції та функціонуванням системи фібринолізу.

Результати роботи [152] свідчать, що продукти деградації фібрину, а також фібринові згустки, що відкладаються на поверхні ендотелію, через взаємодію з рецепторами ліпопротеїнів дуже низької щільності (VLDLR) здатні стимулювати трансендотеліальну міграцію лейкоцитів сприяючи у такий спосіб збереженню локального запального процесу. Сайт зв’язування VLDLR локалізований у С-термінальній частині ВβN-доменів фібрину. Тобто на відстані від сайту, який при перетворенні фібриногену у фібрин повинен бути відщеплений для вивільнення фібринопептиду В. Автори показали, що у фібриногену цей сайт повністю екранований у ВβN-домени фібриногену, тоді як конформаційні зміни при формуванні фібрину забезпечують вільний доступ до цих ділянок. У результаті VLDLR, локалізований на ендотеліальних клітинах, специфічно взаємодіє з

фібрином, що стимулює процес трансміграції адгезованих на поверхні ендотелію лейкоцитів до ділянок запалення VLDL-залежним шляхом

З огляду на те, що до складу фракції РФМК можуть входити фрагменти, здатні впливати на активність окремих компонентів системи гемостазу, дослідження якісного складу фракції РФМК набуває особливого значення. Такий аналіз дозволяє не лише оцінити ступінь порушення коагуляції, але й виявити потенційні молекулярні взаємозв'язки між окремими його ланками. У зв'язку з цим наступним завданням роботи було проаналізувати якісний склад фракцій РФМК у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2.

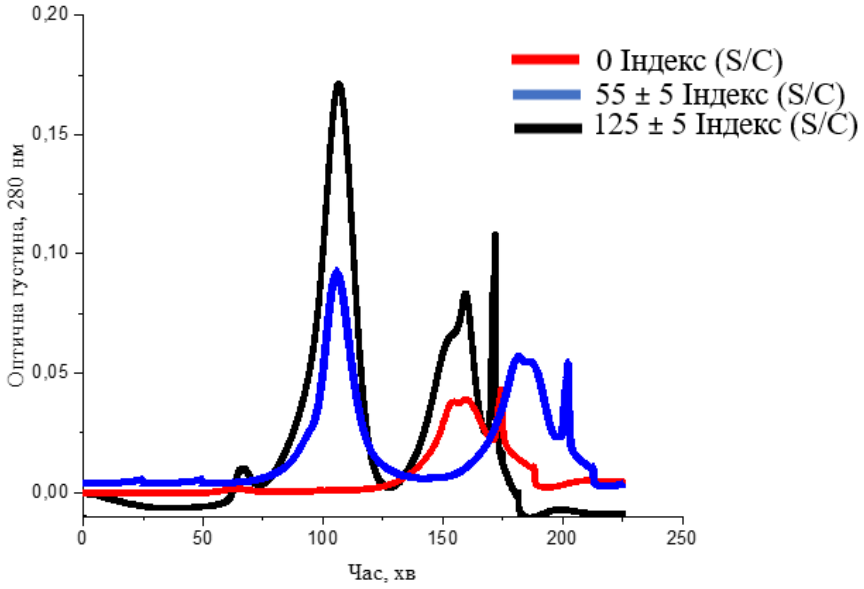


Рис. 3.7. Хроматограми розділення фракцій розчинних фібрин-мономерних комплексів, отриманих з плазми крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C)

Так як характер розподілу піків при аналізі фракцій РФМК методом хроматографії, що поділяє за розмірами, (рис. 3.7) був у цілому типовим для всіх груп донорів і різниця між окремими групами донорів з різними титрами антитіл полягала лише у збільшенні площі під піками (тобто вмісту окремих складових) та появі невеликих додаткових піків, на рис.3.7 наведено хроматограми розділення фракцій РФМК лише для донорів з нульовим титром антитіл проти

SARS-CoV-2 та груп донорів для яких було виявлено мінімальну та максимальну концентрацію РФМК. Це, відповідно, групи донорів з титрами IgG проти SARS-CoV-2 на рівні 55 ± 5 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C).

Аналіз хроматограм свідчить про неоднорідність складу фракції РФМК у донорів з різними титрами антитіл у порівнянні зі значенням у донорів з нульовим титром (табл.3.1). Присутність у складі фракції РФМК білків з молекулярною масою вище 300 кДа може бути результатом співосадження розчинних фібрин-мономерних комплексів разом з нативним фібриногеном і/чи фрагментами фібриногену/фібрину.

Разом з тим, значне збільшення площі під піками для фракцій, що відповідають білкам з молекулярною масою понад 200 кДа для донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 порівняно з результатами в групі донорів з нульовим титром антитіл, може бути непрямим свідченням утворення комплексів внаслідок латеральної асоціації протофібрил.

Таблиця 3.1

Результати аналізу складу фракцій РФМК, отриманих з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, методом хроматографії, що поділяє за розмірами

Групи донорів, Індекс (S/C)	Кількість піків	Площа під піками, ум.од.	Молекулярна маса, кДа
0	1	0,18918	282
	2	0,02729	263
	3	0,06337	224
	4	0,17065	158
55 ± 5	1	0,94025	345
	2	0,46707	177
	3	0,25159	167

Продовження табл.3.1

	4	0,0725	155
	5	0,00025	146
125 ± 5	1	1,42478	467
	2	1,92659	343
	3	1,80097	283
	4	0,11247	267
	5	0,17762	231
	6	0,31734	165

Наявність у складі фракцій білків з молекулярною масою нижче 270 кДа свідчить про присутність у складі фракції РФМК фрагментів фібрину/фібриногену різного ступеню деградації. Завдяки наявності сайтів зв'язування для різних факторів системи гемостазу та їх регуляторів, у тому числі й антитіл, ці фрагменти можуть бути залучені до механізмів порушення фібринолізу, що спостерігаються у частини пацієнтів у постковідний період. У ширшому розумінні, присутність фрагментів з різною молекулярною масою може вказувати на неконтрольовану активацію біохімічних процесів, у яких задіяні молекули фібриногенового чи фібринового походження, на всіх рівнях регуляції.

До того ж продукти деградації фібрину здатні інгібувати процеси полімеризації молекул фібриногену у нерозчинну фібринову сітку. Найважливішу роль виконують D-фрагменти, тоді як D-димери також виявляють незначну пригнічувальну здатністю. Вважається, що розчинні фібринові комплекси мають сайти зв'язування з D-фрагментом, що унеможливлює формування фібринових згустків. Такі дослідження дозволяють припустити, що присутність РФМК у високих концентраціях в плазмі крові пацієнтів, які перехворіли COVID-19, може бути викликане накопиченням D-фрагментів, що призводить до порушень процесів полімеризації фібринових волокон.

Біологічна роль похідних фібриногену/фібрину не обмежується лише інгібуванням процесів полімеризації фібрину. Вони відіграють певну роль у регуляції активації компонентів системи фібринолізу. Доведено, що один із продуктів ферментативного розщеплення фібриногену, зокрема Е-фрагмент, при взаємодії з Глу-плазміногеном сприяє формуванню в ньому активного центру.

Таким чином, отримані нами результати свідчать, що у осіб, які перенесли COVID-19, навіть за умов нормалізації більшості рутинних біохімічних показників, зберігається активаційна напруга у системі гемостазу, що проявляється підвищеною схильністю до тромбоутворення. Такий стан може залишатися клінічно малосимптомним, проте має потенціал до розвитку віддалених тромботичних ускладнень. Для поглибленої оцінки стану коагуляційної ланки системи гемостазу доцільним є аналіз вмісту молекул протромбінового походження, а також дослідження потенційної активності протромбіну, що і було наступним нашим завданням.

Протромбін (фактор II) є попередником серинової протеїнази тромбіну (КФ 3.4.21.5), що каталізує перетворення фібриногену у фібрин-мономер шляхом гідролізу чотирьох пептидних зв'язків, карбоксильні групи яких представлені залишками аргініну. У фінальній стадії коагуляційного процесу фактор Ха у складі протромбіназного комплексу (що включає фактори Ха, Va та фосфоліпіди), відщеплює активаційний пептид (фрагмент протромбіну 1.2), що призводить до утворення активного тромбіну. У результаті дії тромбіну відбувається перетворення фібриногену у нерозчинний фібриновий згусток. Прокоагулянтні властивості тромбіну реалізуються в реакціях, спрямованих на активацію та вивільнення факторів, які залучені до процесу згортання крові; тромбін індукує адгезію тромбоцитів та лейкоцитів до судинної стінки, взаємодіє зі специфічними рецепторами на поверхні тромбоцитів, спричиняючи агрегацію тромбоцитів; тромбін стимулює секрецію ендотелієм адгезивних білків прискорюючи у такий спосіб перетворення протромбіну у тромбін.

Тому важливим було оцінити вміст та потенційну активність протромбіну у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Спочатку

нами було визначено вміст молекул протромбінового походження, адже за цим показником можна зробити попередній висновок щодо стану системи зсідання. Отримані результати (рис.3.8) свідчать про зниження цього показника у всіх групах донорів за виключенням донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), для яких цей показник у 1,1 рази перевищував значення у групі донорів з нульовим титром антитіл. Найнижчий рівень молекул протромбінового походження було виявлено у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) – у цій групі вміст молекул протромбінового походження був у 1,3 рази нижчим за показник у групі донорів з нульовим титром антитіл (рис.3.8).

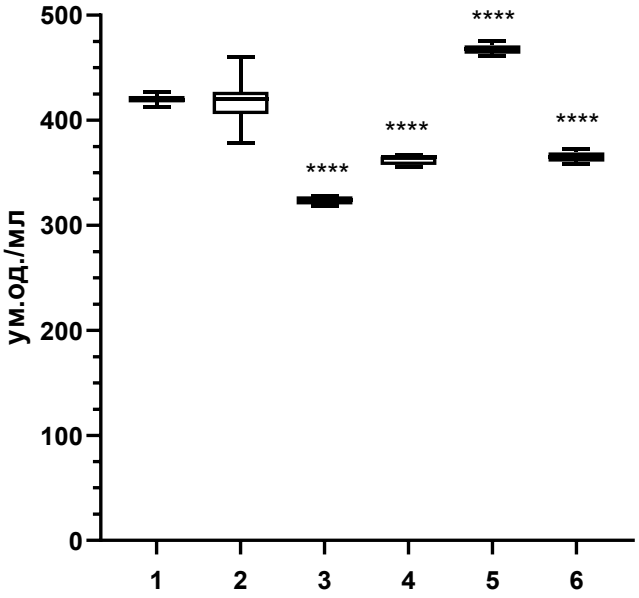


Рис. 3.8. Рівень молекул протромбінового походження у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Беручи до уваги, що зниження вмісту молекул протромбінового походження відбувається на тлі зростання концентрації РФМК та підвищеного вмісту фібриногену, основною причиною виявлених нами змін вмісту

протромбіну може бути посилення його перетворення у тромбін та посилення його використання у процесах коагуляції.

Утворення тромбіну значно підвищує ризик тромбоутворення, а відтак для запобігання надмірній активації коагуляції необхідна швидка інактивація тромбіну, яка забезпечується системою інгібіторів антитромбін III–гепарин. Цей захисний механізм блокує не лише тромбін, але й інші серинові протеїнази, зокрема фактори згортання крові Xa, IXa, XIIa, а також плазмін. У такий спосіб пригнічується не тільки дія тромбіну, але й запобігається його утворення з проферменту. Можемо припустити, що тромбін, який утворився, швидко зв'язується з антитромбіном III та виводиться з кровотоку так, як період напівжиття комплексу тромбін-антитромбін II становить близько 3–5 хв.

Є низка робіт, відповідно до яких, активація протромбіну може здійснюватися не лише за класичним ферментативним механізмом, але й за участі альтернативних шляхів, що має важливе значення як для фундаментальних уявлень про систему гемостазу, так і для клінічної практики. Зокрема, в роботах, проведених науковцями Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, було показано, що додавання мономерного desAB-фібрину до протромбіну індукує появу тромбіноподібної активності останнього щодо хромогенного субстрату S2238. Встановлено, що активація протромбіну у цьому випадку пов'язана з безпосередньою взаємодією з фібрином, зокрема через амінокислотні залишки в ділянці Bβ26–42 фібриногену. Це підтверджується тим, що антитіла до цього фрагменту істотно знижували ферментативну активність протромбіну, що вказує на критичну роль зазначеної ділянки у формуванні відповідного білкового комплексу [158]. Такі результати розширюють уявлення про неканонічні шляхи активації коагуляційних факторів, зокрема у контексті патологічних станів, а беручи до уваги етіологію коронавірусної інфекції, багаторівневість механізмів, залучених у перебіг патологічного процесу, не виключеним є існування неканонічних шляхів активації проферментів.

Разом з тим, можемо припустити, що частково причиною зниження рівня молекул протромбінового походження, у тому числі й протромбіну, може бути зниження синтетичної функції печінки. Вже доведено, що у постковідний період спостерігаються суттєві порушення у функціонуванні різних органів, у тому числі й печінки [159,160], яка, як відомо, є основним місцем синтезу факторів згортання крові (наприклад, протромбіну) та інших біологічно активних речовин [159]. Дослідження показали, що COVID-19 може викликати порушення функції печінки, що маніфестується підвищенням у сироватці крові рівнів печінкових ферментів, таких як аланінамінотрансфераза і аспартатамінотрансфераза. Ці зміни можуть бути наслідком прямого впливу вірусу на гепатоцити або результатом системного запального процесу [159, 161]. У нашому дослідженні [162] було показано, що активність печінкових ферментів таких як аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, γ-глутамілтрансфераза та лужна фосфатаза змінюються залежно від титру анти-SARS-CoV-2 IgG та порівняно з донорами, у кровотоці яких не було виявлено анти-SARS-CoV-2 IgG. У контексті постковідного синдрому такі порушення можуть зберігатися впродовж тривалого часу, негативно впливаючи на синтетичну функцію печінки та обумовлюючи зниження вмісту факторів згортання крові.

На наступному етапі дослідження було проаналізовано потенційну активність протромбіну як маркера, що дозволяє оцінити функціональний резерв коагуляційної ланки системи гемостазу. Це обумовлено тим, що за певних умов молекули протромбінового походження, які зберегли активний центр, здатні переходити у каталітично активні форми, які, за відсутності належного контролю з боку фізіологічних механізмів регуляції, можуть стати причиною виникнення тромбозів навіть у віддалені терміни після перенесеного захворювання. У контексті постковідного періоду, коли частина регуляторних механізмів може бути порушена, активація латентних форм протромбінових молекул може виступати тригером для тромбоутворення, навіть за відсутності клінічних проявів запального процесу. Тому визначення потенційної активності

протромбіну є важливим для виявлення осіб із підвищеним ризиком віддалених тромботичних ускладнень.

Оскільки як активатор протромбіну було використано екамулін, який, на відміну від тромбопластину, активує як протромбін, так і його функціонально неактивні форми, отримані результати дозволяють оцінити загальний потенціал всього пулу молекул протромбінового походження. Як бачимо з результатів, наведених на рис.3.9 у всіх групах донорів, за виключенням групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C), потенційна активність протромбіну була підвищеною, що свідчить про існування ризиків до тромбоутворення у віддалені терміни після перенесеного захворювання.

Найвищу потенційну активність протромбіну було виявлено за титру анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C), яка була на 72 % вище ніж у групі донорів з нульовим титром антитіл; найнижча активність спостерігалася за титрів антитіл 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) і складала 64 та 63 %, відповідно. Ці результати привертають особливу увагу з огляду на рівень молекул протромбінового пулу, який є найнижчим для донорів з найвищою потенційною активністю протромбіну і найвищим для донорів з найнижчою потенційною активністю протромбіну.

Така активність за титрів анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) може бути обумовлена присутністю серед пулу молекул протромбінового походження значного відсотка функціонально інертних молекул, які не здатні виявляти активність, а відтак не становлять потенційної загрози. Протилежна ситуація має місце у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C), для яких ризик тромботичних ускладнень є вищим, особливо за умови недостатньої активності системи фібринолізу.

Окрім своєї основної функції, тромбін залучений до регуляції запалення, адже активує клітини, залучені до запальних реакцій і процесів репарації тканин, зокрема моноцити, Т-лімфоцити, фібробласти, тучні клітини та нейрони. Крім того, він стимулює синтез і експресію на поверхні ендотеліальних клітин

адгезивних білків, компонентів системи фібринолізу (активаторів та інгібіторів), а також молекул, що регулюють адгезію та агрегацію клітин крові.

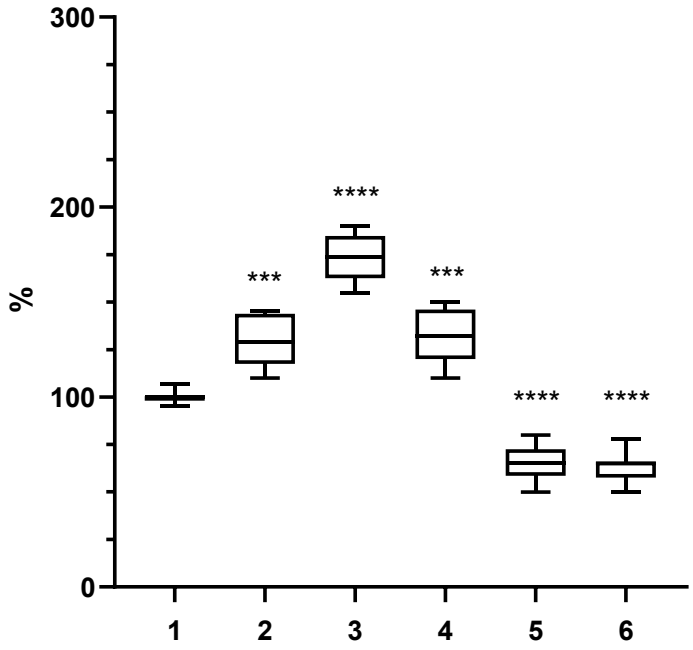


Рис. 3.9. Потенційна активність протромбіну у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Тромбін частково реалізує свою дію активуючи рецептори, активовані протеазою-1, на ендотеліальних клітинах і фібробластах, що стимулює синтез MCP-1, а також прозапальних цитокінів TNF-α, IL-1β та IL-6. Ці медіатори сприяють залученню тромбоцитів і лейкоцитів, їхній адгезії до ендотелію, що, у свою чергу, запускає запальну реакцію та активує прокоагулянтні процеси на судинній поверхні [163]. Ми припускаємо, що запальний процес, спричинений перенесеною вірусною інфекцією, може бути однією з причин, що викликають надмірну активацію протромбіну і що, у свою чергу, призводить до утворення тромбіну, залученого і до імунних реакцій організму. Важливо зазначити, що

тромбін може розщеплювати протромбін із утворенням проміжного продукту – претромбіну 1, який вважається фізіологічно неактивним [164], проте потенційно може виявляти активність, що створює додаткову загрозу у постковідних пацієнтів.

Не виключено, що серед причин зниження потенційної активності протромбіну у донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C) може бути присутність у кровотоці антифосфоліпідних антитіл, які, згідно з літературними даними [164,165], можуть з'являтися у пацієнтів, що перенесли COVID-19. Деякі з мішеней цих антитіл включають β2-глікопротеїн I, кініногени високої та низької молекулярної маси, анексин V, активований протеїн C, протеїн S та протромбін [169-172]. Автори роботи [173] зазначають, що антитіла до протромбіну інгібують активацію фактору X і самого протромбіну, тоді як антикардіоліпінові антитіла пригнічують лише активацію протромбіну, не впливаючи на активацію фактора X.

Протромбін належить до вітамін К-залежних білків, біосинтез яких відбувається за обов'язкової участі вітаміну К як кофактору під час процесу γ-карбоксилювання. N-кінцева ділянка таких білків містить від 10 до 15 залишків γ-карбоксиглутамінової кислоти (Gla), які забезпечують металозв'язуючі властивості, зокрема здатність до зв'язування з іонами кальцію, що є критично необхідним для їхньої участі у згортанні крові. У разі дефіциту вітаміну К γ-карбоксилювання залишається неповним, що призводить до утворення нефункціональних білкових форм, відомих як PIVKA (Proteins Induced by Vitamin K Absence/Antagonism). Ці білки не мають повноцінної коагулянтної активності та не здатні ефективно залучатися до гемостатичних процесів. Окрім протромбіну, вітамін К критично важливий для синтезу позапечінкового антикоагулянта - білка S, а також для активації матриксного Gla-білка (MGP), який відіграє захисну роль щодо еластичних структур легеневої паренхіми та судинної стінки, запобігаючи їх кальцифікації та деградації.

Автори роботи [174] висунули гіпотезу, що нестача вітаміну К може бути частиною патогенезу COVID-19 поєднуючи легеневу патологію та

тромбоемболічні порушення. Так, пневмонія, спричинена COVID-19, призводить до виснаження вітаміну K, що погіршує активацію MGP та білка S, сприяючи пошкодженню легень та тромбоемболії. Низка робіт свідчить, що певний дефіцит вітаміну K спостерігається за тяжкого перебігу COVID-19 і може зберігатися впродовж кількох місяців після перенесеного захворювання, навіть у пацієнтів з легким перебігом хвороби [175], а відтак можемо припустити, що це може вплинути на утворення функціонально повноцінних молекул протромбіну. У нашому дослідженні низька потенційна активність протромбіну спостерігалась саме за високих титрів антитіл, що може бути наслідком тяжкого перебігу захворювання.

Таким чином, у групах донорів з наявністю антитіл проти SARS-CoV-2 було виявлено зміни як у вмісті протромбіну, так і в його потенційній активності, що може вказувати на порушення функціональної цілісності коагуляційної ланки в постінфекційному періоді. Такі відхилення частково можуть бути обумовлені залишковими або хронічними запальними процесами, характерними для постковідного стану. Ми також припускаємо, що виявлені зміни можуть бути асоційовані з рівнем циркулюючих анти-SARS-CoV-2 антитіл, які формуються у відповідь на вірусне навантаження і мають потенціал опосередковано впливати на активність протромбіну, змінюючи його функціональний стан в умовах постковідного дисбалансу. Цей зв’язок вимагає подальшого вивчення для уточнення механізмів і клінічного значення таких змін.

Для глибшого вивчення змін рівня протромбіну було оцінено якісний склад фракцій вітамін К-залежних білків у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. До цієї групи білків належать фактори згортання крові (II, VII, IX, X), а також протеїни C та S. Їхньою спільною структурною особливістю є наявність у N-кінцевій частині молекули специфічного Gla-домену, який складається з 37–46 амінокислотних залишків. Цей домен має високий ступінь гомології серед зазначених білків і містить від 9 до 12 залишків γ-карбоксиглутамінової кислоти.

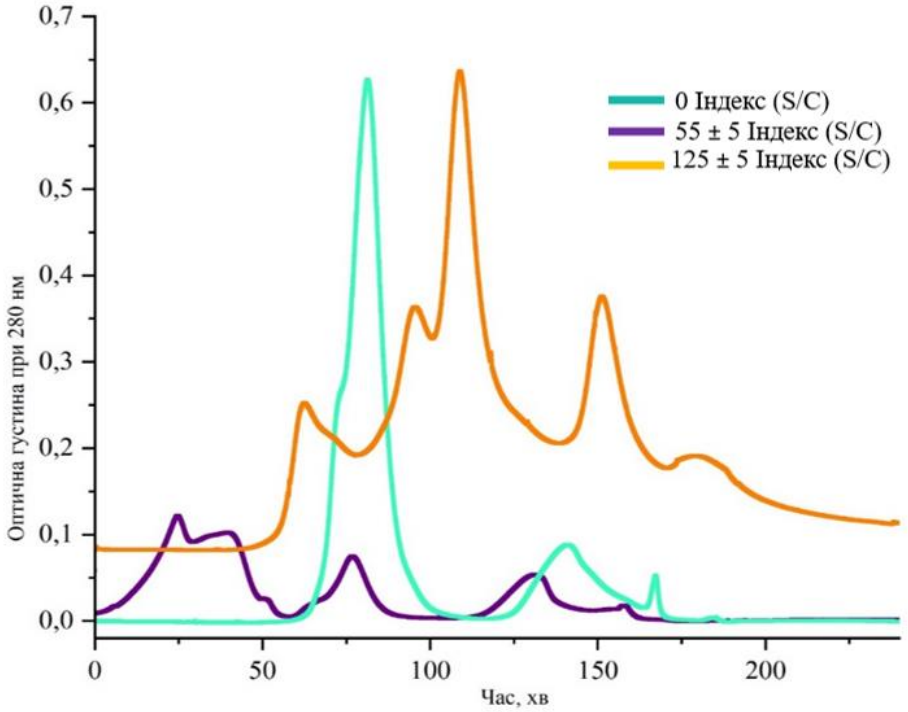


Рис. 3.10. Хроматограми розділення фракцій вітамін К-залежних білків, отриманих з плазми крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C)

Нами було очищено з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 фракції вітамін К-залежних білків, які надалі було проаналізовано методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Результати хроматографічного аналізу виявили суттєві відмінності у складі фракцій вітамін К-залежних білків серед груп донорів, які переважно виявляються у появі додаткових піків (рис.3.9). Якщо у групі донорів з нульовим титром антитіл фракція вітамін К-залежних білків була представлена трьома піками, що відповідають білкам з молекулярною масою 112, 70 та 54 кДа, то ця фракція у донорів, плазма крові яких містить антитіла проти SARS-CoV-2 розділялась на додаткові піки, кількість яких різнилася у залежності від титру. Крім того, площа піків була більшою ніж у групі донорів з нульовим титром антитіл.

Зазначимо, що на рис.3.10 наведено хроматограми розділення фракцій вітамін К-залежних білків, отриманих з плазми крові донорів з найвищим та найнижчим вмістом молекул протромбінового походження – титри анти-SARS-

CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C). Разом з тим, у табл. 3.2 представлено дані щодо якісно-кількісного складу фракцій вітамін К-залежних білків всіх груп донорів.

Як бачимо, у фракції вітамін К-залежних білків, очищених з плазми крові донорів з нульовим титром антитіл, присутній білок з молекулярною масою 70 кДа, що відповідає молекулярній масі протромбіну. Білки з подібною молекулярною масою – 76 і 73 кДа також виявлено у групах донорів з титром IgG проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C) 10 ± 3 та 125 ± 5.

Разом з тим, у фракціях вітамін К-залежних білків решти досліджуваних груп донорів, білків, що за молекулярною масою відповідають протромбіну, виявлено не було, що може бути опосередкованим свідченням активізації процесів його перетворення у активну форму.

У всіх досліджуваних групах донорів незалежно від титру антитіл та у групі донорів з нульовим титром анти-SARS-CoV-2 IgG було виявлено білки з молекулярною масою понад 100 кДа та білки з молекулярною масою нижче 50 кДа. Оскільки фракція вітамін К-залежних білків містить певну кількість факторів – протромбін (72 кДа), проакселерин (50 кДа), фактор Крістмаса (57 кДа), фактор Стюарта-Прауера (56 кДа), протеїн С (62 кДа) та протеїн S (69-78 кДа), то поява піків, що відповідають високомолекулярним білкам, може бути результатом утворення комплексів між вітамін К-залежними білками та/чи їх похідними з іншими плазмовими білками. Так, зокрема, комплекс тромбін–антитромбін III має молекулярну масу близько 100 кДа. В той час як піки, що відповідають низькомолекулярним білкам, можуть бути результатом розщеплення основних білків фракції вітамін К-залежних білків.

Таблиця 3.2

Результати аналізу складу фракцій вітамін К-залежних білків, отриманих з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2

Групи донорів, Індекс (S/C)	Кількість піків	Площа під піками, ум.од	Молекулярна маса, кДа
0	1	6,69	112
	2	0,58	70
	3	0,01	54
10 ± 3	1	0,22	141
	2	2,75	122
	3	8,52	102
	4	19,37	76
	5	3,18	54
	6	2,02	47
55 ± 5	1	3,45	103
	2	1,75	84
	3	3,76	60
	4	7,02	42
75 ± 5	1	0,04	223
	2	0,32	132
	3	1,81	117
	4	1,09	64
	5	20,82	53
125 ± 5	1	7,78	80
	2	4,76	73
	3	1,84	65
	4	1,93	45
150 ± 5	1	10,30	97
	2	1,87	55
	3	0,17	43

Можемо припустити, що білкові фракції з молекулярними масами 50 та 37 кДа, ймовірно, відповідають претромбіну 1 та 2 відповідно. Їхня присутність у кровотоці розглядається як ранній маркер активації внутрішньосудинного згортання крові, що узгоджується з описаними вище результатами зниження концентрації молекул протромбінового походження, як наслідок активізації процесів перетворення протромбіну у тромбін. Мезотромбін, проміжний продукт перетворення протромбіну з молекулярною масою близько 70 кДа, відіграє важливу роль у регуляції тромбоутворення. Він здатний індукувати вторинну необоротну агрегацію тромбоцитів, сприяючи їх залученню до зони тромбоутворення. Ця властивість набуває особливого клінічного значення, враховуючи стійкість мезотромбіну до дії основних фізіологічних інгібіторів тромбіну, що ускладнює контроль за коагуляційними процесами під час проведення антикоагулянтної терапії. Крім того, мезотромбін здатен активувати низку ключових факторів коагуляції - V, VIII, XIII - а також каталізувати перетворення фібриногену в нерозчинний фібрин, тим самим посилюючи формування та стабілізацію фібринового згустку. Враховуючи наявність у мезотромбіну як прокоагулянтних, так і антикоагулянтних властивостей, які визначаються ступенем насичення його молекули іонами натрію, особливої уваги заслуговує той факт, що характерна для тромботичних станів гіпернатріємія потенційно зумовлює домінування прокоагулянтної активності мезотромбіну.

Комплексна оцінка функціонального стану системи згортання крові є неповною без визначення концентрації D-димеру - розчинного продукту деградації зшитого фібрину, який утворюється внаслідок дії плазміну на зшитий фібрин, що, своєю чергою, утворився в результаті перетворення фібриногену у фібрин під впливом тромбіну на N-кінцеву ділянку Aα- та Bβ-ланцюгів у домені E. Фібринові мономери взаємодіють один з одним через домен D з утворенням фібринового полімеру, який додатково зшивається за участю активованого фактора XIII (FXIIIa) [176]. Основні місця дії FXIIIa включають γ-ланцюги сусідніх фібринових мономерів, які формують D-димерну структуру, а також

карбоксильні ділянки α-ланцюгів, що сприяють формуванню стабільної сітки згустку. У цьому контексті підвищений рівень D-димеру розглядається як маркер активації коагуляційного каскаду та фібринолізу, що має високу діагностичну цінність у клінічній практиці, зокрема у пацієнтів із COVID-19 та у постковідному періоді.

Підвищення його концентрації у плазмі крові є двояким індикатором. З одного боку, це є свідченням активації коагуляційної ланки та утворення фібринових згустків, з іншого – є показником активності фібринолізу та потенційно відображає обсяг деградованого фібрину. Активація фібринолізу починається з перетворення плазміногену на плазмін. Плазмін діє на зшитий фібриновий полімер, розщеплюючи його на розчинні фрагменти з різною молекулярною масою, серед яких є D-димери. Отже, за відсутності зшитого фібрину D-димери не утворюються. Таким чином, D-димер є показником як коагуляційної, так і фібринолітичної активності. В нормі в організмі постійно відбувається незначне фізіологічне утворення та розщеплення фібрину, тому у здорових осіб детектується незначний рівень D-димерів. Підвищений рівень D-димеру може зберігатися протягом кількох місяців після перенесеного COVID-19, навіть у пацієнтів з легким перебігом хвороби, що підкреслює необхідність проведення досліджень його вмісту для розуміння цілісної картини функціонування системи гемостазу у віддалені терміни після перенесеної ковідної інфекції.

За результатами визначення концентрації D-димеру виявлено, що для всіх груп донорів характерним є зростання цього показника порівняно з групою донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 (рис.3.11).

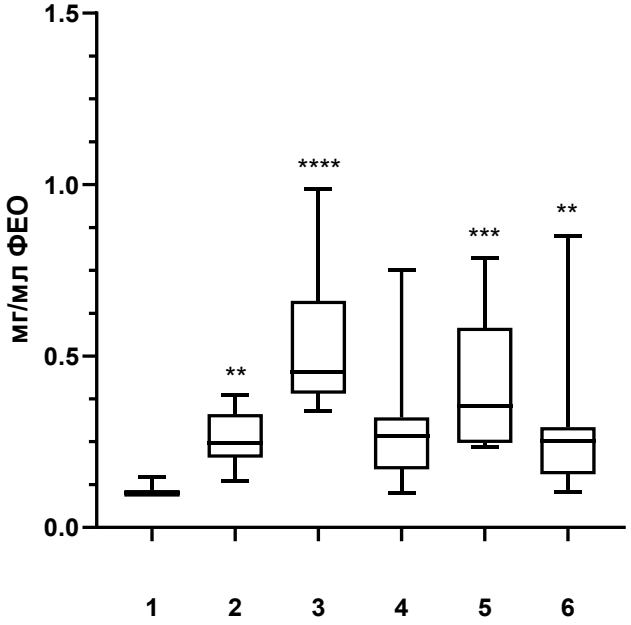


Рис. 3.11. Концентрація D-димеру у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Найвищу концентрацію D-димеру було зафіксовано у плазмі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) – 0,54 мг/мл ФЕО. Найнижча концентрація D-димеру була виявлена у плазмі крові донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 та 150 ± 5 Індекс (S/C) і складала, відповідно, 0,26 мг/мл ФЕО та 0,27 мг/мл ФЕО.

У цілому, отримані нами результати збігаються з результатами інших дослідників [177,178], які виявили підвищені рівні D-димеру у плазмі крові осіб у різні терміни після гострої стадії хвороби. Так, показано, що через 6 місяців після перенесеного захворювання підвищений рівень D-димеру зберігався у 32% пацієнтів досліджуваної групи, навіть при нормалізації інших показників

згортання та запалення; через 4 місяці рівень D-димеру залишався підвищеним у 25,3%, а через 11 місяців після інфекції - у 15%.

Проте, механізми підвищення рівня D-димеру у постковідний період залишаються до кінця не з'ясованими й, імовірно, відрізняються від патофізіологічних процесів, характерних для гострої фази COVID-19. На сьогодні значний обсяг наукових даних свідчить про те, що патогенез періоду реконвалесценції та постковідного синдрому тісно пов'язаний із персистуючою запальною відповіддю, яка підтримується навіть після елімінації вірусу та може зумовлювати тривале ушкодження органів і розвиток хронічного запалення. Цей стан підтверджується, зокрема, підвищеними концентраціями С-реактивного білка, які фіксувалися у ряді клінічних досліджень [179,180], а також хронічно підвищеним рівнем ключових прозапальних цитокінів - IL-1β, IL-6 та TNF-α [181]. Водночас, окремі дослідження показали, що концентрація С-реактивного білка повертається до базових значень вже через три місяці після перенесеного захворювання, тоді як рівень D-димеру залишається підвищеним, що вказує на можливу наявність незалежних механізмів підтримання коагуляційної активності, не обов'язково опосередкованих системним запаленням.

Дисрегуляція імунної системи може лежати в основі механізмів підвищеного рівня D-димеру як у гострій, так і в хронічній фазах захворювання. Повідомляється про стійку дисфункцію Т-клітин у пацієнтів із хронічним COVID-19. Також було встановлено, що пацієнти з тривалим COVID-19 мають вищі рівні аутоантитіл [182]. Як тривале запалення, так і імунна дисфункція можуть спричинити гіперкоагуляційний стан і, відповідно, підвищені рівні D-димеру.

Разом з тим, у цієї дослідної групи було виявлено РФМК у найменших кількостях відносно інших груп донорів, тому не дивним є зростання у кровотоці вмісту D-димерів, що є проявом активного фібринолізу, чого не було зафіксовано у більшості груп. З літератури відомо, що COVID-19 спричиняє гіпофібриноліз, коли підвищується вміст інгібіторів фібринолізу, насамперед PAI-1 та α2-антиплазміну, що призводить до збільшення стійкості згустку до лізису [183].

Крім того, нетипові згустки фібрину, утворені внаслідок безпосереднього впливу S-білку SARS-CoV-2 на фібриноген, можуть не розпізнаватися системою фібринолізу, що перешкоджає розщепленню до продуктів деградації.

Узагальнюючи наші результати можемо зробити висновок, що за умов підвищеної потенційної активності протромбіну, підвищеної концентрації фібриногену та зростання концентрації РФМК у плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG накопичення D-димеру є скоріше позитивним показником, який свідчить про належну функціональну активність системи фібринолізу.

Під час коагуляції можлива поява D-фрагментів у кровотоці пацієнтів. Вважається, що розчинні фібринові комплекси мають сайти зв'язування з D-фрагментом, що призводить до унеможливлення формування фібринових згустків і, відповідно, розщеплення до продуктів деградації не відбувається. Тому причиною високих концентрацій РФМК порівняно з доволі низьким вмістом D-димеру у кровотоці пацієнтів, що перехворіли COVID-19, є дисбаланс системи фібринолізу на фоні запальної реакції.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про активацію коагуляційної ланки системи гемостазу у групах донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у постковідний період, що проявляється зростанням концентрації фібриногену, накопиченням розчинних фібрин-мономерних комплексів, підвищенням потенційної активності протромбіну та опосередковано через підвищення рівня D-димеру. Сукупність цих змін вказує на протромботичну спрямованість реакцій, що потребує подальшого моніторингу та обґрунтування необхідності пролонгованої тромбопрофілактики. Такі зміни можуть бути наслідком порушення балансу між прокоагулянтними механізмами та механізмами дії антикоагулянтів, тому надалі було проаналізовано вміст та активність деяких факторів, що залучені у регуляцію активності тромбіну – антитромбіну III та тромбомодуліну.

Антитромбін III (АТ III) - це основний фізіологічний інгібітор тромбіну та факторів IXa, Xa, XIa та XIIa. Він відіграє ключову роль у підтриманні

гемостатичного балансу та запобіганні надмірному тромбоутворенню і одночасно підтримуючи нормальну реакцію на ушкодження судин. Властивості АТ III як природного інгібітору процесу згортання крові, так і незалежного протизапального фактору ставлять цей білок у ряд першочергових біохімічних факторів, які підлягають ретельним лабораторним дослідження під час розвитку сепсису та респіраторного дистрес-синдрому. Термін «транзиторний набутий дефіцит АТ III» доволі часто вживається для опису стану пацієнтів, які хворіють вірусними / бактеріальними захворюваннями, що супроводжуються тромбозами, і COVID-19 не є винятком. Це означає, що у пацієнтів спостерігається зниження рівня АТ III із одночасним прогресування захворювання COVID-19, що призводить до аномального тромбозу та тромбозапалення.

Особливу увагу в контексті порушень гемостазу у постковідний період привертає залежність коагуляційного статусу від активності АТ III. Встановлено, що нормалізація параметрів згортання крові у пацієнтів після перенесеного COVID-19 тісно корелює з відновленням активності АТ III до фізіологічних значень, характерних для здорового організму [184]. У зв'язку з цим у клінічній практиці широко застосовується профілактичне введення антикоагулянтів, у тому числі й нефракціонованого або низькомолекулярного гепарину, як у період активної інфекції, так і після одужання [185]. Проте результати низки клінічних досліджень свідчать, що, попри систематичне використання гепаринової терапії, частота тромбоемболічних ускладнень у пацієнтів із COVID-19 залишається високою [186]. За механізмом гепарин опосередковує свою дію через АТ III. Після зв'язування з гепарином здатність АТ III інгібувати тромбін і фактор Ха у рази збільшується. Є дані, що зменшення ефективності гепаринової терапії може бути спричинене або низькими концентраціями АТ III, або аномальними молекулами АТ III, які унікальні структурними властивостями, що блокують зв'язування з гепарином, або вплив імунних факторів (антитіла проти COVID-19, активація пулу аутоантитіл) на природні антикоагулянти [187].

Згідно отриманих нами результатів (рис.3.12), інгібіторний потенціал антитромбіну був знижений у всіх групах донорів (за виключенням донорів з

титром анти-SARS-CoV-2 IgG 150 ± 5 Індекс (S/C) у порівнянні з результатами у групі донорів з нульовим титром анти-SARS-CoV-2 IgG.

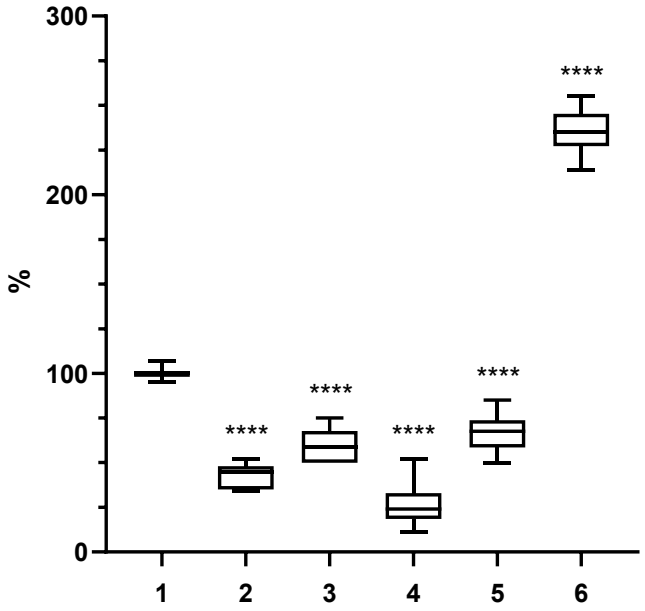


Рис. 3.12. Інгібіторний потенціал антитромбіну III у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Найнижчий показник було виявлено у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C), який був на 75 % нижчим ніж у донорів із нульовим титром антитіл. Разом з тим, у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 150 ± 5 Індекс (S/C) інгібіторний потенціал АТ III був у 2,47 рази вищим ніж у донорів з нульовим титром антитіл, що узгоджується з низьким вмістом молекул протромбінового походження та зниженою потенційною активністю протромбіну.

Зниження активності АТ III послаблює природну антикоагулянтну відповідь, збільшуючи ризик тромбоутворення, особливо у пацієнтів із факторами ризику такими як діабет чи ожиріння [188]. Також у осіб з дефіцитом АТ III спостерігається зниження ефективності гепаринів, що потребує корекції

антикоагулянтної терапії. Це особливо актуально для пацієнтів після кардіохірургічних втручань, де спостерігається висока частота гепаринової резистентності.

З огляду на важливу роль антитромбіну ІІІ далі було проаналізовано чи змінюється його вміст у залежності від титрів антитіл проти SARS-CoV-2. Для цього спочатку з плазми крові донорів було очищено фракцію гепарин-специфічних білків, до яких належить і АТ ІІІ.

На рис.3.13 наведено електрофоретичний профіль одержаних фракцій на прикладі зразків з плазми крові донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) та нульовим титром антитіл. Як бачимо, найбільша частка серед складу фракцій належить білкам з молекулярною масою близько 58 кДа, що відповідає АТ ІІІ.

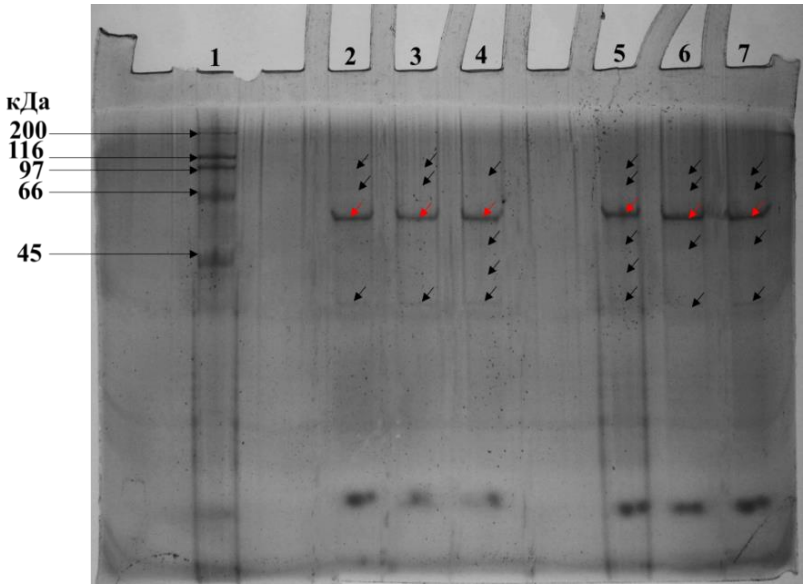


Рис. 3.13. Типова електрофореграма фракцій, одержаних на гепарин-сефарозі: 1 – маркери молекулярної маси; 2-4 – зразки фракцій донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C); 5-7 – зразки фракцій донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C)

Примітка: червоними стрілками позначено місце локалізації антитромбіну ІІІ

В отриманих фракціях було виміряно концентрацію загального білка та здійснено перерахунок на концентрацію АТ III (рис.3.14). Найвищу концентрацію АТ III було виявлено у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 175 ± 5 Індекс (S/C), а найнижчу – у донорів з титром антитіл 75 ± 5 Індекс (S/C), що повністю узгоджується з найнижчим інгібіторним потенціалом АТ III, виявленим саме у цій групі донорів. Зниження концентрації АТ III у постковідний період може бути зумовлено кількома факторами, з-поміж, яких надмірне споживання АТ III унаслідок тривалої активації коагуляційного каскаду.

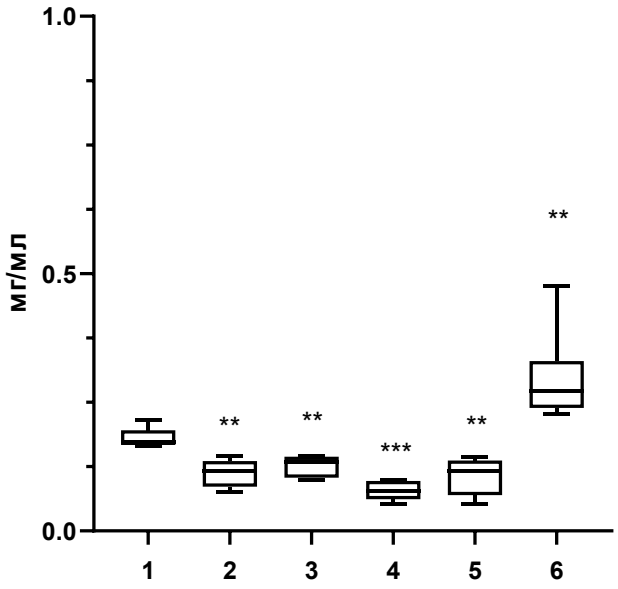


Рис. 3.14. Концентрація антитромбіну III у плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * p<0,05 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Таке припущення є найбільш ймовірним беручи до уваги результати щодо зниження вмісту молекул протромбінового походження. Ще однією причиною зниження концентрації АТ III може бути дисфункція печінки та, відповідно,

знижена синтетична функція. Аналіз літератури свідчить, що порушення у функціонуванні печінки є поширеним явищем у пацієнтів з COVID-19, а у частини з них печінкові порушення зберігаються і в постковідному періоді.

За даними [189] підвищені рівні печінкових ферментів, гіперферитинемія та зміни показників білірубіну фіксувались у значної частини пацієнтів як під час гострої фази COVID-19, так і впродовж декількох місяців після одужання. Основними механізмами, що призводять до порушень у функціонуванні печінки є безпосередній цитопатичний вплив вірусу SARS-CoV-2 на гепатоцити, системна гіпоксія, ендотеліальна дисфункція, цитокіновий шторм, а також вплив тривалого медикаментозного лікування [190].

Одним із ключових механізмів регуляції зсідання крові є система протеїну С яка є одним із ранніх та швидких механізмів регуляції гемостазу при загрозі тромбоутворення. Активований протеїн С інгібує перетворення протромбіну в тромбін, запобігаючи таким чином утворенню фібрину. ПС - це вітамін К-залежний глікопротеїн, який синтезується в печінці і функціонує як ключовий компонент природної антикоагулянтної системи. У поєднанні з кофактором - протеїном S - активована форма протеїну С інактивує фактори Va та VIIIa, гальмуючи у такий спосіб утворення тромбіну. Оскільки порушення у цій системі у контексті постковідного синдрому може сприяти тривалому гіперкоагуляційному стану, надалі було проаналізовано вміст та активність ПС у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Варто наголосити, що на сьогодні даних, які б стосувалися безпосередньо змін активності або рівня ПС у постковідний період немає.

Отримані нами результати (рис.3.15) свідчать про зниження концентрації ПС у плазмі крові всіх груп донорів за виключенням групи з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C), де було зафіксовано зростання концентрації ПС на 29 % у порівнянні з результатами у групі донорів з нульовим титром антитіл. Можемо припустити, що зниження концентрації ПС може бути наслідком активації коагуляції, а відтак і швидкого споживання цього фактору. Про важливість збереження належного рівня ПС свідчать результати, отримані у

дослідженнях Silva та співавт. (2024) і Riewald та співавт. (2008), які показали, що активований протеїн С відіграє захисну роль для ендотеліальних клітин, зменшуючи прозапальні та прокоагулянтні ефекти, спричинені впливом SARS-CoV-2 [191,192]. Це відкриває потенційні терапевтичні перспективи для зниження ризику судинних ускладнень у пацієнтів із COVID-19.

Нестача ПС є вагомим фактором ризику виникнення тромботичних ускладнень, що зумовлено його ключовою роллю в антикоагуляційній системі гемостазу. Як вже згадувалося, у нормі ПС, активований тромбіном у комплексі з тромбомодуліном, інактивує фактори Va та VIIIa, тим самим обмежуючи генерацію тромбіну та запобігаючи надмірному утворенню фібрину.

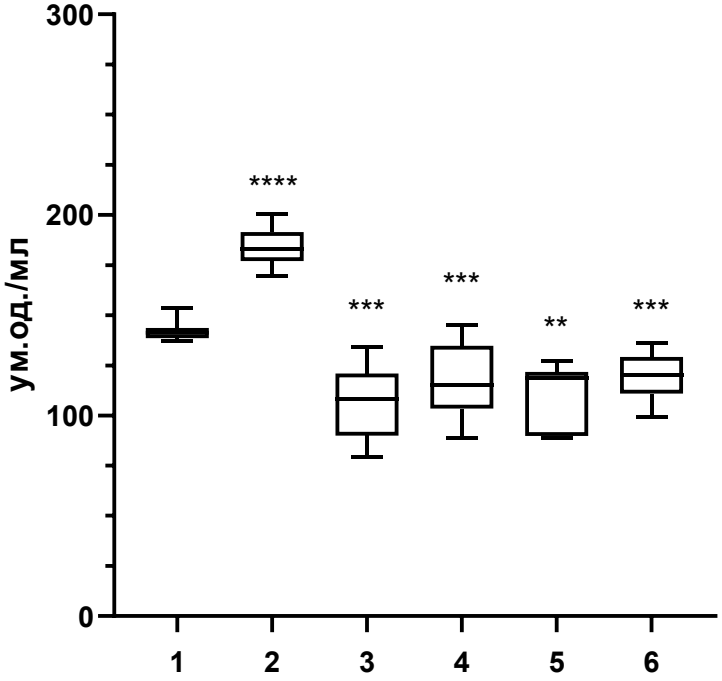


Рис. 3.15. Рівень протеїну С у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** $p \leq0,01$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

При його нестачі цей механізм гальмується, що веде до посиленої активації коагуляційного каскаду. Клінічно, дефіцит протеїну С маніфестує переважно тромбозами глибоких вен, легеневою емболією.

Таким чином, нестача протеїну С порушує баланс між про- і антикоагуляційними факторами системи гемостазу, сприяючи формуванню стану підвищеної схильності до тромбоутворення та підвищеним ризиком венозних тромбоемболій. За таких умов рання діагностика та цілеспрямоване лікування таких порушень є необхідними для попередження ускладнень, у тому числі й у постковідний період.

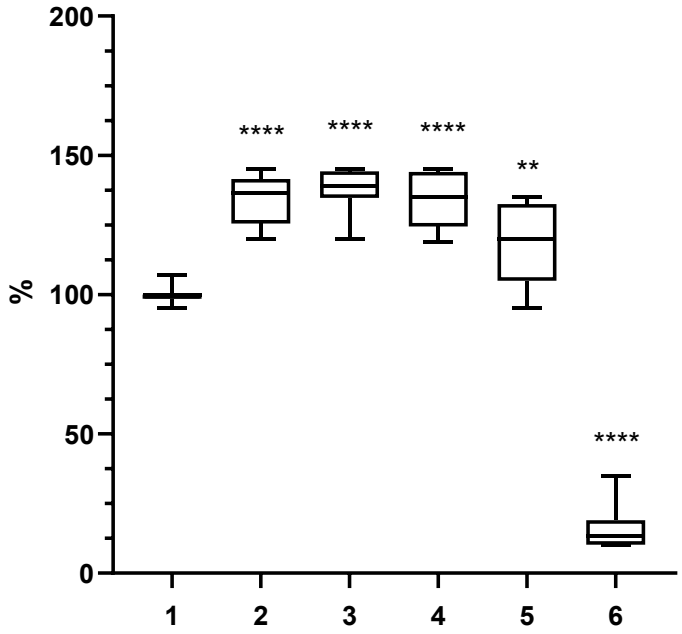


Рис. 3.16. Відносна активність протеїну С у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** $p \leq 0,01$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Для отримання цілісної картини було досліджено відносну активність ПС і виявлено зростання значень цього показника у плазмі крові донорів із різними титрами антитіл до SARS-CoV-2 (рис.3.16), які було приблизно на одному рівні

у групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C) та 75 ± 5 Індекс (S/C) і складали відповідно 134%, 137% і 134%. Разом з тим, у донорів з титром антитіл до SARS-CoV-2 150 ± 5 Індекс (S/C) цей показник був у 6,25 рази нижчим за значення у групі донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2.

Отже, порівнявши результати визначення концентрації ПС з його відносною активністю бачимо певну невідповідність – зниження концентрації цього фактору відбувається на тлі зростання відносної активності ПС, тобто залишкова активна фракція проявляє підвищену функціональну активність, що може відбуватися у відповідь на інтенсивну генерацію тромбіну і запальний стан характерний для постковідного періоду.

Можемо висунути декілька припущень для пояснення виявлених розбіжностей. По-перше, такі результати можуть свідчити про компенсаторну гіперактивацію протеїну С. За умов підвищеного рівня тромбіну та оксидативного стресу навіть незначна кількість протеїну С здатна активуватися інтенсивніше. Це може бути зумовлено посиленою експресією тромбомодуліну та рецептора протеїну С на ендотелії на окремих ділянках судинної стінки. Крім того, через зниження активності інших антикоагулянтів (протеїну S, антитромбіну) може спостерігатися підсилення локальної активації протеїну С як прояв компенсаторного механізму протидії розвитку тромбозів, незважаючи на зменшення його концентрації у крові.

Разом з тим, не виключені певні структурно-функціональні зміни молекули ПС – так, в умовах персистуючого запалення і оксидативного стресу можуть відбуватись певні модифікації молекули протеїну С, які потенційно здатні впливати на субстратну специфічність і стабільність ПС, а відтак і на функціональну активність.

Результати, що підтверджують таку ймовірність, були отримані у роботі [193], де автори на прикладі тромбіну показали що посттрансляційні модифікації молекули ферменту призводять до зростання його активності при використанні як субстратів синтетичних пептидів. Так, було продемонстровано, що окиснення

α-тромбіну у системі мієлопероксидаза–перекис водню–хлорид (MPOS) викликає структурні зміни білка - втрату триптофану і лізину, утворення дитирозинових зв'язків і карбонільних груп. Такі модифікації суттєво знижують взаємодію тромбіну з тромбомодуліном і протеїном С, змінюючи його субстратну специфічність. Водночас активність самого тромбіну за альтернативними шляхами зростає, що веде до порушень у функціонуванні системи гемостазу.

Певні модифікації чи зміни можуть відбуватися і на рівні активного центру ферментів, у тому числі і ПС. Так, у науковій літературі наявні дані, що свідчать про те, що інфекція SARS-CoV-2 може змінювати «ферментативне середовище» організму. Ці зміни реалізуються як шляхом модуляції активності вірусних протеаз, так і через вплив на специфічність протеаз клітини-господаря, що має ключове значення для перебігу інфекційного процесу та його наслідків. Зокрема, Patchett та співавт. (2021) виявили, що папаїн-подібна протеаза вірусу SARS-CoV-2 (PLpro) виявляє варіабельність у розпізнаванні убіквітинових субстратів завдяки структурній пластичності сенсорного сайту S1, що веде до селективного розщеплення білків хазяїна, залучених до противірусної відповіді [194]. Таке переналаштування субстратної специфічності сприяє ускладненню інтерферонової сигналізації та формуванню толерантного імунного мікросередовища. Певну увагу привертає також зміна активності протеаз хазяїна під впливом вірусу, зокрема серинової протеази TMPRSS2. У роботі [106] показано, що TMPRSS2 здатна розщеплювати spike-білок SARS-CoV-2 не лише в канонічному сайті S1/S2, а й у додаткових, нехарактерних ділянках, що забезпечує альтернативні механізми активації вірусу.

З іншого боку, не виключеним є наявність у кровотоці осіб у постковідний період «інгібіторів», що можуть впливати на прояв активності окремих факторів. Такими інгібіторами можуть слугувати аномальні форми білків, які часто утворюються при патологічних процесах асоційованих з оксидативним стресом, неконтрольованим протеолізом чи запальними процесами - станами, що характерні для патогенезу COVID-19. Так, при тяжкому перебігу COVID-19 були

виявлені суттєві порушення структури білкових молекул, що призводять до утворення аномальних форм білків. Passos та співавт. (2022) виявили, що у пацієнтів із тяжкими формами COVID-19 значно підвищуються рівні молекул, пов'язаних із окислювальним стресом - рецептора глікованих кінцевих продуктів (RAGE), білка високої рухливості HMGB1, гліального білка GFAP та циклооксигенази-2 (COX-2) [137]. Це свідчить про посилення процесів окиснення білків та їх схильність до патологічної агрегації. Крім того, згідно з результатами Satała та співавт. (2023), у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 рівень продуктів окисного ушкодження білків (AOPP) був значно підвищений у порівнянні з помірним перебігом хвороби [195]. Підвищення рівня AOPP асоціюється з дисфункцією ендотелію, коагуляційними порушеннями і збільшенням ризику тромбозів.

Не виключено, що аномальні форми білків разом з субпопуляціями аутоантитіл та пептидними пулами можуть бути частиною механізму розвитку тромботичних, фібротичних і імунних ускладнень у постковідний період.

Згідно отриманих результатів, лише у донорів з титром антитіл до SARS-CoV-2 150 ± 5 Індекс (S/C) зниження концентрації ПС супроводжувалося суттєвим зниженням його відносної активності, що може бути результатом синтезу нефункціональних молекул, зокрема, й через згадану вище нестачу вітаміну К. Зниження вмісту функціонально активного ПС є одним з маркерів внутрішньосудинного мікрозсідання крові, що розвивається при захворюваннях нирок, печінки, серця, запальних процесах, онкологічних захворюваннях, а враховуючи що наслідком перенесеної ковідної інфекції є порушення у роботі низки органів та систем не виключено, що ВЗК-синдром може зустрічатися і у постковідний період.

Для з’ясування причин, що лежать в основі підвищеної активності коагуляційної ланки системи гемостазу у постковідний період необхідно проаналізувати чи змінюється у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл концентрація ТМ, адже тромбомодулін - трансмембранний глікопротеїн, що експресується на поверхні ендотеліальних клітин, - є одним з ключових факторів,

який регулює баланс між коагуляцією та антикоагуляцією через активацію протеїну С. Порушення експресії та рівня циркулюючого ТМ є індикаторами ендотеліальної дисфункції та коагуляційного дисбалансу. Його головна функція полягає в модифікації активності тромбіну: зв'язування тромбіну з ТМ змінює його субстратну специфічність, перетворюючи його з про-коагулянтного ензиму на антикоагулянтний кофактор [196]. У присутності ТМ тромбін активує протеїн С, що, у комплексі з протеїном S, інактивує фактори Va і VIIIa каскаду згортання крові.

Як бачимо з результатів, наведених на рис.3.17, концентрація ТМ була зниженою у плазмі крові донорів з антитілами проти SARS-CoV-2, причому найнижчий рівень було виявлено у групі з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C).

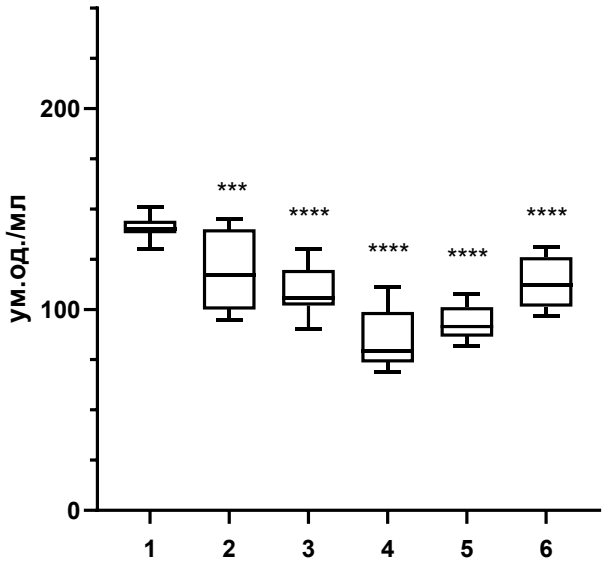


Рис. 3.17. Рівень тромбомодуліну у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

У постковідний період рівні ТМ демонструють певну варіабельність. Згідно з даними Koskinen та співавт. (2024) у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19, спостерігалось суттєве зниження експресії ТМ в тканинах нирок, що супроводжувалось розвитком мікротромбозів і гострою нирковою недостатністю [197]. З іншого боку, дослідження Yamazaki та співавт. (2023) показало, що сироваткові рівні розчинного ТМ були підвищеними у пацієнтів із тяжким COVID-19 і корелювали з летальністю [198]. Це може відображати вивільнення ТМ у кров у відповідь на ушкодження ендотеліальних клітин.

Зазначимо, що у плазмі крові здорових осіб у незначних концентраціях присутня розчинна форма ТМ, що відображає нормальний обмін ендотеліальних білків. Проте підвищені рівні ТМ у плазмі крові свідчать про розвиток стану ендотеліальної дисфункції - концентрація розчинного ТМ прямо корелює зі ступенем пошкодження ендотелію.

Разом з тим, у нашому дослідженні було виявлено зниження рівня ТМ у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 IgG, що опосередковано може вказувати на зниження рівня експресії ТМ на поверхні ендотеліоцитів.

Враховуючи роль ТМ можемо сказати, що зниження рівня його експресії має суттєві наслідки для функціонування системи гомеостазу. Оскільки тромбомодулін впливає на коагуляцію шляхом активації протеїну С і пригнічення тромбін-опосередкованої активації факторів згортання, порушення цієї функції у донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG ініціює цілий ряд патогенетичних змін і може бути одним з чинників формування сипмтомів, притаманних постковідному синдрому.

По-перше, зниження ТМ порушує баланс у антикоагуляційній системі, що веде до надлишкової генерації тромбіну. Це сприяє утворенню мікросудинних тромбів, особливо в органах із багатою капілярною сіткою, таких як легені, нирки та серце. Накопичення мікротромбів посилює ішемічне ураження тканин і може спричинити тривалу органну дисфункцію.

По-друге, дефіцит ТМ сприяє підвищенню прозапальної відповіді. У нормі ТМ пригнічує активацію NF-κB-сигналінгу та секрецію прозапальних цитокінів. Зокрема, лектино-подібний домен ТМ (TMD1) виявляє прямі протизапальні властивості, пригнічуючи сигнальні шляхи, пов'язані з Toll-подібними рецепторами та NF-κB. Дослідження Giri та співавт. показали, що TMD1 може зв'язуватися з лігандами, такими як ліпополісахарид (LPS), та нейтралізувати індуковану ними запальну відповідь [199]. Зниження концентрації ТМ у постковідний період асоціюється з підтримкою хронічного низькорівневого запалення, що поглиблює ураження ендотелію і створює замкнуте патологічне коло. По-третє, порушення тромбомодулін-залежної активації протеїну С призводить до недостатнього захисту ендотеліальних клітин від апоптозу та оксидативного стресу. Це, у свою чергу, ще більше посилює ендотеліальну нестабільність і знижує регенеративний потенціал судинної стінки.

Таким чином, результати аналізу основних показників системи згортання крові у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у постковідний період свідчать про комплексні зрушення в системі гемостазу, що мають характер гіперкоагуляційного стану. Виявлено підвищення рівня фібриногену та розчинних фібрин-мономерних комплексів, що відображає персистування хронічного прозапального процесу та надмірне утворення фібринових структур у кровотоці. Одночасно встановлено зростання потенційної активності молекул протромбінового походження за умов зниження вмісту протромбіну, що може свідчити про наявність у кровотоці протеолітично активних фрагментів протромбіну, які формуються внаслідок системного запалення та окислювального стресу.

Крім того, зниження активності антитромбіну III у поєднанні зі зменшенням рівня експресії тромбомодуліну на ендотеліоцитах посилює дисбаланс між про- та антикоагуляційними механізмами, що поглиблює гіперкоагуляційний стан. За таких умов підвищення рівня D-димеру ймовірніше відображає активацію коагуляційного каскаду, а не наслідки фібринолізу вже

сформованих згустків, що підтверджує наявність тривалої активації системи згортання крові у реконвалесцентів COVID-19.

Отже, сукупність цих змін свідчить про існування дисбалансу між процесами коагуляції і фібринолізу, що створює умови для формування схильності до тромботичного стану і може сприяти тривалому збереженню фібринових відкладень у мікроциркуляторному руслі, розвитку мікросудинних уражень та органної дисфункції. У зв'язку з цим обґрунтованою необхідність поглибленого вивчення стану системи фібринолізу у постковідний період.

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 3:

1. Rachkovska, A., Strubchevska, K., Kozyk, M., Goldstein, B., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Falalyeyeva, T., Kovalchuk, O., & Ostapchenko, L. (2024). Characteristic of molecules of prothrombin origin in donors who recovered from COVID-19 and had various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. Minerva Biotechnology and Biomolecular Research, 36, 13–20. https://doi.org/10.23736/S2724-542X.24.03051-7 **(Scopus, Q4)**

2. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Halenova, T., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Liubenko, D., Falalyeyeva, T., & Ostapchenko, L. (2023). Characteristics of products of fibrinogen origin in the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. Reviews on Recent Clinical Trials, 18(1), 69–75. https://doi.org/10.2174/1574887118666221219115856 **(Scopus, Q3)**

3. Strubchevska, K., Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Kozyk, M., Secor, B., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Falalyeyeva, T., Kaminsky, R., & Ostapchenko, L. (2023). Coagulation parameters in post-COVID-19 condition in relation to various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. International Journal of General Medicine, 16, 6127–6135. https://doi.org/10.2147/IJGM.S425496 **(Scopus, Q2)**

4. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В**. (2021). Показники згортання крові у вагітних жінок, хворих на COVID-19. Вісник

Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(86), 34–39. (здобувачем визначено час згортання крові у тестах АЧТЧ та ПЧ)

РОЗДІЛ 4
ОЦІНКА СТАНУ СИСТЕМИ ФІБРИНОЛІЗУ У ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ДО SARS-COV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД

Система фібринолізу є невід'ємною складовою гемостатичного механізму, основною функцією якої є розщеплення фібринових згустків та забезпечення прохідності судинного русла. Центральною молекулою у цій системі є плазмін – активна форма плазміногену, що здійснює деградацію фібрину. Активація плазміногену здійснюється за участю тканинного активатора плазміногену та урокінази, тоді як її інгібування контролюється інгібіторами активаторів плазміногену (ПАІ-1, ПАІ-2). Також одним із регуляторів активності плазміну виступає α2-антиплазмін. Формуючи стабільні комплекси з плазміном, він знижує його протеолітичну активність, тим самим обмежуючи фібриноліз і запобігаючи надмірній деградації тромбу. Ефективність функціонування системи забезпечується збалансованою взаємодією між усіма складовими, тому порушення у взаємодії між компонентами системи призводять до дисбалансу у фібринолітичній системі, що може сприяти як гіпофібринолітичним станам із підвищеним тромботичним ризиком, так і гіперфібринолізу з потенційними кровотечами.

В умовах інфекційно-запального процесу, зокрема у гостру стадію COVID-19, баланс між окремими ланками системи гемостазу порушується внаслідок дискоординованої гіперактивації фібринолізу, яка відбувається у відповідь на активацію коагуляції. Так, у перші дні гострого перебігу COVID-19, особливо у тяжких випадках, спостерігається підвищення вмісту тканинного активатора плазміногену (ТАП), що є наслідком ушкодження ендотелію, вивільнення ендотеліальних гранул та прозапального цитокінового впливу (насамперед IL-6, TNF-α). Внаслідок цього відбувається надмірна активація плазміногену до плазміну, що, своєю чергою, запускає деградацію фібрину і матриксних білків. Цей процес супроводжується значним підвищенням рівня D-димеру - одного з

ключових маркерів фібринолізу, який корелює з тяжкістю стану пацієнта та прогнозом [200].

Паралельно з активацією системи фібринолізу в організмі запускаються механізми її пригнічення, зокрема, значно підвищується рівні ПАІ-1 та α2-антиплазміну [201]. З часом у сироватці крові також виявляють підвищені рівні α1-антитрипсину та α2-макроглобуліну, що посилює неспецифічне гальмування протеолітичної активності. І з часом активність системи фібринолізу починає знижуватися, що на тлі порушень коагуляції може слугувати підгрунттям для розвитку тромботичних станів.

Тривалість активації системи фібринолізу визначається тяжкістю перебігу захворювання - як при легкій, так і при тяжкій формі COVID-19 спостерігається транзиторна гіперкоагуляція, яка з часом знижується. Проте у частини пацієнтів із тяжким перебігом стан гіпофібринолізу зберігається і надалі, сприяючи формуванню проявів постковідного синдрому. У цілому інформація щодо стану системи фібринолізу у віддалені терміни після перенесеного захворювання є досить суперечливою. Деякі дослідники [202] на основі аналізу показників ключових факторів системи фібринолізу роблять висновок про функціональну пригніченість фібринолітичної активності, що може бути вагомим патогенетичним чинником розвитку ускладнень, супутніх постковідному синдрому, таких як венозні тромбоемболії, мікросудинна тромбопатія, ішемічні інсульти, легенева гіпертензія, хронічна тромбоемболічна хвороба легень, а також тривалі кардіо-респіраторні та когнітивні порушення, зумовлені хронічним порушенням мікроциркуляції.

Описано стани фібринолітичної резистентності, коли навіть за високого вмісту плазміну ефективність розщеплення фібринових згустків знижується. Як вже згадувалося у попередньому розділі, це може бути наслідком утворення амілоїдних фібринових мікрозгустків, які через змінену стуктуру гірше піддаються розщепленню плазміном [203]. Мікротромби, що формуються за умов постковідного синдрому, у поєднанні з вираженою дисфункцією тромбоцитів та системним ураженням ендотелію, ймовірно, є причиною

розвитку генералізованої клітинної гіпоксії. Закупорка капілярного русла перешкоджає вільному проходженню еритроцитів, що зумовлює порушення газообміну - зниження надходження кисню та виведення вуглекислого газу [204]. Такий механізм може пояснити переважну більшість різноманітних, але стійких клінічних проявів, характерних для тривалого перебігу COVID-19.

У дослідженні Du та співавт. (2025) встановлено, що тривала активація запалення в умовах COVID-19 спричиняє персистуючі зміни у базальних клітинах епітелію дихальних шляхів, які зберігають прозапальний фенотип навіть після закінчення гострої фази вірусної інфекції [205]. Ці клітини продукують цитокіни та молекули, що впливають на мікрооточення, зокрема сприяють зниженню експресії генів, пов'язаних з фібринолітичним каскадом, або активації інгібіторів плазміногену. Таким чином, запалення і порушення клітинної архітектоніки можуть опосередковано гальмувати фібриноліз, підтримуючи прокоагулянтний стан і мікросудинну патологію. Тривалі порушення у функціонуванні фібринолітичної системи, описані у пацієнтів із постковідним синдромом, можуть бути серед причин високих ризиків мікросудинної ішемії, затримки репарації тканин та підвищеної ймовірності тромботичних подій.

Разом з тим, за даними інших авторів підвищена концентрація фактора коагуляції XIII, накопичення α- і β-ланцюгів фібриногену та зростання концентрацій плазміногену, виявлені у плазмі осіб у постковідний період, є свідченням активації системи фібринолізу [206].

Таким чином, дослідження причин порушень у системі фібринолізу після перенесеного COVID-19 та виявлення показників, що відрізняються від таких у умовно здорових осіб, є надзвичайно актуальним як у контексті розуміння патогенезу ускладнень, так і з точки зору пошуку нових діагностичних підходів та виявлення потенційних мішеней для протитромботичної або імунокоригуючої терапії.

З метою комплексної оцінки стану фібринолітичної системи наступним етапом дослідження було проведено визначення вмісту та активності

плазміногену - попередника ключового ефекторного ферменту фібринолізу, плазміну, у плазмі крові донорів із різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Плазмін, крім основної функції - протеолітичного розщеплення фібрину в складі згустку, - бере участь у низці важливих фізіологічних процесів, зокрема у міграції клітин, ангіогенезі, тканинному ремоделюванні, диференціації клітин. Таким чином, плазмін слід розглядати не лише як компонент фібринолітичної системи, а як багатофункціональний білок, що залучений до широкого спектра фізіологічних процесів. Водночас його активація в умовах патології, зокрема при хронічному запаленні, інфекціях або пухлинному процесі, може сприяти розвитку низки небажаних явищ - надмірній деградації матриксу, активації латентних форм факторів росту, а також підтримці тканинного ушкодження. Порушення активності плазміну відіграє ключову роль у патогенезі низки захворювань, зокрема тромбозів, кровотеч, запалення, онкологічних захворювань та фіброзу. Надлишкова активність плазміну може спричинити посилену деградацію фібрину та білків матриксу, що веде до геморагічних ускладнень. Разом з тим, низька активність плазміну, як наслідок дефіциту плазміногену, надмірної експресії ПАІ-1 або інших інгібіторів фібринолізу, асоціюється з тромботичними ускладненнями, тривалим збереженням фібринових згустків, розвитком мікросудинної оклюзії та фіброзом тканин. Подібні зміни зафіксовано, зокрема, у пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19, а також у постковідний період. Тому важливим є з’ясування ролі плазміну в контексті постковідного періоду, де він може бути залученим до механізмів тривалого запалення, мікротромбозу та імунної дисрегуляції.

Ватро підкреслити, що плазміноген відіграє виняткову важливу роль на початкових стадіях COVID-19 - він розглядається як потенційний ко-фактор проникнення вірусу в клітини-мішені. Плазмін здатен розщеплювати білкові структури, зокрема S-білок SARS-CoV-2, активуючи його та полегшуючи зв’язування з клітинними рецепторами - передусім ACE2. Такий механізм сприяє ефективнішому злиттю вірусної оболонки з плазматичною мембраною клітини, пришвидшуючи вірусну інвазію.

Отже, нами було проаналізовано вміст плазміногену в плазмі крові донорів із різними титрами антитіл. Отримані результати свідчать про існування різноспрямованих змін рівня плазміногену, який залежить від титру антитіл проти SARS-CoV-2. Зокрема, у групах донорів із титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) та 55 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено статистично значуще зниження концентрації плазміногену порівняно з групою донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 (рис.4.1).

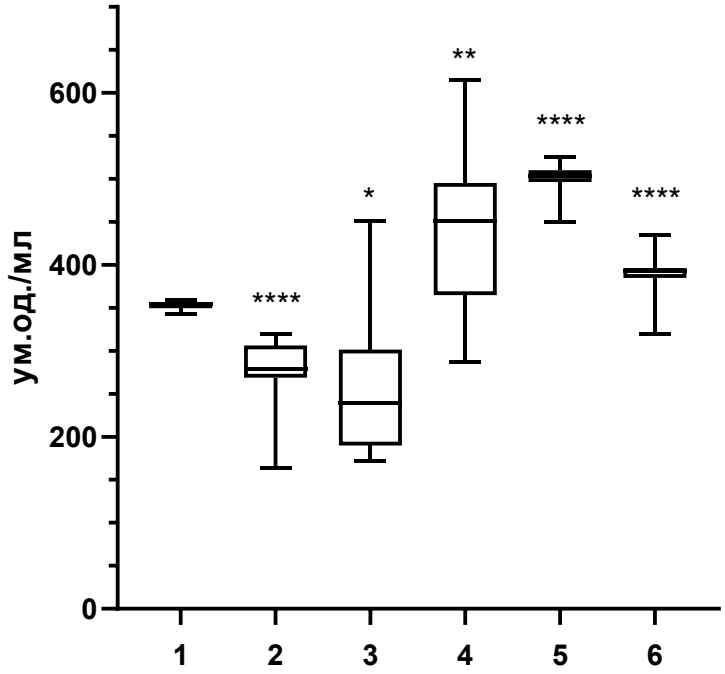


Рис. 4.1. Рівень плазміногену у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** $p \leq 0,01$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Зробити однозначний висновок про причини зниження рівня плазміногену досить складно, оскільки це може бути наслідком як функціонального споживання білка в умовах активації компенсаторного фібринолізу та запалення,

так і результатом його вилучення з циркуляції у складі імунних комплексів або мікротромбів. Альтернативно, не можна виключити також вплив системних змін, зокрема порушення синтетичної функції печінки - основного органа біосинтезу плазміногену. Зниження вмісту цього білка, незалежно від етіології, може суттєво впливати на ефективність фібринолізу, сприяючи порушенню гемостатичного балансу у постковідний період.

У групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) концентрація плазміногену, навпаки, перевищувала показник у групі днорів з нульовим титром. Найвища концентрація плазміногену спостерігалась у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), де цей показник був у 1,4 рази вищим ніж у донорів з нульовим титром антитіл.

Оскільки зміни концентрації окремих факторів не завжди корелюють із відповідними змінами їх функціональної активності, наступним етапом дослідження стало визначення потенційної активності плазміногену в плазмі крові донорів із різними титрами антитіл до SARS-CoV-2 (рис.4.2). Такий підхід дозволяє комплексно оцінити не лише кількісний, а й функціональний стан ключового білка фібринолітичної системи, що є критично важливим для виявлення прихованих дисфункцій у постковідний період.

Отримані результати свідчать про зростання потенційної активності плазміногену у плазмі крові всіх досліджуваних групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, причому виявлені зміни не корелювали зі змінами вмісту. Так, у групі донорів (титр 75 ± 5 Індекс (S/C), де було виявлено один з найвищих показників вмісту плазміногену, потенційна активність плазміногену була найнижчою, а у групі донорів з одним із найнижчих значень вмісту плазміногену (титр 10 ± 3 Індекс (S/C) потенційна активність була у 1,78 рази вищою за значення у групі донорів з нульовим титром антитіл.

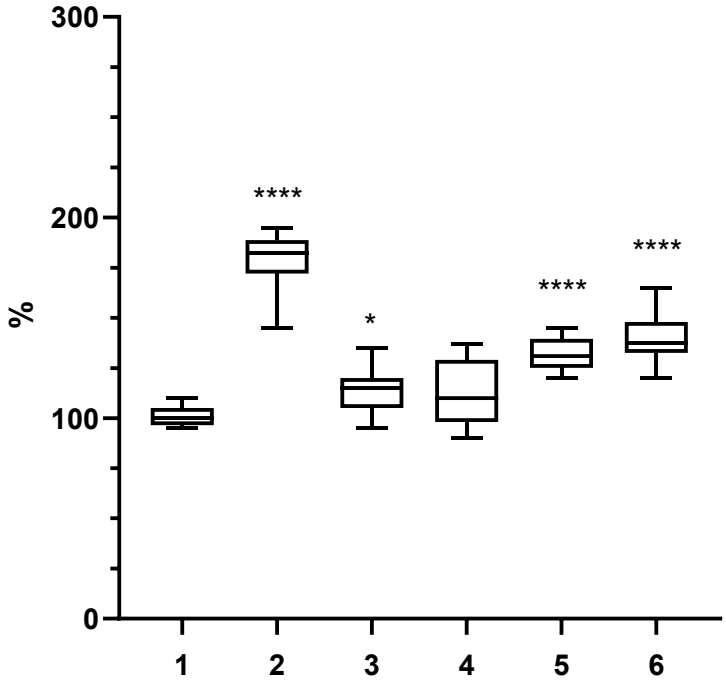


Рис. 4.2. Потенційна активність плазміногену у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Виявлена невідповідність між рівнем плазміногену та його активністю може мати декілька пояснень. Серед ймовірних причин можна розглядати посттрансляційну або структурна модифікація молекули плазміногену, яка порушує його здатність до ефективної активації під дією активаторів. Крім того, зниження функціональної активності за збереженої концентрації може бути наслідком утворення стабільних білкових комплексів, у складі яких плазміноген втрачає можливість вільної взаємодії з субстратами або активаторами, що перешкоджає реалізації його функціональної активності.

Автори роботи [207] на основі результатів протеомного аналіуз зразків плазми крові пацієнтів із COVID-19 висловили припущення про існування характерної для цього захворювання картини посттрансляційних модифікацій

білків. Це, зокрема, зростання рівня фосфорилювання треоніну, зміни у профілі глікозилювання, а також зниження ступеню аргінінування.

Відповідно до висловленого вище припущення щодо утворення комлексів з іншими білками, незначна потенційна активність плазміногену на тлі його підвищеного вмісту може бути обумовлена присутністю в кровотоці осіб, що перенесли COVID-19, антитіл до плазміногену. Дані літератури свідчать, що аутоантитіла до плазміногену можуть знижувати ефективність його активації до плазміну, тим самим зменшуючи загальну фібринолітичну активність плазми. Так, у дослідженні Bu та співавт. (2007) показано, що у пацієнток з рецидивуючими втратами вагітності, особливо на тлі антифосфоліпідного синдрому, значно підвищений рівень антитіл до плазміногену та ТПА [208]. Це супроводжувалося значним пригніченням лізису фібрину, що вказує на імунозалежну гіпофібринолітичну відповідь. Імунологічно очищені фракції IgG з сироватки таких пацієнтів в експериментах *in vitro* істотно знижували здатність ТАП ініціювати перетворення плазміногену на плазмін, а отже, гальмували фібриноліз. Цей ефект був дозозалежним і підтверджений і на культурі ендотеліальних клітин. Антитіла зв'язувалися з каталітичними доменами ТАП або епітопами плазміногену, що перешкоджало формуванню активного плазміну. Наявність таких антитіл не лише знижує активність плазміну, а й потенційно сприяє тривалій циркуляції у мікроциркуляторному руслі фібринових згустків у, що створює умови для тромбоутворення.

Оскільки для визначення потенційної активності плазміногену використовували його екзогенний активатор стрептокіназу, отримані результати свідчать про присутність у кровотоці донорів пулу молекул плазміногену чи/або його деградованих форм, які за певних умов можуть перетворитися в активні ферменти. З одного боку, такі результати можна трактувати як позитивний показник, адже це свідчить про потенціал системи фібринолізу. Разом з тим, це може спричинити виникнення певних ускладнень і прогресування патологічних станів, пов'язаних зі надмірною активністю плазміну. Адже плазмін розщеплює не лише фібринові згустки, а й може діяти на інші білки плазми крові, зокрема,

фактори системи гемостазу чи білки комплементу або на білки позаклітинного матриксу - фібронектин, ламінін, колагени та протеїноглікопротеїни. Як наслідок, це може призвести до посилення запальних реакцій; деструкції базальних мембран і порушення структурної цілісності судин, альвеол, слизових оболонок; а також вплинути на міжклітинну сигналізацію, що може мати вагоме значення в умовах хронічного ушкодження тканин.

У літературі є дані щодо альтернативних механізмів активації плазміногену, зокрема за участі фрагментів фібриногену, які можуть опосередковувати неферментативну активацію або потенціювати дію природних активаторів. Серед таких фрагментів вирізняють Е-фрагмент - центральну частину молекули фібриногену або фібрину, що утворюється внаслідок його розщеплення під дією плазміну. В роботах співробітників Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна описано неферментативний шлях активації плазміногену саме за участі Е-фрагменту фібриногену [209]. Дослідження *in vitro* продемонстрували, що фібриновий Е-фрагмент здатний взаємодіяти з молекулами плазміногену, індукуючи конформаційні зміни, які суттєво підвищують його чутливість до активації тканинним активатором плазміногену, навіть за умов низької концентрації останнього. Цей ефект, хоча й не є результатом прямої каталітичної дії з боку Е-фрагмента, опосередковано сприяє підвищенню ефективності активації, модулюючи просторову структуру плазміногену та полегшуючи його перехід у активну форму - плазмін [210]. Такий механізм набуває особливого значення в умовах патологій, пов’язаних із надмірною активацією системи згортання, при формуванні резистентних до лізису амілоїдніх мікрозгустків, що виявляються у пацієнтів із постковідним синдромом [211]. Наявність Е-фрагмента у кровотоці у таких випадках може підтримувати компенсаторну активацію плазміногену, коли класичні ферментативні шляхи порушені або недостатньо ефективні і може розглядатися як прояв компенсаторної реакції організму на зниження активності фібринолітичної системи. Через взаємодію Е-фрагмента із клітинними рецепторами та елементами позаклітинного матриксу може відбуватися

модуляція мікросудинної проникності, активації ендотелію та інших ланок системної відповіді на ушкодження [212].

У нормальних фізіологічних умовах ферменти функціонують за суворо визначеної просторової конфігурації, необхідної для утворення активного центру та здійснення каталізу. Проте під час запальних та/чи інфекційних захворювань, у тому числі й COVID-19, відбувається активація протеолітичних систем, що може призвести до утворення фрагментів, які не завжди є інертними. Навпаки, у низці випадків, деградовані форми ферментів можуть зберігати або виявляти змінену активність. Зокрема, плазміноген, піддається протеолітичній модифікації, утворюючи фрагменти, які зберігають каталітичну активність, але можуть втрачати регуляторні домени та кринглові структури, які є необхідними для прояву функціональної активності плазміну. Кринглові домени регулюють конформаційний стан плазміногену та забезпечують взаємодію з фібрином, α_2-антиплазміном та іншими білками плазми, а також з мембранними білками клітин ендотелію, тромбоцитів. Деградовані форми плазміногену можуть погано піддаватися інгібуванню фізіологічними інгібіторами. Достеменно невідомо, чи буде взаємодіяти з ними α2-антиплазмін і з якою швидкістю вони будуть нейтралізуватись інгібітором.

Отже, можемо припустити, що потенційна активність плазміногену може бути обумовлена не лише молекулами плазміногену, а й його деградованими формами чи комплексами до складу яких входять деградовані форми чи цілісні молекули плазміногену. Дослідження, проведені в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна, показали, що частково деградована форма плазміногену - Ліз-плазміноген - зберігає здатність до гідролізу субстратів, хоча й зі зниженою ефективністю. Ця форма плазміногену може селективно пригнічувати агрегацію тромбоцитів, індуковану АДФ, тромбіном і колагеном, та впливати на реорганізацію актинового цитоскелету тромбоцитів, що свідчить про її потенційну роль у регуляції гемостазу та ангіогенезу.

Враховуючи вище викладене, зразки плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 було проаналізовано методо ензим-

електрофорезу, який дозволяє ідентифікувати активні протеолітичні ферменти і одночасно визначити їх молекулярну масу [213]. Для підвищення інформативності результати ензим-електрофоретичного аналізу були кількісно обраховані і узагальнені дані наведено у таблиці 4.1. Відповідно до отриманих результатів, інкубація зразків із стрептокіназою супроводжувалася появою білкових фракцій, що були відсутні у контрольних зразках (без обробки), що вказує на активацію плазміногену. Важливо зазначити, що для більшості груп донорів молекулярна маса активних ферментів була понад 100 кДа, що може опосередковано вказувати про включення молекул плазміногенового походження (деградовані форми) з потенційною активністю до складу ковалентних комплексів. Також було виявлено низку білків з молекулярною масою нижче молекулярної маси плазміногену, що і слугує фактом підтвердження присутності у кровотоці донорів деградованих форми плазміногену.

Таблиця 4.1

Протеолітичний профіль плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 за інкубації зразків плазми крові зі стрептокіназою

Групи донорів, Індекс (S/C)	К-ть зон гідролізу	Інкубація			
		зі стрептокіназою		без стрептокінази	
		Молекулярна маса, кДа	Відносний рівень, %	Молекулярна маса, кДа	Відносний рівень, %
0	1	154	16,00	105	16,76
	2	134	2,42	90	19,94
	3	127	4,20	74	28,29
	4	119	3,99	56	11,26
	5	106	6,89	51	23,75
	6	86	14,88	105	16,76
	7	54	34,14	-	-
	8	46	9,99	-	-
	9	42	7,50	-	-
10 ± 3	1	126	17,84	94	25,52
	2	113	9,67	82	50,19

Продовження табл. 4.1

	3	103	10,25	57	24,28
	4	81	18,91	-	-
	5	56	12,30	-	-
	6	52	12,81	-	-
	7	37	18,23	-	-
55 ± 5	1	125	22,36	92	22,25
	2	103	17,45	79	59,52
	3	81	26,16	57	18,23
	4	56	18,13	-	-
	5	51	15,90	-	-
75 ± 5	1	159	13,88	101	22,40
	2	152	4,20	80	60,25
	3	147	11,25	53	17,35
	4	140	7,72	-	-
	5	128	3,70	-	-
	6	124	2,81	-	-
	7	116	8,45	-	-
	8	105	7,08	-	-
	9	90	11,51	-	-
	10	64	10,21	-	-
	11	57	10,47	-	-
	12	49	4,29	-	-
	13	44	4,44	-	-
125 ± 5	1	174	36,96	98	17,87
	2	118	10,90	82	35,28
	3	83	21,49	54	14,19
	4	54	30,65	49	32,65
150 ± 5	1	171	35,89	111	10,51
	2	115	7,39	100	9,84
	3	100	5,43	83	25,88
	4	79	12,51	59	34,64
	5	52	28,53	50	19,13
	6	45	4,66	-	-
	7	41	5,59	-	-

Активація плазміногену за фізіологічних та патологічних умов здійснюється за участі двох активаторів – тканинного активатору та урокінази, які виявлені практично у всіх ссавців. На відміну від плазміну, якому притаманна широка субстратна специфічність, ТАП специфічно гідролізує пептидний зв'язок плазміногену Арг561-Вал562 обумовлюючи його активацію. Механізм активації передбачає, що специфічне зв'язування плазміногену і тканинного активатора з фібрином приводить до збільшення їх локальної концентрації, зміни конформації і просторової орієнтації відносно одне одного. У такому комплексі ТАП і плазмін захищені від інактивуючої дії, відповідно, ПАІ-1 та α2-антиплазміну.

Оскільки ТАП забезпечує до 90-95 % фібринолітичного потенціалу крові, оцінка його вмісту та активності може надати додаткову інформацію щодо змін у системі гемостазу у постковідний період. Слід зазначити, що даних щодо вмісту чи активності ТАП у осіб, що перехворіли на COVID-19, у сучасній літературі не представлено. Є низка досліджень, які доводять значну роль ТАП у розвитку тромботичних ускладнень у гостру стадію захворювання. Зокрема, встановлено, що рівні ТАП в плазмі крові зростають у міру погіршення перебігу захворювання, особливо у пацієнтів із тромботичними подіями. Автори роботи [214] роблять висновок про зв'язок між ТАП та розвитком тяжкої респіраторної недостатності через ендотеліальну дисфункцію і легеневий тромбоз.

З даних, наведених на рис.4.3, бачимо, що зростання вмісту ТАП (у 1,52 рази) спостерігалося лише у групі донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 75±5, для решти було виявлено суттєве зниження цього показника.

Основною причиною зниження рівня ТАП може бути його інактивація та виведення з кров'яного русла шляхом формування неактивного комплексу з інгібіторами серинових протеїназ, зокрема, з ПАІ-1 чи α2-антиплазміном. Слід відмітити, що комплекс ТАП-ПАІ-1 не відразу виводиться, а циркулює в кровотоці певний час, а отже потенційно може зв'язуватися з фібрином перешкоджаючи у такий спосіб взаємодії функціонально активного ТАП з сайтами зв'язування на фібрині.

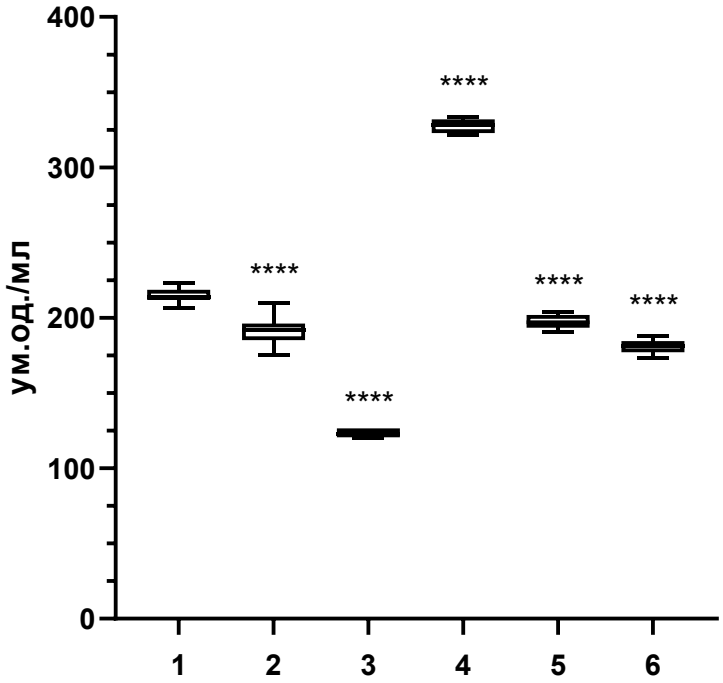


Рис. 4.3. Рівень ТАП у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Окрім ключової ролі у запуску фібринолізу через активацію плазміногену, ТАП також сприяє дезагрегантному ефекту оксиду азоту та простацикліну (PGI_2) [215]. Відповідно, зниження концентрації ТАП у плазмі є одним із факторів, що сприяють зростанню загального агрегаційного потенціалу тромбоцитів. Оскільки достатня кількість ТАП є необхідною умовою для активації плазміногену, зниження його вмісту слугує одним з предикторів тромбозів.

Як вже було з’ясовано на прикладі плазміногену, протеїну С та протромбіну, зміни вмісту не завжди корелюють з відповідними змінами їх активності, тому надалі було визначено потенційну активність тканинного активатору плазміногену в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Згідно отриманих результатів (рис.4.4), незважаючи на зниження вмісту ТАП його активність суттєво зростала, причому прослідковувалась чітка залежність

від титру антитіл проти SARS-CoV-2. Так, найнижча активність була виявлена у донорів з титром антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C), а найвища у групі з титром 150 ± 5 Індекс (S/C) – відповідно, 2,73 МО/мл та 5,80 МО/мл проти 2,01 МО/мл у групі донорів з нульовим титром анти-SARS-CoV-2 IgG.

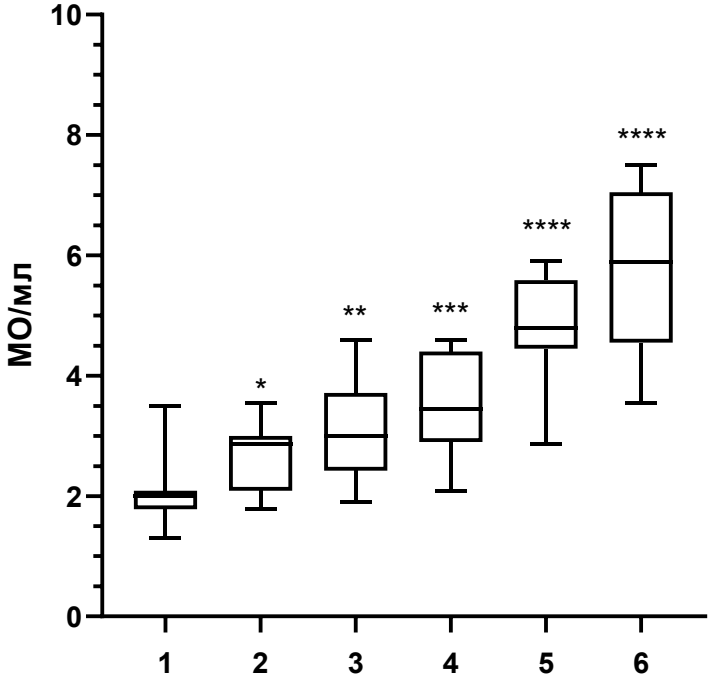


Рис. 4.4. Активність ТАП у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * p<0,05 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Оскільки активність ТАП зростає не внаслідок його протеолітичного розщеплення, а через взаємодію з білковими ефекторами, можемо припустити, що виявлене нами суттєве зростання активності ТАП може бути наслідком його взаємодії з певними аномальними білками, що присутні в кровотоці донорів після перенесеної ковідної інфекції. Це, зокрема, можуть бути антитіла, які утворюючи

комплекси з ТАП викликають певні конформаційні перебудови та, відповідно, зміни його активності. Слід наголосити, що у публікаціях за останні роки, немає даних, щодо аутоантитіл до ТАП, проте враховуючи нетиповий патогенез COVID-19 та дані про наявність аутоантитіл у осіб, що перенесли COVID-19, така можливість не виключена.

Основним інгібітором ТАП в плазмі крові слугує інгібітор активатора плазміногену-1 (ПАІ-1), який належить до родини серпінів. Концентрація ПАІ-1 в плазмі крові за фізіологічних умов складає 1 нМ, що на порядок перевищує концентрацію ТАП, більша частина якого знаходиться в комплексі з ПАІ-1. Так як ПАІ-1 є одним з ключових регуляторів фібринолізу, його підвищені рівні у пацієнтів з COVID-19 можуть призводити до гальмування розщеплення фібринових згустків, тим самим сприяючи розвитку гіперкоагуляційного стану [216,217].

Враховуючи важливу роль ПАІ-1 у регуляції фібринолізу, наступним етапом нашого дослідження було визначення його концентрації у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Згідно з отриманими даними (рис.4.5), у постковідному періоді спостерігається статистично значуще підвищення рівня ПАІ-1, що свідчить про зниження фібринолітичної активності та формування умов для підтримання протромботичного стану.

Оскільки для постковідного періоду характерним є збереження запального процесу та підвищені рівні прозапальних цитокінів, можемо припустити, що має місце залучення того самого механізму зростання концентрації ПАІ-1, що й під час гострої стадії захворювання – у відповідь на запальний процес відбувається посилення експресії ПАІ-1, надлишок ПАІ-1 зв’язуючись толл-подібним рецептором 4 (TLR4) на моноцитах ініціює секрецію прозапальних цитокінів, зокрема IL-6. У подальшому IL-6 активує сигнальний шлях за участі трансдуктора сигналів і активатора транскрипції 3, що, у свою чергу, стимулює продукцію TGF-β і сприяє формуванню своєрідного замкненого кола, за якого підтримується підвищена продукцію ПАІ-1 [218,219].

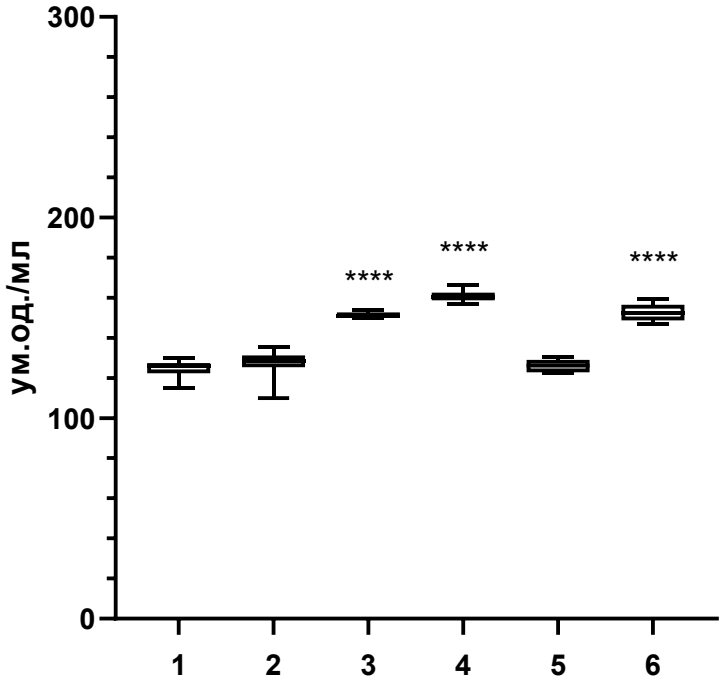


Рис. 4.5. Рівень ПАІ-1 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Не виключено, що однією з причин підвищеного вмісту ПАІ-1 може бути зниження вмісту протеїну С, описане нами у попередньому розділі роботи. Протеїн С, формуючи стабільний комплекс з ПАІ-1, унеможливлює його взаємодію з ТАП. В подальшому такий комплекс виводиться з кровотоку. Отже, за умов зниженого вмісту протеїну С втрачається один з механізмів регуляції вмісту ПАІ-1.

Один з механізмів регуляції активності плазміногену передбачає його пряме інгібування за участі низки факторів. Ключовим регулятором активності плазміну є α_2-антиплазмін - його фізіологічний, високоспецифічний та швидкодіючий інгібітор. α_2-АП належить до родини серпінів і зберігає всі типові для цієї групи структурно-функціональні характеристики. Крім того, α_2-АП містить унікальні амінокислотні послідовності на N- та С-кінцях молекули, які

забезпечують його здатність взаємодіяти як із фібрином, так і з плазміном, істотно впливаючи на ефективність гальмування фібринолізу. Основна фізіологічна роль α_2-АП полягає у зв'язуванні вільного плазміну в кровотоці та захисті білків плазми від неспецифічного протеолізу. Інгібування відбувається шляхом утворення ковалентного комплексу з плазміном у співвідношенні 1:1, що блокує його протеолітичну активність. Цей процес реалізується у вигляді двостадійної реакції: спочатку відбувається швидке, оборотне утворення нестійкого комплексу (реакція першого порядку), за яким слідує повільніша необоротна стадія з утворенням стабільного інгібуючого комплексу (реакція другого порядку).

Враховуючи вагому роль α_2-АП у регуляції активності системи фібринолізу на наступному етапі було проаналізовано відносний інгібіторний потенціал цього білка. Відповідно до отриманих результатів (рис.4.6), у всіх групах донорів, незалежно від титру антитіл проти SARS-CoV-2, інгібіторний потенціал α_2-антиплазміну був вищим ніж у групі донорів з нульовим титром антитіл.

Лише для донорів з титром антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C) цей показник був у 1,26 рази нижчим. Порівняння значень інгібіторного потенціалу α_2-АП та вмісту плазміногену дозволяє говорити про певну кореляцію цих двох показників – так, для донорів з підвищеним вмістом плазміногену було виявлено вищий інгібіторний потенціал антиплазміну, а для групи із зниженим вмістом плазміногену, інгібіторний потенціал α_2-АП також був знижений.

У роботах Гриненко та співавт. показано, що α_2-АП є вагомим регулятором фібринолітичного процесу - він контролює швидкість гідролізу полімерного фібрину на стадії активації плазміногену тканинним активатором. Відтак, одночасне підвищення концентрацій плазміногену та α_2-АП можна розглядати як компенсаторну реакцію організму, спрямовану на підтримання балансу між коагуляцією та активністю фібринолітичної системи задля запобігання надмірного фібринолізу, який міг би спричинити геморагічні ускладнення.

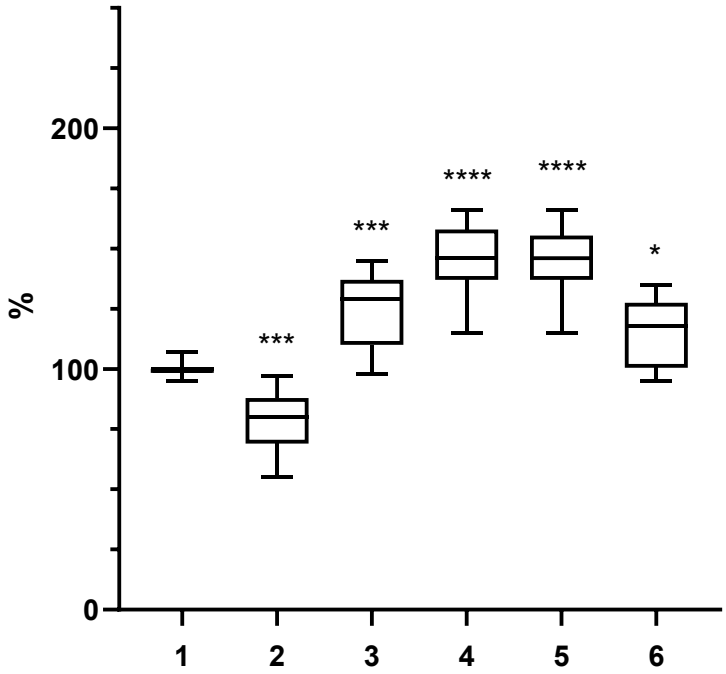


Рис. 4.6. Відносний інгібіторний потенціал α2-антиплазміну у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Проте не виключено, що така ситуація може розвиватися як наслідок патологічного процесу. Так, відомо, що постковідний період характеризується персистуючим запальним процесом і, відповідно, підвищеними рівнями прозапальних цитокінів, наприклад, IL-6, який через активацію сигнального шляху JAK/STAT3 у гепатоцитах індукує транскрипцію генів, відповідальних за синтез білків гострої фази, включаючи плазміноген та α_2-АП [220]. Це, у свою чергу, сприяє посиленню фібринолітичної активності, що є важливим для розчинення фібринових згустків у процесі відновлення після станів, асоційованих із запаленням.

У цілому, зростання вмісту ПАІ-1 на тлі низького вмісту ТАП свідчить про знижений потенціал системи фібринолізу, адже за таких умов суттєво зменшується можливість активації плазміногену, що є особливо критичним для осіб з нестачею плазміногену (у нашому дослідженні це донори з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) та 10 ± 3 Індекс (S/C). За таких умов ефективність лізису фібринових згустків буде пониженою, що при існуванні зсуву у коагуляційній ланці системи гемостазу буде чинником розвитку тромботичних ускладнень. Такі результати узгоджуються з даними інших дослідників, які також говорять про домінування стану гіпофібринолізу у осіб, що успішно подолали ковідну інфекцію [221].

У нашому дослідженні виключенням була група донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) – значне зростання вмісту плазміногену, ТАП та вміст ПАІ-1 на рівні значень донорів з нульовим титром антитіл до SARS-CoV-2, навпаки, є свідченням високого фібринолітичного потенціалу.

Говорячи про регуляцію активності плазміну варто згадати про існування неспецифічних механізмів контролю його активності, які реалізуються за участі низки неспецифічних інгібіторів, зокрема, α_1-антитрипсину (α_1-АТ). Визначення активності α_1-АТ у постковідний період продиктовано його роллю у патогенезі COVID-19. Дані щодо залучення α_1-АТ в патогенез коронавірусної інфекції неоднозначні. З одного боку, в гостру фазу захворювання спостерігається зниження його вмісту, що сприяє інгібуванню трансмембранної серинової протеїназу 2-го типу (TMPRSS2), яка є необхідною для проникнення у клітину коронавірусу SARS-CoV-2 [222]. З іншого боку, при тяжкому перебігу COVID-19 спостерігається зниження рівня α_1-АТ, що супроводжується надмірною активацією нейтрофільних протеаз, ушкодженням ендотелію та розвитком тромботичних ускладнень. Саме при недостатності або дисфункції α_1-АТ спостерігається посилення тканинної деструкції та системне запалення.

Аналіз літератури не дозволив виявити роботи, які б описували зміни вмісту чи активності α_1-АТ у постковідний період. Тому надалі нами було проаналізовано інгібіторний потенціал α_1-АТ у плазмі крові донорів з різними

титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Як видно з результатів, наведених на рис.4.7, активність α_1-АТ була підвищеною у всіх досліджуваних групах донорів за виключенням групи з титром антитіл проти SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C). Найвищий показник спостерігався у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) і складав 540,8 ІОД/мл у порівнянні з 435,0 ІОД/мл для донорів з нульовим титром антитіл.

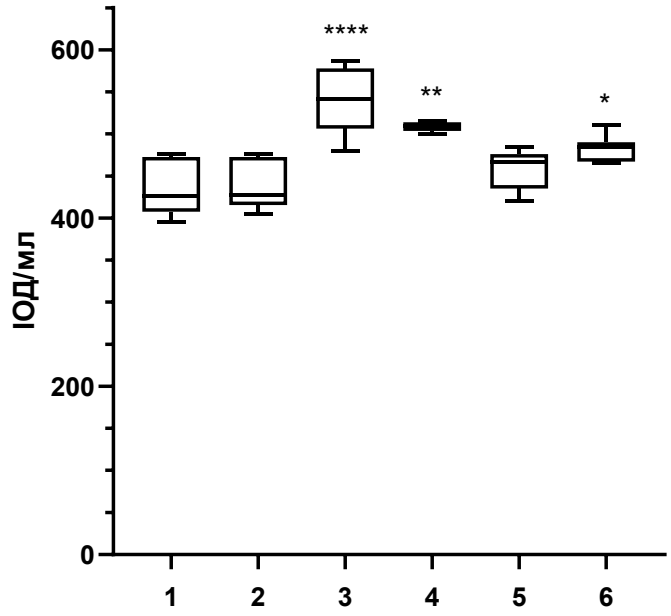


Рис. 4.7. Інгібіторний потенціал α1-антитрипсину у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * p<0,05 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Ще одним інгібітором активності плазміну слугує α2-макроглобулін (α_2-МГ), який через регулювання активності широкого спектру протеаз, включно з сериновими (трипсин, хімотрипсин), металопротеїназами, калікреїном, тромбіном, тощо, бере участь також і у контролі імунних реакцій, клітинної

проліферації, запальних процесів, метаболізму сполучної тканини та системи згортання крові.

Дослідження інгібіторного потенціалу α_2-МГ у групах донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 виявило значне зростання цього показника, яке навіть за найменшого зростання (донори з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) було у 7,4 рази вище ніж у групі донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 (рис.4.8). Разом з тим, значення інгібіторного потенціалу α2М у групі донорів з анти-SARS-CoV-2 IgG 55±5 Індекс (S/C) у 12,6 рази перевищувало показник донорів з нульовим титром.

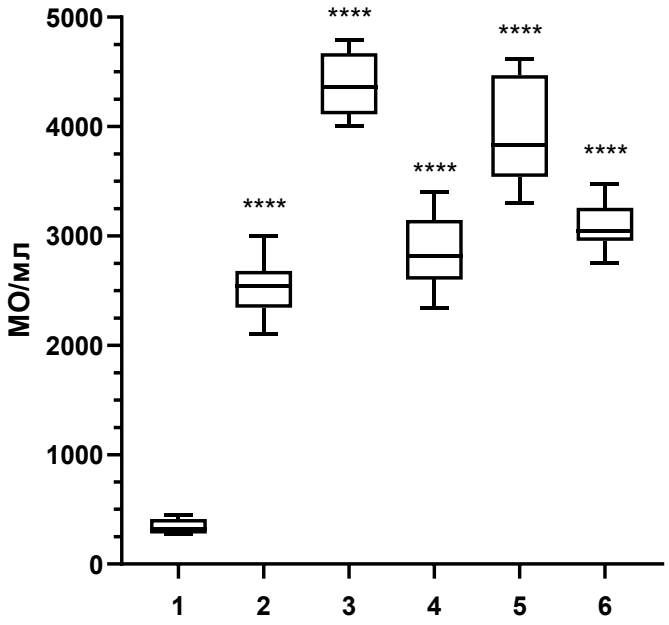


Рис. 4.8. Інгібіторний потенціал α2-макроглобуліну у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Оскільки α_2-МГ інгібує не лише плазмін, а й тромбін, значне зростання його концентрації впливатиме як на систему фібринолізу, так і на коагуляційну ланку.

Таке надмірне зростання активності α_2-МГ може бути проявом компенсаторної реакції організму у відповідь на активізацію протеолізу. Вже

доведеним є факт, що патогенез COVID-19 супроводжується дисбалансом протеолітичної системи, що виявляється у надмірній активізації протеолітичних каскадів, включаючи фібриноліз, систему комплементу та протеїнази, які залучені у розвиток та/чи регуляцію запальної відповіді, що в комплексі призводить до порушення гомеостазу, тканинної деструкції та імунопатологічної відповіді та розвитку при COVID-19. Даних щодо стану протеолітичних систем у постковідний період у сучасній літературі не так багато, проте не виключено, що активація протеолітичних процесів може зберігатися навіть після клінічного одужання і що саме протеолітичний дисбаланс є однією з причин тривалих змін у метаболічних шляхах та імунній регуляції і може призводити до розвитку симптомів постковідного синдрому, таких як втома, когнітивні порушення та м'язова слабкість.

Таким чином, оскільки α_2-МГ є неспецифічним інгібітором для низки протеїназ, можемо припустити, що зростання його активності може бути спрямовано на нейтралізацію протеолітичного спалаху. Проте тут варто звернути увагу на наступний момент - зазвичай роль α_2-МГ у підтриманні протеїназно-інгібіторного потенціалу зростає на етапі, коли пул високоспецифічних, але низькоємних інгібіторів вже виснажений. Так, у процесі активації фібринолізу плазмін насамперед зв’язується із α_2-АП, а вже після його повного використання подальша інактивація плазміну відбувається завдяки α_2-МГ. Але згідно наших результатів плазма крові донорів містить підвищені концентрації ПАІ-1 та α_1-АТ, що не дозволяє говорити про повне виснаження інгібіторного потенціалу плазми.

З огляду на отримані результати, роль α_2-МГ варто розглядати не лише в контексті його функції інгібувати широке коло протеїназ. Адже, окрім цієї ролі α_2-МГ виступає також переносником і резервуаром для цитокінів, хемокінів, факторів росту та гормонів. Його структура дозволяє утворювати комплекси з біологічно активними молекулами змінюючи у такий спосіб їхню біодоступність і регулюючи їх потенційну активність. Так, α_2-МГ може зв’язувати TGF-β, фактори росту фібробластів, епідермальний фактор росту, інтерлейкіни (IL-1β, IL-6),

TNF-α, інтерферон-γ - зберігаючи у такий спосіб їх активність або, навпаки, обмежуючи її в залежності від умов мікрооточення. Контрольоване вивільнення цих молекул у місцях ушкодження чи запалення сприяє локалізованій імунній відповіді та зменшенню системної цитотоксичності.

Окрім того α_2-МГ виконує функцію «позаклітинного шаперона», запобігаючи преципітації білків за умов стресу та формуючи стабільні комплекси з неправильно згорнутими білками, які надалі вилучаються з кров'яного русла [223,224]. Функціональна активність α_2-МГ регулюється гіпохлоритом, який утворюється внаслідок дії мієлопероксидази лейкоцитів і концентрація якого зростає в умовах запалення. Встановлено, що гіпохлорит індукує дисоціацію нативного тетрамеру α_2-МГ до димерних форм, що супроводжується зміною його біологічних властивостей, зокрема, зниженням здатності зв'язувати протеази, на тлі підвищення шаперонної активності та підвищення спорідненості до окремих цитокінів (таких як TNF-α, IL-2 та IL-6).

Можемо припустити, що у посковідний період α_2-МГ залучається до підтримки позаклітинного білкового гомеостазу та імунного балансу забезпечуючи координацію між каскадами коагуляції, фібринолізу та запальної відповіді, що що може бути одним із механізмів компенсаторних реакції організму у постковідний період.

Отже, на підставі комплексного аналізу показників фібринолітичної системи у осіб, які перенесли COVID-19, можемо зробити висновок про певне зниження фібринолітичного потенціалу, яке, у залежності від групи донорів, має різні причини.

Аналіз показників донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) свідчить про зниження активності системи фібринолізу, що може бути результатом зниження вмісту всіх ключових факторів і, що найбільш значимо, вичерпання резерву основного субстрату для утворення плазміну. Так, зниження вмісту плазміногену відбувалося на тлі зниження вмісту ТАП, вмісту α_2-МГ та значень ПАІ-1 на рівні донорів з нульовим титром антитіл. За таких умов висока потенційна активність плазміногену не може розглядатися як прогностично

сприятливий фактор, адже його загальна кількість є недостатньою для повноцінного фібринолізу і навіть при частковій активації система не матиме достатньої кількості субстрату для утворення ефективної концентрації плазміну. Крім того, виявлена потенційна активність плазміногену певною мірою може бути обумовлена внеском його деградованих форм та ковалентних комплексів, що не дозволяє розглядати наявний пул плазміногену як джерело функціонально активних молекул. Такі молекули через порушення вихідної структури можуть зберігати каталітичний домен, але бути позбавленими регуляторних доменів чи сайтів зв'язування з відповідними субстратами чи інгібіторами, що дозволяє їм уникати канонічних шляхів регуляції активності та створює передумови для неконтрольованого протеолізу з використанням широко спектру субстратів.

Високий вміст плазміногену, виявлений у групах донорів титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) на тлі підвищення вмісту ПАІ-1 і зниження вмісту ТАП означає, що навіть за умов підвищеної потенційної здатності плазміногену до активації, реалізація цього процесу блокуватиметься на етапі активації. За таких умов суттєво підвищені рівні неспецифічних інгібіторів α_2-макроглобуліну та α1-антитрипсину слугуватимуть додатковим механізмом стримання прояву активності фібринолітичної системи.

Лише у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено підвищений рівень ТАП, що на тлі високого вмісту плазміногену свідчить про збереження реактивності фібринолітичної системи.

Таким чином, зростання інгібіторної активності α_2-макроглобуліну та α_1-антитрипсину та зростання вмісту антиплазміну слугує проявом компенсаторного гальмування системного протеолізу на тлі тривалого низькоінтенсивного запаленого процесу, що притаманно постковідному періоду.

Разом з тим, аналіз літератури на наші власні дослідження вказують на те, що внаслідок перенесеної інфекції COVID-19 в організмі можуть утворюватися/накопичуватися аномальні білкові молекули та/чи їх фрагменти, які через змінені структурні та функціональні характеристики можуть впливати на активність інших факторів обумовлюючи «перепрограмовування» системи

гемостазу, а також впливати на інші системи. Такі зміни носять непередбачуваний характер і можуть зумовлювати розвиток неконтрольованих біохімічних каскадів, які, в свою чергу, потенційно здатні ініціювати виникнення різноманітних патологічних станів як у системі згортання крові, так і в організмі загалом.

Проведений комплексний аналіз стану системи фібринолізу у донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG дозволив виявити суттєві порушення, що зберігаються у постковідний період. Виявлено зміни як у вмісті, так і в активності ключових компонентів фібринолітичної системи, зокрема плазміногену, ТАП, ПАІ-1 та α_2-антиплазміну. Показано, що в окремих групах донорів рівень плазміногену знижений, при цьому спостерігається його знижена або парадоксально підвищена активність, що може бути наслідком молекулярних модифікацій або включення у білкові комплекси. Поряд з цим, виявлено зростання рівнів ПАІ-1, що супроводжується ознаками пригнічення ефективного фібринолізу, з одного боку, і підвищеним вмістом D-димеру - з іншого. Це свідчить про дисбаланс у системі «коагуляція-фібриноліз», що може бути зумовлений як триваючим ендотеліальним ушкодженням, так і персистуючим прозапальним станом. Високий рівень D-димеру на тлі пригнічення фібринолізу може свідчити про активацію фібринолізу в попередні періоди.

Таким чином, результати свідчать про збереження функціональної нестабільності системи фібринолізу у донорів навіть після клінічного одужання від COVID-19, що може мати патогенетичне значення у формуванні віддалених ускладнень постковідного синдрому, включаючи тромботичні події, фіброз та дисфункцію судинного ендотелію.

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 4:

1. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Halenova, T., Vovk, T., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2023). A study of fibrinolytic system

components in donor groups depending on various titers of circulating anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 34(7), 439–445. https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001248 **(Scopus, Q3)**

2. Калашнікова, М., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2023). Optimization of an enzyme electrophoresis method for using collagen as a substrate. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(94), 41–45. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.41-45

РОЗДІЛ 5
ПРОТЕОЛІТИЧНИЙ ПРОФІЛЬ ПЛАЗМИ КРОВІ ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ПРОТИ SARS-CoV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД

Актуальність дослідження системи протеолізу у постковідний період обумовлена критичною роллю протеїназ у патогенезі захворювання та ймовірними наслідками для системи гемостазу й імунної відповіді, що може бути одним з механізмів формування низки симптоматичних порушень, що часто виявляються у осіб, що перенесли ковідну інфекцію. SARS-CoV-2, як висококонтагіозний вірус із розвиненим механізмом взаємодії з протеолітичною системою організму-господаря, реалізує складну каскадну активацію власних і хазяйських протеїназ, що сприяє його реплікації, пригніченню захисних механізмів, а також запуску тромботичних ускладнень.

Гостра фаза COVID-19 характеризується значним системним дистресом, у якому протеолітичний гомеостаз виявляється особливо вразливим. У нормі система протеолізу виконує фундаментальні функції, включаючи деградацію білків, регуляцію сигнальних шляхів, контроль за апоптозом, гемостазом та імунною відповіддю. Однак у контексті SARS-CoV-2 спостерігається розбалансування цієї системи, що може бути як наслідком прямої дії вірусних протеаз, так і результатом порушення балансу між протеазами та інгібіторами організму у відповідь на цитокіновий шторм і тканинне ушкодження. В умовах гострої фази захворювання спостерігається гіперактивація матриксних металопротеїназ, зростання активності серинових протеїназ, включно з каллікреїн-кініновою системою, а також зниження вмісту/активності інгібіторів - таких як α1-антитрипсин чи інгібітор плазміну. Це створює сприятливе середовище для неконтрольованого розщеплення білків позаклітинного матриксу, судинної стінки та факторів коагуляції. Подібна деструкція білкових структур асоціюється з ускладненим перебігом COVID-19, включаючи альвеолярне пошкодження, васкулопатії, розвиток фіброзу та мікротромбозу.

Наразі особливої актуальності набувають дослідження протеолітичного профілю осіб у постковідний період. З огляду на характерні для постковідного періоду нейровегетативні порушення, м'язову слабкість, кардіоваскулярну дисфункції та імунний дисбаланс, виникає гіпотеза щодо участі залишкових або вторинно активованих протеолітичних каскадів у патогенезі цих станів. Певне занепокоєння викликає потенційна здатність незбалансованого протеолізу впливати на трансдукцію клітинних сигналів, інтерстиціальні структури та нейроендокринну регуляцію - критично важливі процеси, які можуть не відновлюватися повністю навіть після елімінації вірусу. Існують підстави вважати, що порушення протеолітичного гомеостазу є одним із ключових механізмів розвитку персистуючих постковідних симптомів, таких як міалгії, когнітивні порушення, вегетативна дисфункція та кардіоваскулярна нестабільність. Це обґрунтовує необхідність подальших поглиблених досліджень у цьому напрямі.

Сучасні уявлення про регуляцію протеолізу свідчать про його багаторівневу, каскадну природу з тісним переплетенням окремих ферментативних систем. У межах цієї складної регуляторної мережі окремі протеолітичні системи - фібринолітична, коагуляційна, каллікреїн-кінінова, комплементна, а також каспазозалежна - не функціонують ізольовано, а перебувають у постійному динамічному переплетінні, де активація або інгібування однієї ланки має прямі або опосередковані наслідки для решти. Порушення рівноваги в одній із таких систем, наприклад, внаслідок вірусного або імунного стресу, здатне ініціювати вторинні дестабілізаційні хвилі в інших каскадах. Виникає феномен системного протеолітичного розгалуження - явище, що має властивості позитивного зворотного зв'язку, здатного як посилювати, так і пролонгувати патологічні процеси. Такий механізм, очевидно, є критичним у патогенезі системних уражень при COVID-19.

У попередньому розділі роботи було виявлено достовірні зміни активності ключового ферменту фібринолітичної системи - плазміну. Як відомо, плазмін виконує не лише основну функцію лізису фібринових згустків, але й виявляє

широкий спектр позасистемних ефектів. Зокрема, він бере участь в активації матриксних металопротеїназ, модифікує рецепторні білки, впливає на проникність судинної стінки, а також здатен взаємодіяти з системою комплементу шляхом розщеплення компонента С3. Крім того, плазмін потенціює деградацію білків інтерстиціального матриксу, сприяючи розвитку запальних і фібротичних змін.

Таким чином, доцільним є поглиблене дослідження стану системи протеолізу, зокрема активності окремих ферментів, у осіб, які перенесли COVID-19. Виявлення змін у функціонуванні протеїназ дозволить сформувати цілісне уявлення про "протеолітичний профіль" у постковідний період. У зв’язку з цим нами було проведено дослідження вмісту та активності матриксних металопротеїназ і серинових протеїназ - ферментів, які тісно пов’язані з системою гемостазу виступаючи не лише потенційними регуляторами активності ключових факторів цієї система, а й власне будучи основними ефекторними ферментами системи гемостазу.

Матриксні металопротеїнази (ММП) - цинк-залежні ендопептидази, які відіграють виключно важливу роль у фізіологічних процесах ремоделювання тканин, ангіогенезу, загоєння ран, ембріогенезу та імунної відповіді [225]. Їх активність жорстко регулюється як на рівні синтезу, так і за допомогою специфічних інгібіторів - тканинних інгібіторів металопротеїназ (TIMP). Порушення цієї тонкої регуляторної рівноваги може призводити до деструктивних змін у міжклітинному матриксі, ушкодження судин, порушення бар’єрної функції ендотелію та прогресування фіброзу [226].

У контексті перебігу ковідної інфекції все більшу увагу привертає участь ММП в ініціації та підтриманні патологічних змін у легенях, судинному руслі та центральній нервовій системі. Активація цих ферментів, яка може запускатись у відповідь на системне запалення, гіпоксію чи дію прозапальних цитокінів, має двоякий характер: у фізіологічних межах вона сприяє відновленню тканин, тоді як у разі неконтрольованої експресії - переходить у деструктивну фазу, спричиняючи тривалі морфо-функціональні розлади. Показано, що рівень

матриксних металопротеїназ достовірно підвищується у кровотоці пацієнтів із COVID-19 порівняно зі здоровими особами, причому їх концентрація поступово зростає зі збільшенням тяжкості перебігу захворювання [227,228].

На певну увагу заслуговує гіпотеза щодо ролі ММП у формуванні симптоматики постковідного синдрому. Оскільки ММП здатні розщеплювати компоненти базальної мембрани, взаємодіяти з клітинними рецепторами, впливати на цитокінові сигнальні шляхи їх неконтрольована активація може бути причетна до підтримання персистуючого низькорівневого запалення та порушення репаративних механізмів у тканинах. Крім того, активація ММП може спричиняти накопичення продуктів деградації білків, які здатні впливати на клітини шляхом передачі сигналів із позаклітинного середовища, ініціюючи специфічні патологічні процеси, які, у свою чергу, можуть поглиблювати симптоматику COVID-19 [229,230].

З огляду на вищевикладене, у межах дослідження було проаналізовано вміст окремих матриксних металопротеїназ - ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-3/10, ММП-8 та ММП-9. Ці ферменти формують функціонально взаємопов’язану групу, що активно залучена до реалізації системної протеолітичної відповіді за умов запалення, ушкодження тканин та імунної активації. Їх узгоджена дія має вирішальне значення у процесах тканинного ремоделювання, деградації міжклітинного матриксу, а також у формуванні запального мікрооточення.

Узагальнюючи отримані результати щодо вмісту матриксних металопротеїназ (рис.5.1-5.3) можемо зробити висновок про активацію протеолізу, опосередкованого ММП, про що свідчить достовірне підвищення рівнів цих ферментів у плазмі крові більшості донорів у порівнянні з групою донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2. Водночас характер змін вмісту окремих ММП мав специфічні особливості: для одних ММП спостерігалося зростання вмісту у всіх досліджуваних групах, тоді як рівні інших ММП змінювалися залежно від титру анти-SARS-CoV-2 IgG - підвищуючись або знижуючись у різних групах.

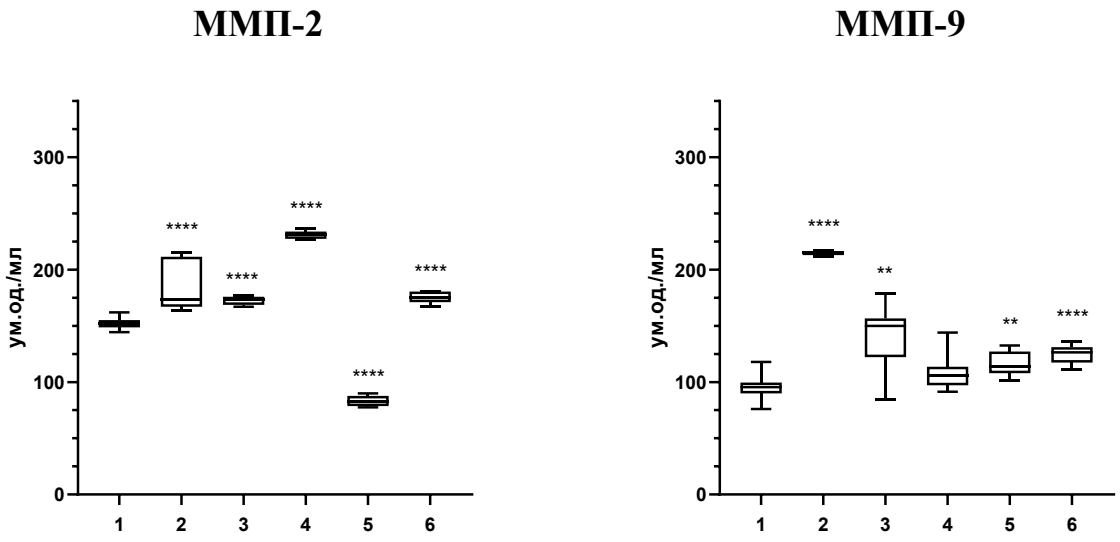


Рис. 5.1. Рівень ММП-2 та ММП-9 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C); ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C)

Так, вміст ММП-1 та ММП-9 зростав у всіх групах донорів - найвищий показник ММП-1 було виявлено у донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), для яких вміст ММП-1 майже вдвічі перевищував значення у групі донорів з нульовим титром антитіл, а найвищий вміст ММП-9 – у групі донорів з титром антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C). Вміст ММП-2 також зростав у плазмі крові всіх донорів за винятком групи з титром антитіл 125 ± 5 Індекс (S/C), де вміст ММП-2 знижувався у 1,84 рази. Незначне зниження вмісту ММП-3 спостерігалося у групах донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) та 75 ± 5 Індекс (S/C) – 146,50±4,67 ум.од/мл та 148,71±4,85 ум.од/мл у порівнянні з 153,17±5,07 ум.од/мл у групі донорів з нульовим титром антитіл. Вміст ММП-3/10 знижувався у групах донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) (у 1,11 рази) та 125 ± 5 Індекс (S/C) (у 1,24 рази). Разом з тим, зростання вмісту ММП-8 мало місце лише для донорів з титрами антитіл 55 ± 5 Індекс (S/C) та 75 ± 5 Індекс (S/C).

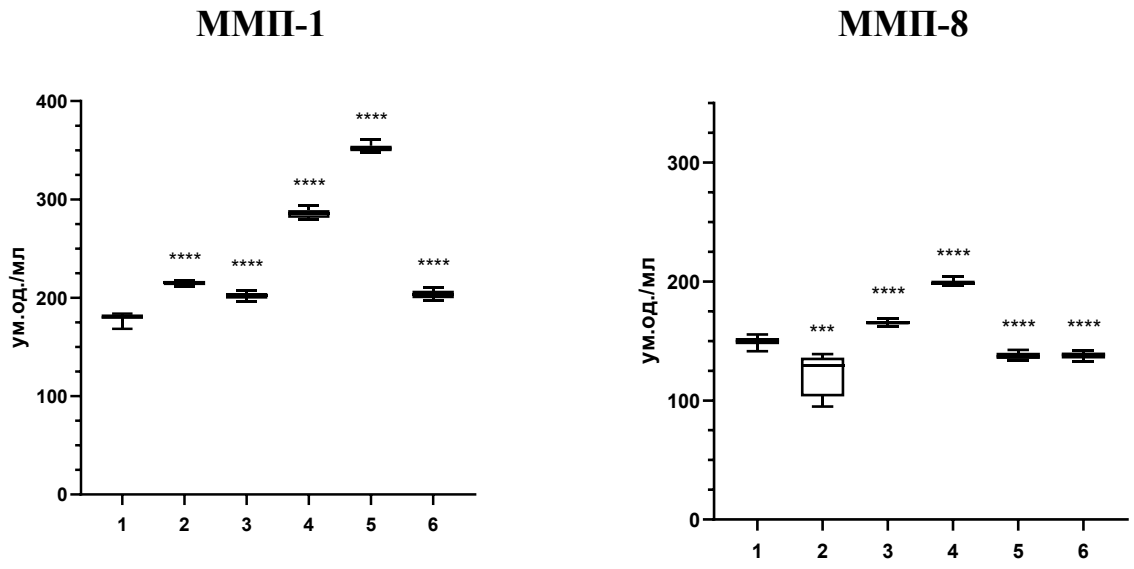


Рис. 5.2. Рівень ММП-1 та ММП-8 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C); ** $p \leq 0,01$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C)

Зміни вмісту ферментів не завжди супроводжуються відповідними змінами їх функціональної активності. Це зумовлено низкою чинників, зокрема наявністю неактивних форм ферментів, дією специфічних інгібіторів або змінами внаслідок посттрансляційної модифікації, які можуть впливати на каталітичну здатність ферменту. У зв'язку з цим доцільним є дослідження, спрямовані на виявлення саме активних форм ферментів. Для вирішення цього завдання було зразки плазм крові донорів було проаналізовано методом ензим-електрофорезу.

Як відомо, за субстратною специфічністю ММП можна поділити на кілька функціональних підгруп – желатинази, до яких належать ММП-2 та ММП-9, розщеплюють денатурований колаген (желатин), а також ламінін, фібронектин і інші компоненти базальної мембрани. Строміїленази (ММП-3 та ММП-10) діють переважно на протеоглікани, ламінін та інші молекули міжклітинного матриксу,

а також активують інші ММП. Колагенази (ММП-1, ММП-8, ММП-13) характеризуються здатністю до специфічного розщеплення нативного фібрилярного колагену I, II та III типів [231,232].

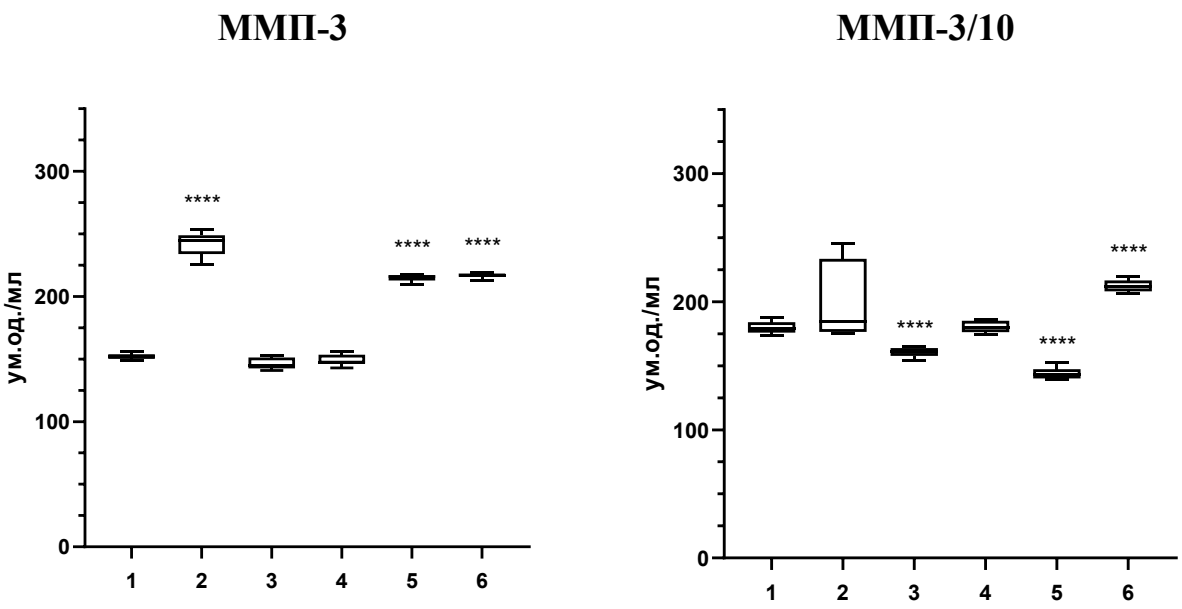


Рис. 5.3. Рівень ММП-3 та ММП-3/10 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C)

Для диференційованої оцінки активності желатиназ і колагеназ в методі ензим-електрофорезу було використано два субстратні білки - желатин і колаген.

Аналіз зразків плазми крові донорів методом ензим-електрофорезу з використанням як субстратного білка желатину виявив присутність ферментів з молекулярною масою 72 кДа та 92 кДа (табл.5.1), які, згідно з літературними даними, можуть відповідати ММП-2 (72 кДа) та ММП-9 (92 кДа) [233,234]. Порівняльний аналіз протеолітичної активності свідчить про існування певних відмінностей у протеолітичному профілі донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2.

Таблиця 5.1

Молекулярна маса активних ферментів за результатами ензим-електрофорезу з використанням желатину як субстрату

Групи донорів, Індекс (S/C)	Молекулярна маса активних ферментів		
	72 кДа	92 кДа	110-120 кДа
0	-	+	-
10 ± 3	+	+	+
55 ± 5	+	+	+
75 ± 5	+	+	+
125 ± 5	-	+	-
150 ± 5	+	+	-

У зразках плазми крові донорів, у яких не виявлено антитіл проти SARS-CoV-2, було зареєстровано активність, що відповідає ММП-9, тоді як активність у зоні, яка за молекулярною масою відповідає ММП-2, відсутня. Загалом, протеолітична активність ММП-9 виявлялася у всіх досліджуваних групах донорів, що узгоджується з даними про підвищення її вмісту у плазмі крові. Водночас активність ММП-2 була виявлена у всіх зразках плазми донорів, окрім групи з титром антитіл 125 ± 5 Індекс (S/C). Крім того, у групах донорів з титрами антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C) та 75 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено присутність ферментів з молекулярною масою понад 100 кДа, що скоріш за все може бути результатом включення ММП до складу комплексів. Відомо, що ММП-9 може зв'язуватись із β2-мікроглобуліном (25 кДа) з утворенням комплексу з молекулярною масою приблизно 125 кДа. Крім того, ММП-9 може існувати у вигляді димерів (~215 кДа) або навіть мультимерних форм (~240 кДа) [235]. Слід підкреслити, що у зразках плазми крові донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 протеолітична активність у діапазоні молекулярної маси понад 100 кДа не виявлялася. Це може свідчити про відсутність утворення високомолекулярних комплексів ММП-9, що, у свою чергу, може вказувати на нижчий рівень системної протеолітичної активації у даної категорії донорів.

Дещо інша картина спостерігалася при використанні як субстрату колагену (табл.5.2). Так, активні ферменти було виявлено у діапазоні молекулярних мас від 40 до 55 кДа та від 90 до 100 кДа.

Таблиця 5.2

Молекулярна маса активних ферментів за результатами ензим-електрофорезу з використанням колагену як субстрату

Групи донорів, Індекс (S/C)	Молекулярна маса активних ферментів	
	40-55 кДа	90-100 кДа
0	+	+
10 ± 3	+	+
55 ± 5	-	+
75 ± 5	-	-
125 ± 5	-	+
150 ± 5	-	+

Ферменти з молекулярною масою у діапазоні 40–55 кДа були виявлені лише у зразках плазми крові донорів з нульовим титром антитіл та титром антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C), що може відповідати ММП-1 (42–48 кДа) чи ММР-13 (48-50 кДа) [236]. Крім того, у всіх досліджуваних групах, окрім групи з титром антитіл проти SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C), спостерігалися зони протеолітичної активності в діапазоні молекулярних мас від 90 до 100 кДа, що може бути зумовлено присутністю ферментів у вигляді ковалентних комплексів, у тому числі й з інгібіторами. За умов оксидативного стресу механізми взаємодії між ММП і їхніми інгібіторами можуть набувати інакших - ковалентних - характеристик. Зокрема, у літературі зустрічаються роботи, які описують можливість утворення дисульфідних містків або модифікацій за типом S-нітрозилювання та глутатіонірування, які призводять до стабільного зв'язування ферментів з інгібіторами [237,238].

Отже, формування активного протеолітичного фону у частини донорів у постковідний період відбувається із залученням ММП. Проте мережа ММП не

функціонує незалежно від інших клітинних протеолітичних каскадів, тому порушення в одній з систем викликатиме певні зміни в іншій. Все більше експериментальних і клінічних даних вказують на тісний функціональний зв'язок між ММП та ключовими компонентами фібринолітичної системи та системи згортання крові [239,240]. Враховуючи участь цих ферментів у багатьох фізіологічних та патологічних процесах, їх широку субстратну специфічність, виявлені нами результати потребують додаткової деталізації взаємозв'язків між ММП та, зокрема, ключовими ефекторами системи гемостазу, а також з'ясування причин, що лежать в основі таких порушень.

ММП, насамперед ММП-1, ММП-2, ММП-3 та ММП-9, беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, що опосередковано впливає на судинну цілісність, проникність ендотелію та активацію тромбоцитів. Руйнування структурних компонентів базальної мембрани - колагену, ламініну, еластину - створює умови для вивільнення прокоагулянтних факторів, які ініціюють локальну активацію гемостатичної системи.

ММП-9 є ключовим ферментом, що бере участь у деградації компонентів позаклітинного матриксу, проте її функціональна активність виходить за межі матриксного ремоделювання. Зокрема, ММП-9 здатна модулювати коагуляційний каскад та сприяти тромбоутворенню через кілька механізмів. По-перше, ММП-9 може впливати на систему гемостазу, зокрема шляхом розщеплення інгібітору тканинного фактору (TFPI), що призводить до зниження його активності та потенційного посилення коагуляційного процесу [241]. По-друге, ММП-9 сприяє активації моноцитів у присутності фібриногену, що веде до підвищеного утворення тромбіну та формування згустків [242].

У контексті COVID-19, підвищена експресія ММП-9 асоціюється з ендотеліальною дисфункцією та порушенням гемостатичного балансу, що може сприяти розвитку тромботичних ускладнень, таких як ішемічні інсульти та тромбоемболії. Крім того, ММП-9 бере участь у порушенні гематоенцефалічного бар'єру під час ішемічного інсульту, що може посилювати нейрозапалення та сприяти прогресуванню неврологічних ускладнень.

Ще одна ММП на яку варто звернути увагу через підвищення її рівня у всіх групах донорів – це ММП-1, також відома як колагеназа-1. Хоча ММП-1 традиційно асоціюється із процесами тканинного ремоделювання та запалення, все більше даних свідчить про її безпосередню участь у модуляції системи гемостазу. З одного боку, ММП-1 опосередковано впливає на судинну цілісність, сприяючи деградації субендотеліального матриксу, що може знижувати бар'єрну функцію ендотелію, збільшувати проникність судин і створювати умови для активації згортальної системи. З іншого боку, ММП-1 здатна прямо взаємодіяти з компонентами гемостатичної системи. Зокрема, у роботах [243,244] встановлено, що ММП-1 може специфічно розщеплювати тромбоцитарні рецептори, зокрема PAR-1 (protease-activated receptor-1), у неканонічній ділянці стимулюючи їх активацію незалежно від тромбіну. Це призводить до активації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, включаючи Rho-GTP, зміни форми клітини та MAPK-сигналінг, що стимулює агрегацію тромбоцитів і тромбогенез.

Крім того, ММП-1 може впливати на фібринолітичну систему: її підвищена активність асоціюється зі змінами у структурі фібрину, що призводить до утворення сіток з аномальними механічними властивостями - менш проникних для плазміну та інших фібринолітичних агентів. У результаті це може сприяти утворенню резистентних до лізису тромбів, що клінічно проявляється підвищеним ризиком тромбозів. Крім ММП-1, на структуру фібринового згустку здатні впливати й ММП-2 і ММП-9 – внаслідок їх дії формуються згустки, менш чутливі до дії плазміну.

Особливої уваги у контексті постковідного синдрому заслуговує взаємозв'язок між ММП-1 та системою гемостазу, з огляду на підвищений ризик тромботичних ускладнень. В умовах персистуючого низькорівневого запалення, що супроводжується посиленою експресією прозапальних цитокінів та оксидативним стресом, активація ММП-1 здатна спричинити комплексні зміни в судинному руслі. Зокрема, неконтрольована активація ММП-1 може сприяти порушенню судинного тонусу, активації тромбоцитів та ремоделюванню фібринового каркасу. Така сукупність ефектів створює сприятливі умови для

розвитку тромбоутворення, посилюючи патогенетичні механізми, притаманні постковідному періоду. На сьогодні існують переконливі дані щодо залучення ММП-3 до регуляції процесів фібринолізу як безпосередньо - через деградацію фібрину, так і опосередковано - шляхом модифікації активності плазміногену та його інгібіторів. Зокрема, встановлено, що інкубація фібриногену з ММП-3 призводить до втрати його здатності до полімеризації під дією тромбіну, що свідчить про глибоку структурну трансформацію білка. Водночас, аналогічна обробка фібриногену ММП-2 не викликає подібного ефекту, вказуючи на специфічність впливу окремих представників родини ММП на фактори системи гемостазу [245]. Інкубація зшитих фібринових згустків з ММП-3 приводила до їх повного лізису вже через 24 години. Під час деградації фібриногену, зшитого фібрину та фрагменту DD під дією ММП-3 утворювався фрагмент, подібний до D-мономеру. Автори роботи [246] довели, що розщеплення фібриногену та зшитого фібрину під дією ММП-3 є специфічним та відрізняється від класичного плазмін-залежного фібринолізу. ММП-3 також здатна специфічно розщеплювати тканинний активатор плазміногену та активатор плазміногену урокіназного типу, внаслідок чого відбувається відсічення ділянок, відповідальних за зв'язування з клітинними рецепторами [247]. Є дані про розщеплення фібрину за участі ММП-9 і частково ММП-1 [248,249].

Наразі вважається, що між окремими представниками родини матриксних металопротеїназ існують тісні функціональні взаємозв'язки, які визначаються їх здатністю впливати на активність один одного. Зокрема, деякі ММП можуть ініціювати або посилювати активацію інших ферментів родини, що формує складну регуляторну мережу у межах протеолітичного каскаду. Такі взаємодії реалізуються шляхом взаємної активації, кооперативної дії на спільні субстрати та регуляції активності один одного через механізми транскаскадного впливу, що і підтверджується отриманими нами результатами. Так, активована ММП-3 може розщеплювати латентні форми ММП-1, ММП-8 і ММП-9, що супроводжується експоненційним посиленням протеолітичного сигналу, який за нормальних умов регулюється системою тканинних інгібіторів. Проте в умовах тривалого

запального процесу, оксидативного стресу або цитокінового навантаження - як це спостерігається у постковідному періоді - ефективність механізмів інгібування помітно знижується, проте навпаки посилюється експресія генів, що кодують ММП [250,251]. Як наслідок, формується своєрідне «протеолітичне порочне коло», у якому взаємна активація ММП підтримує високий рівень деградації позаклітинного матриксу, порушення архітектоніки тканин, а також змінює функціональність рецепторних та сигнальних білків. Такий неконтрольований каскад не лише підтримує субклінічний запалення, а й створює умови для розвитку фіброзу, ангіопатій, нейродегенерації, які часто реєструються як пізні або стійкі ускладнення постковідного синдрому.

Цей механізм є особливо актуальним для тканин з обмеженим регенераторним потенціалом - таких як легенева паренхіма, ендотелій судин, міокард, нейроглія - де тривала активація ММП у поєднанні з ослабленням антипотеолітичного контролю сприяє поступовій, але незворотній структурній перебудові.

ММП-9 у свою чергу може активувати ММП-2. В умовах запалення ця взаємна активація може стати неконтрольованою, формуючи позитивний зворотний зв’язок. За відсутності ефективної регуляції з боку ТІМП, розгортається феномен «системної протеолітичної активації», що може набувати патологічного характеру та сприяти розвитку фіброзу, васкулопатій, нейродегенерації, що проявляється у вигляді стійких клінічних ускладнень.

Отже, зрозуміло, що контроль над активністю ММП є критично важливим для збереження гомеостазу тканин. Один з механізмів контролю активності ММП реалізується через утворення комплексів з ТІМП-1, який є ключовим фізіологічним регулятором активності матриксних металопротеїназ, здатним формувати стабільні неактивні комплекси з ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-9 та іншими представниками цього ферментного сімейства. Баланс між ММП та ТІМП-1 забезпечує контрольовану деградацію білків позаклітинного матриксу, необхідну для перебудови тканин, загоєння та імунної відповіді і його порушення

може бути патогенетичним механізмом виникнення порушень у постковідний період.

Тому надалі було проаналізовано рівень основного інгібітору ТІМП-1 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 (рис.5.4). Отримані нами результати свідчать про існування певного дисбалансу між вмістом ММП та ТІМП-1, що вказує на потенційне порушення механізмів регуляції протеолітичної активності. Так, вміст ТІМП-1 зростав у всіх групах донорів, проте для груп донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C) вміст ТІМП-1 зростав незначно, тоді як 55 ± 5 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C) та 175 ± 5 Індекс (S/C) зміни вмісту інгібітору були більш суттєвими.

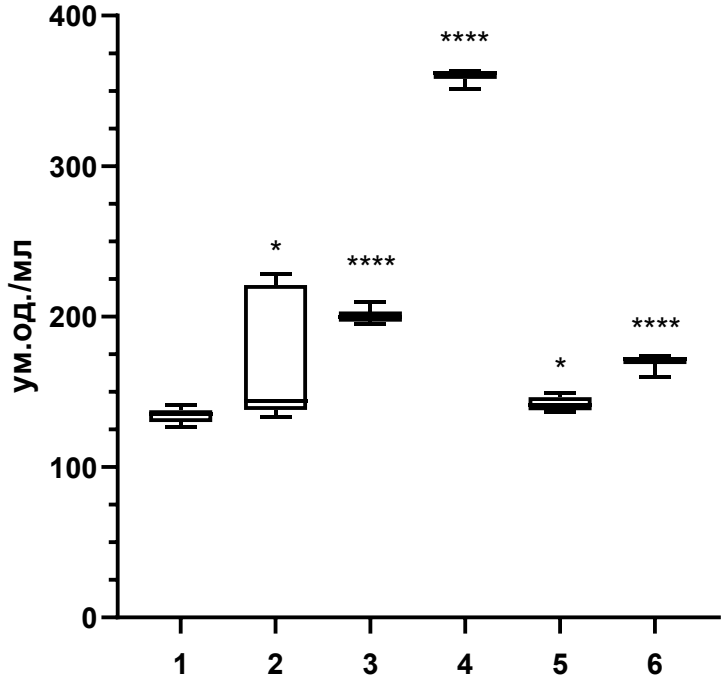


Рис. 5.4. Рівень ТІМП-1 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C); * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 Індекс (S/C)

Для більш точної оцінки стану протеолітичного балансу було розраховано коефіцієнт ММП-9/ТІМП-1. Перевищення значень коефіцієнту ММП-9/ТІМП-1, виявлене нами для більшості донорів з титрами антитіл до SARS-CoV-2, вказує на домінування протеолітичного потенціалу над інгібіторним. Так, для групи донорів з нульовим титром антитіл цей коефіцієнт становив 0,7; для донорів з титром 10 ± 3 Індекс (S/C) – 1,53; для донорів з титром 55 ± 5 Індекс (S/C) – 0,8; для донорів з титром 75 ± 5 Індекс (S/C) – 0,81; для донорів з титром 125 ± 5 Індекс (S/C) – залишався у межах значень донорів з нульовим титром, лише для донорів з титром 150 ± 5 Індекс (S/C) цей показник становив 0,28, що вказує на пригнічення протеолізу, опосередкованого ММП-9. Зростання значень коефіцієнту ММП-9/ТІМП-1 також є свідченням запального процесу.

Порушення тонкого балансу між ММП та ТІМП-1 набуває особливого значення в умовах постінфекційної перебудови тканин, оскільки саме надлишкова або неконтрольована активність ММП здатна ініціювати патологічну деградацію компонентів позаклітинного матриксу, розщеплення адгезивних та рецепторних молекул, порушення інтеграції клітин із навколишнім середовищем. У такому контексті ММП перетворюються з фізіологічних «ремоделюючих агентів» на чинники деструкції, які поглиблюють ушкодження тканин та сприяють розвитку хронічного запалення, фіброзу або васкулопатії.

Одним із клінічно важливих аспектів постковідного синдрому є загострення перебігу хронічних нейродегенеративних захворювань. Найбільш поширеним аутоімунним захворюванням, яке характеризується хронічним запаленням, активацією мікроглії, демієлінізацією як білої, так і сірої речовини, а також дифузною нейродегенерацією в межах усієї ЦНС є розсіяний склероз (РС). З’являється все більше даних про загострення симптоматики, збільшення частоти рецидивів, посилення резистентності до базисної терапії, а також появу нових неврологічних феноменів у пацієнтів із діагнозом РС, які перенесли COVID-19.

Основною морфологічною ознакою РС є формування вогнищевих демієлінізованих уражень - так званих «бляшок», які характеризуються

руйнуванням олігодендроцитів, втратою мієліну, пошкодженням нейроаксонів та розвитком гліального рубця, також відмічається порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру [252]. Можливим поясненням перерахованих порушень є вірус-індукована дестабілізація імунного мікрооточення центральної нервової системи, у якій ключову роль можуть відігравати матриксні металопротеїнази. Зокрема, відомо, що за умов розсіяного склерозу ММП, і насамперед ММП-9, виконують патогенетичну функцію, розщеплюючи компоненти базальної мембрани гематоенцефалічного бар'єра, тим самим полегшуючи трансендотеліальну міграцію активованих Т-лімфоцитів до ЦНС і сприяючи розвитку демієлінізуючих процесів [253,254]. Порушення балансу між рівнями активних ММП і тканинних інгібіторів металопротеїназ, зокрема ТІМП-1, корелює з тяжчим перебігом хвороби та погіршенням неврологічного статусу. Крім того, ММП можуть посилювати розщеплення основного білка мієліну, тим самим активуючи процес демієлінізації.

У пацієнтів з РС COVID-19 може виступати як тригер для активації латентних протеолітичних каскадів. Інфекційне навантаження, цитокіновий шторм, судинна дисфункція та активація мікроглії створюють умови для підвищеної експресії ММП. За умов порушення механізмів регуляції їх активності ці ферменти здатні посилювати нейрозапалення, порушувати структури гематоенцефалічного бар'єру та сприяти подальшій дегенерації аксонів. Таким чином, деструктивний потенціал ММП, посилений постінфекційними змінами, може виступати як одна з ланок загострення або трансформації перебігу розсіяного склерозу в постковідному періоді.

З огляду на викладені вище факти, обґрунтованими є дослідження профілю матриксних металопротеїназ, зокрема ММП-1, -2, -3, -8, -10, а також рівня ТІМП-1 у пацієнтів із розсіяним склерозом, які перенесли COVID-19.

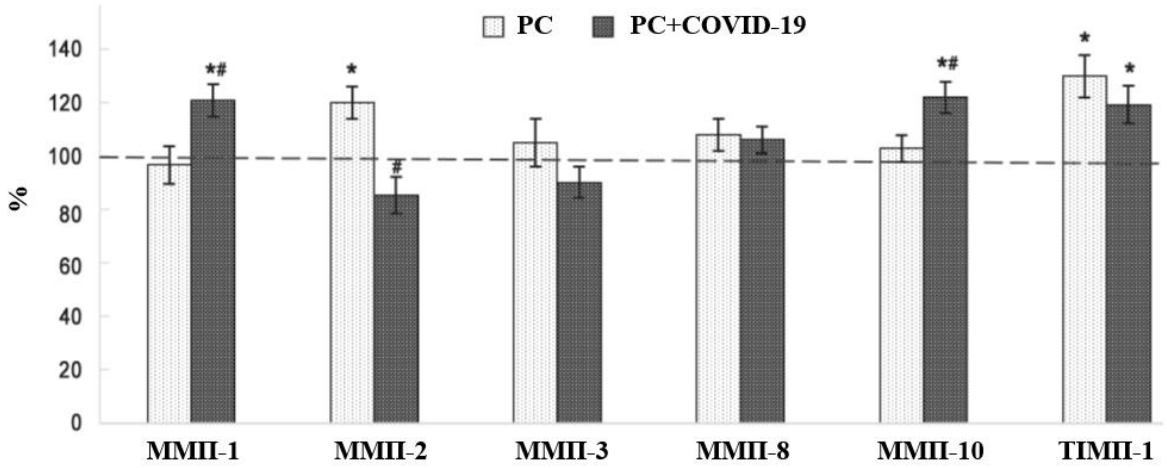


Рис. 5.5. Рівень ММП та ТІМП-1 у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом

Примітка: * $p<0,05$ відносно групи умовно здорових донорів; # $p<0,05$ відносно групи пацієнтів з розсіяним склерозом

Отримані результати (рис.5.5) вказують на достовірне підвищення рівня ММП-2 у плазмі крові пацієнтів із розсіяним склерозом порівняно з контрольною групою пацієнтів з РС, що не мали підтвердженого COVID-19 в анамнезі. Ці дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які також виявили підвищені рівні ММП-2 у пацієнтів із РС [255]. Натомість у групі пацієнтів із РС, які перенесли COVID-19, спостерігалося зниження рівня ММП-2 у плазмі крові, тоді як вміст ММП-1 та ММП-10 був достовірно підвищеним.

Згідно з нещодавніми дослідженнями, експресія ММП при COVID-19 є варіабельною і корелює з початком та тяжкістю перебігу захворювання. Зокрема, рівень ММП-1 та її активність були підвищеними у крові пацієнтів із COVID-19, особливо в тяжких та критичних випадках [256]. Оскільки надмірна експресія ММП-1 призводить до гіперактивації сигнального каскаду ММП-1/PAR1, підвищена активність цього ферменту у хворих на РС після перенесеної COVID-19-інфекції може зумовлювати порушення функції ендотеліальних клітин, надмірне рекрутування та активацію імунокомпетентних клітин, що, ймовірно, сприяє загостренню неврологічної симптоматики при РС. Крім того, встановлено, що підвищений вміст ММП-10 у спинномозковій рідині корелює зі

ступенем неврологічної дисфункції, що дозволяє розглядати цей фермент як потенційний прогностичний маркер нейродегенерації [257]. Водночас, на сьогодні відсутня чітка доказова база для пояснення механізмів за допомогою яких ММП-10 може спричиняти або посилювати неврологічні порушення після перенесеної COVID-19 інфекції.

Як додатковий тест оцінки порушень протеолітичного гомеостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом було використано метод ензим-електрофорезу, який дозволяє визначити присутність у зразках активних ферментів. Як субстрат застосовували желатин, який є субстратом для желатиназ (ММП-2 і ММП-9), а також деяких інших ММП, у тому числі й ММП-1, ММП-8, ММП-13 [258].

Таблиця 5.3

Результати оцінки протеолітичного профілю плазми крові пацієнтів із розсіяним склерозом методом ензим-електрофорезу (M±m)

Молекулярна маса, кДа	Відносно здорові донори (n = 30)	РС (n = 56)	РС + COVID-19 (n = 41)
110-115	8 ± 1	-	-
95-100	17 ± 2	-	-
90-95	18 ± 3	13 ± 2	12 ± 1
85-90	-	14 ± 3	18 ± 3
75-80	-	28 ± 2	24 ± 3
60-65	-	44 ± 3	42 ± 4
>50	55 ± 4	-	-

Отримані результати підтвердили попередні спостереження щодо змін у профілі ММП у плазмі крові пацієнтів із РС. У осіб з РС спостерігалася вища інтенсивність зон гідролізу, локалізація яких за молекулярною масою відповідає активній формі ММП-2 (62 кДа) та її проферменту (72 кДа) у порівнянні з результатами у контрольній групі. Крім того, було виявлено дві додаткові смуги в області 85–95 кДа, які з огляду на молекулярну масу, ймовірно, є проММП-9 та активною формою ММП-9 (92 та 84 кДа відповідно). Натомість у зразках плазми контрольної групи було виявлено смуги з молекулярною масою понад 100 кДа,

які були відсутні у більшості проаналізовано зразків плазми крові пацієнтів із РС. Можемо припустити, що ці смуги є комплексами ММП з іншими білками. Крім того, у зразках плазми донорів контрольної групи була виявлена зона гідролітичної активності в діапазоні молекулярної маси менше 50 кДа. Імовірно, ця активність пов'язана з наявністю фрагментів, що є продуктами часткової деградації ММП-2 або ММП-9, які зберігають ферментативну активність.

Підвищення активності ММП може мати безпосередній зв'язок із патофізіологією РС та корелювати з тяжкістю клінічного перебігу захворювання. Активація ММП супроводжується інтенсифікацією запального процесу, про що свідчить виявлене нами підвищення концентрації С-реактивного білка [259]. Як уже згадувалося наслідком активації ММП є порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру, деградація білків, асоційованих із мієліном, що в сукупності сприяє прогресуванню нейродегенеративних змін. У цьому контексті активація ММП, зокрема ММП-2 та ММП-9, може розглядатися як потенційний прогностичний біомаркер вираженості симптоматики РС, особливо в осіб, які перенесли COVID-19, що додатково навантажує імунну систему та може модифікувати перебіг основного захворювання.

Узагальнюючи результати дослідження вмісту та активності ММП у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, можна стверджувати, що ММП є не лише маркерами тканинної активності, а й молекулами, що здатні впливати на функціонування факторів системи гемостазу. Їхня роль особливо актуалізується в умовах хронічного запалення, судинного ремоделювання та постковідного синдрому. Активація матриксних металопротеїназ супроводжується паралельною активацією гемостатичних механізмів, що створює умови для комплексного порушення протеолітичного та коагуляційного гомеостазу. Посилення цього процесу відбувається на тлі зниження регуляторної ефективності тканинних інгібіторів металопротеїназ, внаслідок чого формується неспецифічна протеолітична активність у плазмі крові. Подібний дисбаланс потенційно здатен зміщувати гемостатичну рівновагу як у бік гіперкоагуляції - із ризиком тромбоутворення, так і у напрямку гіпокоагуляції - з підвищеною

вірогідністю геморагій, залежно від патофізіологічного контексту та локалізації залучених тканин.

Окрім впливу на фактори системи гемостазу, активовані ММП здатні впливати на активність низки цитокінів, хемокінів та факторів росту, змінюючи тим самим імунний мікрооточення тканин та впливаючи на процеси ангіогенезу, неоіннервації й репарації [260,261]. Така багатовекторна дія обумовлює складну участь ММП у системному відновленні організму після перенесеної вірусної інфекції, а за відсутності чітких механізмів контролю - може слугувати основою для формування постковідних ускладнень, зокрема фіброзних, неврологічних або судинних.

З огляду на те, що протеолітичний профіль плазми крові представлений переважно сериновими протеїназами та металозалежними ферментами, для формування цілісної картини протеолітичної активності у плазмі крові осіб, що перенесли ковідну інфекцію і мають різні титри антитіл проти SARS-CoV-2 доцільним є проаналізувати також вміст та активність серинових протеїназ. Це є особливо актуальним з урахуванням того факту, що більшість із цих ферментів залучені до ключових ланок системи гемостазу - зокрема коагуляційного, фібринолітичного каскадів, а також є представниками калікреїн-кінінової системи. Відтак, комплексна характеристика протеолітичного профілю не може вважатись повною без оцінки вмісту й активності серинових протеїназ, які відіграють центральну роль у підтриманні гемостатичної рівноваги.

Для визначення концентрації серинових протеїназ спочатку з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 було очищено фракцію серинових протеїназ. Відповідно до отриманих результатів (рис.5.6), більш виражене зростання концентрації серинових протеїназ спостерігалося лише у групах донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C) та 55 ± 5 Індекс (S/C) - у 1,55 рази та 1,39 рази, відповідно. У решті груп цей показник був незначно вищим за значення у групі донорів з нульовим титром антитіл.

Варто наголосити, що оскільки фракцію серинових протеїназ отримували методом хроматографії на бензамідин-сефарозі, то до складу фракції входять

ферменти з відкритою конформацією активного центру, деградовані форми плазміногену (у тому числі й міні-плазміноген та легкий ланцюг плазміну) та/або комплекси плазміногену чи його деградованих форм, які зберегли п’ятий кринґл, з іншими білками. Малоймовірно, що отримані нами фракції містять активні ферменти такі, як тромбін чи FXa, адже їх кількість строго контролюється навіть за умов патологічних процесів або є строго локалізованою; не виключена присутність у складі отриманої фракції незначної кількості плазміну.

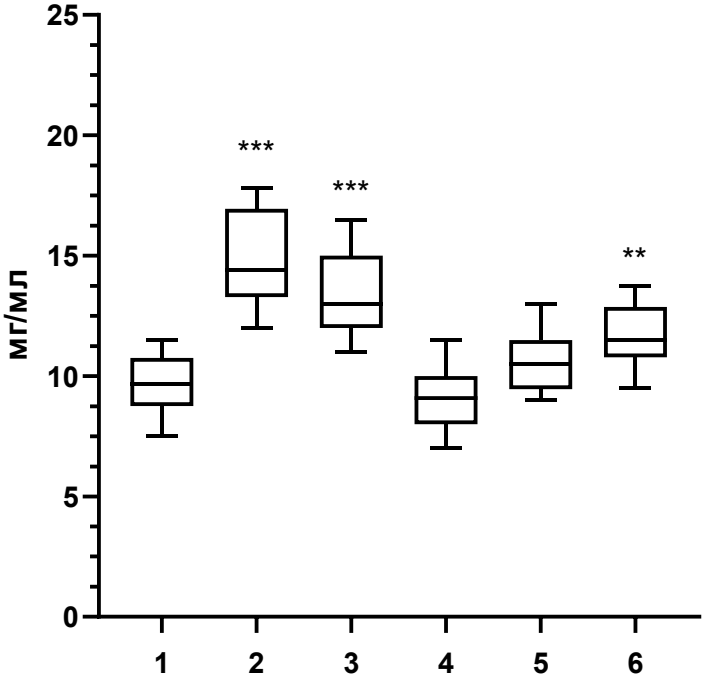


Рис. 5.6. Концентрація серинових протеїназ у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Проте з огляду на вище перераховане, найбільш обгрунтованим видається припущення, що основна кількість білків у складі фракцій серинових протеїназ обумовлена деградованими формами плазміногену.

За нашими даними найбільш виражене зростання концентрації серинових протеїназ було виявлено у групах донорів з найнижчим вмістом плазміногену (рис.5.6). Така невідповідність може бути пояснена, перш за все, за рахунок утворення стійких комплексів плазміногену з високомолекулярними білками, як-то антитіла – за таких умов їх детектування методами імуноферментного аналізу може бути утрудненим через створення стеричних перешкод для взаємодії детектуючих антитіл з відповідними епітопами цільового білка. Водночас такі комплекси можна очищати з плазми крові використовуючи бензамідин-сефарозу.

Як уже зазначалося вище, це можуть бути комплекси плазміногену, або його деградованих форм, які зберегли п’ятий кringл. Не виключеним є внесок інших серинових протеїназ, які можуть з’являтися у кровотоці донорів у постковідний період.

Навпаки, деяке зростання концентрації серинових протеїназ у групах донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) на тлі суттєвого зростання вмісту плазміногену, може бути наслідком формування пулу молекул плазміногенового походження, які втратили ділянки молекули, необхідні для зв’язування з бензамідин-сефарозою, або ці ділянки заблоковані іншими білками.

Така різниця між показниками у групах донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 може слугувати непрямим доказом того, що протеолітичні процеси у плазмі крові донорів характеризуються певними відмінностями, які призводять до утворення пулу різних деградованих форм білків, у тому числі й факторів системи гемостазу.

Для отримання більш детальної інформації про склад фракцій серинових протеїназ, очищених з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, було проведено їх аналіз методом електрофорезу за відновлювальних та невідновлювальних умов (табл.5.4) та методом ензим-електрофорезу з використанням фібриногену як субстратного білка (табл.5.5).

Таблиця 5.4

Молекулярна маса та відносний рівень білків у складі фракцій серинових протеїназ, очищених з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2

Групи донорів, Індекс (S/C)	К-ть білкових смуг	Умови проведення електрофорезу			
		Невідновлювальні умови		Відновлювальні умови	
		Молекулярна маса, кДа	Відносний рівень, %	Молекулярна маса, кДа	Відносний рівень, %
0	1	230	22,23	60	8,30
	2	163	2,59	52	11,81
	3	138	4,05	42	37,42
	4	94	5,45	33	11,53
	5	83	3,86	18	30,94
	6	76	4,18	-	-
	7	66	3,13	-	-
	8	59	4,31	-	-
	9	46	8,88	-	-
	10	34	5,97	-	-
	11	29	6,05	-	-
	12	26	5,90	-	-
	13	24	6,64	-	-
	14	22	5,97	-	-
	15	18	10,80	-	-
10 ± 3	1	317	5,14	53	14,81
	2	222	34,85	42	22,62
	3	134	4,79	34	25,35
	4	71	11,42	25	10,42
	5	60	4,68	24	10,91
	6	57	4,58	20	15,88
	7	44	13,27	-	-
	8	24	6,85	-	-
	9	23	5,47	-	-
	10	20	8,96	-	-
55 ± 5	1	300	2,17	113	2,24
	2	230	29,75	64	3,06

Продовження табл. 5.4

	3	168	2,14	59	3,38
	4	135	3,82	55	10,96
	5	74	8,38	47	5,72
	6	60	5,42	41	8,10
	7	57	4,84	35	17,65
	8	41	11,31	22	22,94
	9	26	5,13	18	18,98
	10	22	8,43	14	6,95
	11	17	4,92	-	-
	12	16	6,10	-	-
	13	14	7,60	-	-
75 ± 5	1	216	36,51	89	7,64
	2	124	12,69	74	12,18
	3	78	19,78	51	22,47
	4	38	9,18	37	12,24
	5	25	10,62	34	10,22
	6	22	11,22	30	35,25
125 ± 5	1	288	4,86	52	8,44
	2	239	29,29	49	10,90
	3	185	1,08	39	34,21
	4	172	2,38	19	46,46
	5	137	3,49	-	-
	6	74	5,72	-	-
	7	64	4,60	-	-
	8	57	4,07	-	-
	9	45	11,18	-	-
	10	38	7,79	-	-
	11	33	9,15	-	-
	12	25	5,88	-	-
	13	20	10,52	-	-
150 ± 5	1	274	3,30	59	5,24
	2	221	27,17	53	7,50
	3	164	2,24	43	24,55
	4	140	2,88	32	13,65
	5	79	8,92	23	49,05
	6	64	3,57	-	-

Продовження табл. 5.4

	7	57	3,80	-	-
	8	52	3,91	-	-
	9	46	2,57	-	-
	10	45	3,40		
	11	37	10,04	-	-
	12	29	5,34	-	-
	13	26	4,61	-	-
	14	25	5,07	-	-
	15	23	5,65	-	-
	16	20	7,54	-	-

Отже, аналіз фракції серинових протеїназ, очищеної з плазми крові донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2, методом електрофорезу у ПААГ за денатуруючих умов виявив присутність білків у широкому діапазоні молекулярних мас - від 230 кДа до 18 кДа, - причому найбільший відсоток припадав на білки з молекулярною масою біля 230 кДа. Оскільки серед серинових протеїназ, що присутні у плазмі крові як за фізіологічних умов, так і при різних патологічних станах, найвищу молекулярну масу має плазміноген (92 кДа), такі результати можна пояснити за рахунок формування комплексів плазміногену з іншими білками, а оскільки аналіз зразків проводили за денатуруючих умов, то це можуть бути лише комплекси, утворені ковалентними зв'язками. Відсутність білків з молекулярною масою вище 64 кДа та суттєве зростання відсотку білків, що відповідають молекулярній масі 64 кДа, 42 кДа і, особливо, 24 кДа, за обробки проби меркаптоетанолом є ще одним доказом на користь присутності в плазмі крові донорів ковалентних білкових комплексів.

Було встановлено, що фракції серинових протеїназ донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C) містили незначну кількість білків з молекулярною масою близько 317 кДа, які при проведенні електрофорезу за відновлювальних умов не візуалізувалися. У цілому порівняння результатів електрофорезу за відновлювальних та невідновлюваних умов переконливо доводить, що фракція

серинових протеїназ значною мірою складається з ковалентних білкових комплексів, адже за обробки проб меркаптоетанолом частина білкових смуг зникає, натомість з'являються білкові смуги іншої молекулярної маси або значно зростає відносний вміст білків, що виявлялися і за невідновлювальних умов. Задля виявлення присутності у складі фракцій серинових протеїназ активних ферментів було проведено аналіз методом ензим-електрофорезу з використанням як субстрату фібриногену. Результати обрахунку ензим-електрофореграм наведено на табл.5.5. Як бачимо, профіль активних ферментів у групі донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 включав ферменти з молекулярною масою 96 кДа, 85 кДа, 71 кДа, 58 кДа та 23 кДа. Подібний склад ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, було виявлено і для інших груп донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Лише у групах з титрами 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено додаткові зони гідролізу, що відповідають білкам з молекулярною масою 106 кДа. З огляду на молекулярну масу ферментів можемо припустити, що протеїназа з молекулярною масою 85 кДа є плазміном, кількісний вміст цієї протеїнази для всіх груп донорів, за виключенням групи з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C), знаходився у діапазоні 20-25 %.

Таблиця 5.5

Молекулярна маса та відносний рівень ферментів у складі фракцій серинових протеїназ, здатних до гідролізу фібриногену та желатину

Групи донорів, Індекс (S/C)	К-ть зон гідролізу	Ензим-електрофорез при використанні як субстрату			
		фібриногену		желатину	
		Молекулярна маса, кДа	Відносний рівень, %	Молекулярна маса, кДа	Відносний рівень, %
0	1	97	16,77	104	37,60
	2	85	29,96	101	25,96
	3	72	21,70	100	36,43
	4	58	31,57	-	-
10 ± 3	1	91	12,55	114	38,91
	2	83	26,66	106	61,09

Продовження табл. 5.5

	3	75	24,35	113	45,00
	4	59	36,44	106	55,00
	5	-	-	113	69,29
	6	-	-	106	30,71
55 ± 5	1	84	21,09	113	58,33
	2	75	26,59	107	41,67
	3	68	30,39	113	46,27
	4	57	21,93	106	53,73
	5	-	-	112	51,26
	6	-	-	106	48,74
75 ± 5	1	85	8,52	114	21,98
	2	75	12,56	109	16,77
	3	71	12,97	23	61,24
	4	45	25,24	-	-
	5	22	40,71	-	-
125 ± 5	1	108	9,50	115	48,76
	2	99	12,82	108	51,24
	3	87	25,76	-	-
	4	59	26,26	-	-
	5	23	25,65	-	-

За фізіологічних умов більшість серинових протеїназ функціонують у межах строго контрольованих біохімічних каскадів або локалізуються у певних органах чи клітинах, не демонструючи системної активності. Проте за умов хронічного запального процесу чи тривалого оксидативного стресу відбувається суттєва перебудова регуляторних механізмів, у результаті чого ці ферменти можуть вивільнятися у кровотік. Зокрема, активація нейтрофілів супроводжується вивільненням таких серинових протеїназ, як еластаза нейтрофілів, катепсин G та протеїназа-3 (PR3) – їх молекулярні маси знаходяться у діапазоні 28-30 кДа. Усі ці ферменти здатні розщеплювати білки позаклітинного матриксу, порушувати міжклітинні зв’язки, що призводить до підвищення проникності ендотелію, запуску вторинних прозапальних каскадів, тканинної деструкції, брати участь у деградації фібрину, особливо за умов патології, асоційованих з надмірним

запаленням, коагулопатіями або ушкодженням судин. Так, еластаза нейтрофілів, яка вивільняється активованими нейтрофілами під час запальної відповіді виявляє здатність до розщеплення фібрину, незалежно від плазмінового шляху [262,263].

Найімовірніше, що решта виявлених активних ферментів у складі фракцій серинових протеїназ є або деградованими формами серинових протеїназ, що зберегли активний центр, як, наприклад, легкий ланцюг плазміну (23-25 кДа) або є комплексами цих фрагментів чи повнорозмірних молекул з іншими білками. Накопичення таких модифікованих молекул, що виявляють ферментативну активність свідчить про формування пролонгованої, деструктивно спрямованої протеолітичної відповіді, яка може бути як причиною, так і наслідком системних патологічних змін, зокрема у постковідний період.

Одним із чутливих біохімічних маркерів, що відображає функціональний стан системного гомеостазу, є концентрація загального білка у плазмі крові. Цей показник інтегрує вміст основних білкових компонентів - альбумінів, глобулінів та інших плазмових фракцій. У зв’язку з цим, наступним етапом дослідження стало визначення концентрації загального білка у плазмі крові донорів із різним титром антитіл проти SARS-CoV-2.

Відповідно до отриманих результатів (рис.5.7), у донорів з титрами антитіл 75 ± 5 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) спостерігалося зниження концентрації загального білка. Разом з тим, концентрація білка у плазмі крові донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 55 ± 5 Індекс (S/C) залишалась на рівні значень у групі донорів з нульовим титром антитіл та зростала у донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C).

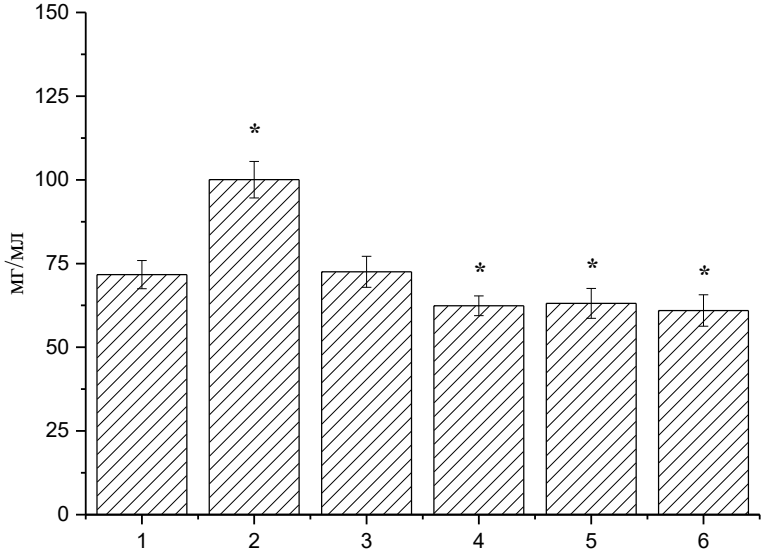


Рис. 5.7. Концентрація загального білка у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Можемо припустити, що зниження концентрації білка у плазмі крові є не лише наслідком розщеплення циркулюючих у кровотоці білків внаслідок активації протеолітичних реакцій, опосередкованих як сериновими, так і металозалежними протеїназами, а й певною мірою може бути обумовлене порушенням білоксинтетичної функції печінки, що детально описано нами у роботі [264].

Зауважимо, що зниження концентрації білка не завжди корелює з односпрямованим зниженням вмісту усіх білкових фракцій. У нашому дослідженні було виявлено підвищення рівня таких білків як фібриноген, трансферин і феритин [265], а також вмісту ММП і серинових протеїназ, що типово для стану хронічного запалення або субклінічного дистресу.

Зниження концентрації загального білка у плазмі крові донорів на тлі підвищення рівня вище перерахованих білків частково може бути наслідком

зниження концентрації альбуміну - одного з кількісно домінуючих білків плазми крові, що формує до 60% загальної маси білка у плазмі. Зменшення рівня альбуміну має подвійне патофізіологічне значення: по-перше, веде до зниження колоїдно-осмотичного тиску, що може сприяти утворенню інтерстиціальних набряків; по-друге, порушує детоксикаційну функцію крові, оскільки альбумін є ключовим переносником ендогенних і екзогенних речовин, включно з токсинами, гормонами, жирними кислотами та медикаментами.

Накопичені клінічні дані свідчать про наявність гіпоальбумінемії у пацієнтів із COVID-19, особливо у випадках середньої та тяжкої форм захворювання, що пов'язано з порушенням синтетичної функції печінки, системним запаленням та підвищеною судинною проникністю [266]. Враховуючи ці дані, можна припустити, що зниження концентрації альбуміну може зберігатися і у постковідний період, на що опосередковано вказують отримані нами результати досліджень біохімічних параметрів функціонального стану печінки у донорів за наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці.

З огляду на вищезазначене, можна припустити, що виявлені нами зміни концентрації білка та окремих білкових фракцій у плазмі крові у постковідний період відіграють певну роль у формуванні неспецифічної, але стійкої клінічної симптоматики, притаманної постковідному синдрому - включно з хронічною втомою, когнітивною дисфункцією, периферичними набряками та зниженням толерантності до фізичних навантажень. Альбумін, як відомо, також модулює окисно-відновний баланс, тому його дефіцит може потенціювати оксидативний стрес, що є відомим механізмом ушкодження при SARS-CoV-2-індукованій патології.

Одним з наслідків неконтрольованої активізації протеолітичних процесів може бути утворенням та накопичення в тканинах та/чи біологічних рідинах організму білкових фрагментів різного ступеня деградації, включаючи низькомолекулярні пептиди, які формують пептидні пули тканин.

З огляду на отримані нами дані про підвищення активності як ММП, так і серинових протеїназ у плазмі крові донорів із різним рівнем титрів антитіл до

SARS-CoV-2, на наступному етапі дослідження з плазми крові донорів було очищено фракцію пептидів та визначено їх концентрацію, а також проаналізовано склад пептидної фракції за молекулярною масою.

Дослідження пептидних пулів набуває особливої актуальності у контексті сучасного розуміння їх функціональної значущості. Сьогодні пептидні пули більше не розглядаються як сукупність інертних молекул, що підлягають швидкій елімінації. Натомість кожен орган має свій унікальний спектр пептидних молекул, який не лише відображає його метаболічну активність, а й бере участь у підтриманні локального гомеостазу. Пептидні пули виступають посередниками міжклітинної комунікації та виконують регуляторну роль, модулюючи внутрішньоклітинні процеси у відповідь на зміни метаболічного середовища. Разом із тим, пептидні пули є чутливими маркерами, що відображають динаміку катаболічних і репаративних процесів в організмі [267]. Їхній якісний та кількісний склад демонструє високу варіабельність залежно від функціонального стану тканин і органів, наявності запального процесу, тканинного ушкодження, оксидативного стресу або патологічного ремоделювання міжклітинного матриксу. Така мінливість робить пептидні профілі перспективними об’єктами для оцінки системної відповіді організму на патологічні процеси.

Для того щоб проаналізувати чи змінюється якісно-кількісний склад пептидому плазми нами було отримано з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 фракцію середньомолекулярних метаболітів (СММ). До складу фракції середньомолекулярних метаболітів входять сполуки різної хімічної природи з молекулярною масою у діапазоні від 500 до 5000 дальтон. Це альдегіди, кетони, поліспирти, карбонові та жирні кислоти, олігосахариди, аміноцукри, глюкуронові кислоти, фосфоліпіди і їхні похідні, деякі вітаміни, а також пептидні молекули.

Концентрацію пептидів у складі фракції СММ визначали за довжини хвилі 210 нм. Згідно з отриманими результатами (рис.5.8), достовірних відмінностей у рівнях пептидів для донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 виявлено не було.

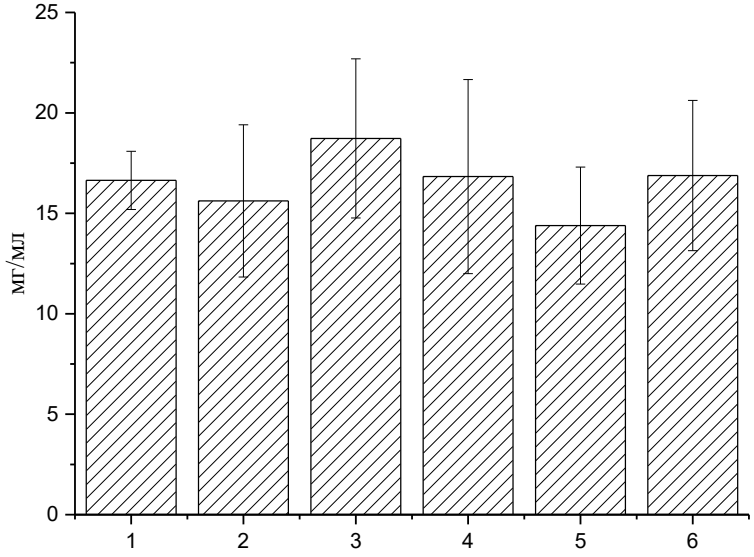


Рис. 5.8. Концентрація пептидів у складі фракції середньомолекулярних метаболітів, отриманої з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Такі результати можуть свідчити про відсутність гострого запального процесу або гострого протеолітичного спалаху в постковідний період, оскільки саме пептидний пул плазми крові розглядається як інтегральний показник протеолітичного статусу організму, що відображає протеолітичну активність не лише у плазмі, а й у тканинах та органах. Пептиди можуть надходити у кровотік за різних умов: у процесі тканинного ремоделювання, загибелі клітин (апоптозу або некрозу), гострої або хронічної інфекції, гіпоксії, або внаслідок активації ферментативних каскадів (наприклад, комплементу, коагуляції, фібринолізу). Водночас склад циркулюючого пептидного пулу залежить і від ефективності системи зв'язування та кліренсу, зокрема білків-переносників (альбуміну, α_2-макроглобуліну), а також механізмів ниркової фільтрації. Таким чином, плазмовий пептидний профіль акумулює сигнали з різних органів та тканин, і

зростання його концентрації у плазмі крові є однозначним свідченням гострих порушень.

Зазначимо, що за хронічних або компенсованих станів, загальна концентрація пептидів у плазмі може залишатися відносно стабільною, незважаючи на суттєві порушення у протеолітичному профілі. У таких випадках зміни носять переважно якісний характер - змінюється спектр та співвідношення окремих пептидів, з'являються нетипові або частково деградовані фрагменти білків, які можуть бути індикаторами локальної активації специфічних ферментів, наявності фіброзу, тканинної гіпоксії або сповільненого загоєння.

Отже, комплексна оцінка пептидного пулу не може обмежуватися лише кількісними показниками. Важливим є аналіз якісного складу пептидів, що дозволяє виявити тонкі молекулярні зсуви, які не завжди супроводжуються очевидною клінічною симптоматикою, але можуть бути ранніми маркерами патологічного ремоделювання або неефективної репарації тканин. Тому нами було проведено аналіз отриманих фракцій методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Отримані результати свідчать про перерозподіл пептидів різної молекулярної маси у плазмі крові донорів, що містять антитіла проти SARS-CoV-2 (рис.5.9) у порівнянні з групою донорів з нульовим титром антитіл.

Зокрема, у всіх групах донорів з титрами антитіл до SARS-CoV-2 вище за 10 ± 3 Індекс (S/C) було виявлено більшу кількість хроматографічних піків порівняно з групою донорів з нульовим титром антитіл. Крім того, встановлено, що всі групи донорів характеризувалися появою піків, що відповідають пептидам з молекулярною масою менше 920 Да та понад 1530 Да, які були відсутні у групі донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2.

Зважаючи на виявлені нами зміни вмісту та активності ММП у плазми крові донорів, які перенесли COVID-19, можна припустити, що значна частина цих пептидів є продуктами катаболізму білків. Водночас не виключено, що деякі з утворених пептидів синтезуються шляхом прямої трансляції коротких мРНК-послідовностей [15].

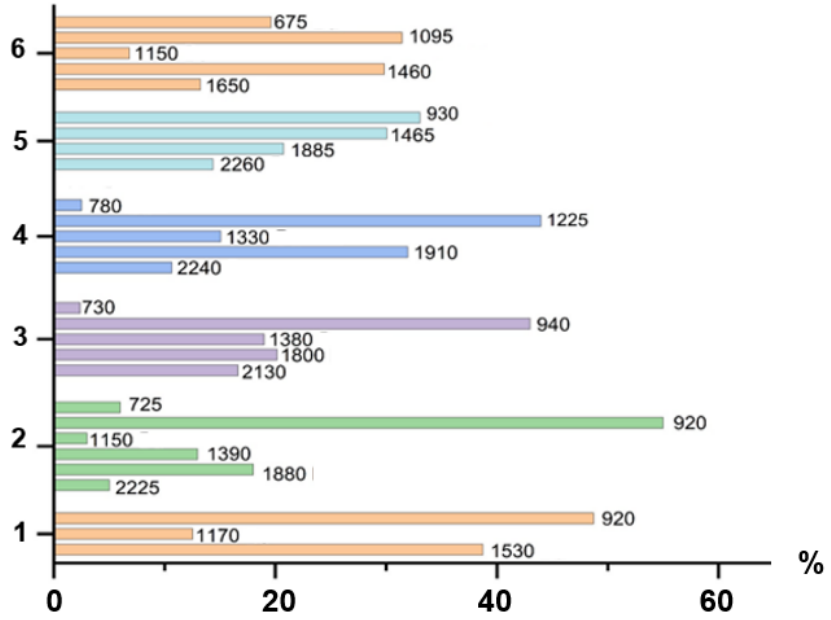


Рис. 5.9. Молекулярна маса (Да) та відносний вміст пептидів різної молекулярної маси у донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Оскільки пептиди мають широкий спектр біологічної активності, зокрема здатні впливати на клітинну сигналізацію як внутрішньо-, так і позаклітинно, не виключено, що такі нетипові пептиди утворюються у відповідь на зміну гомеостазу і спрямовані на виконання певних функцій - як тригери патологічних процесів або як модулятори, що беруть участь у підтриманні гомеостазу.

Оскільки, як вже зазначалося вище, до складу фракції СММ окрім пептидів входять і інші низькомолекулярні метаболіти, нами було проведено спектрофотометричний аналіз фракцій СММ, отриманих з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, за довжин хвилі 254 нм та 238 нм, що дозволяє оцінити внесок інших молекул.

Було виявлено підвищення поглинання за довжин хвиль 254 нм та 238 нм, що може вказувати на зростання концентрації сполук з ароматичними або кон’югованими структурами, а також метаболітів, які є продуктами оксидативного або ферментативного розщеплення макромолекул. Найбільш виражене зростання вмісту молекул, що детектуються за довжини хвилі 254 нм,

було виявлено у групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 55 ± 5 IgG Індекс (S/C) та 150 ± 5 IgG Індекс (S/C) - відповідно у 2,48 рази та 3,14 рази (рис.5.10).

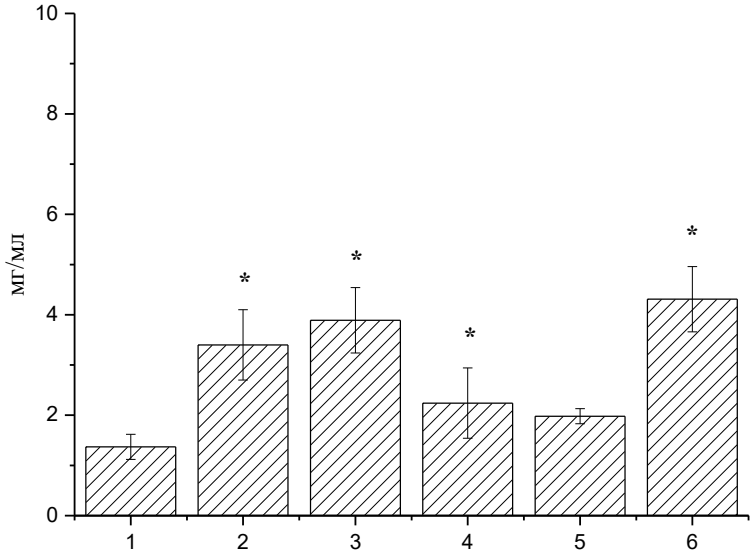


Рис. 5.10. Концентрація молекул, що детектуються при 254 нм, у складі фракції середньомолекулярних метаболітів, отриманої з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Частково це може бути обумовлено присутністю у складі фракції середньомолекулярних метаболітів молекул, що містять ароматичні амінокислоти – триптофан, тирозин, фенілаланін. У плазмі крові до білків, що збагачені на ароматичні амінокислоти, належать альбумін, гаптоглобін, трансферин, а також церулоплазмін та протромбін. Протеолітичне розщеплення цих білків може впливати на транспортні та регуляторні властивості плазми, а відтак слугувати підґрунтям для мультисистемних проявів постковідного синдрому.

Наслідком розщеплення альбуміну, як основного транспортного білка у плазмі крові для низькомолекулярних сполук та головного регулятора

онкотичного тиску, може бути порушення фармакокінетики багатьох препаратів, зниження антиоксидантної ємності плазми, збільшення вмісту вільних іонів металів (зокрема Fe^{2+}, Cu^{2+}), а також розвиток гіпоонкотичних набряків. Крім того, продукти фрагментації альбуміну можуть набувати прооксидантних або прозапальних властивостей [268].

Розщеплення гаптоглобіну та церулоплазміну може сприяти підтриманню низькоінтенсивного оксидативного стресу і, як наслідок, призводити до ушкодження ендотелію, інтенсифікації запального процесу та підвищенню ризику тромбозу. Особливо критичною така ситуація є в умовах внутрішньосудинного гемолізу.

Оскільки до білків, що характеризуються достатньо високим вмістом ароматичних амінокислот (близько 8 %), належить і протромбін, не виключено, що зростання вмісту пептидів, що містять залишки ароматичних амінокислот і детектуються при 254 нм, частково пов'язано з розщепленням протромбіну. Таке припущення узгоджується з результатами, описаними у розділі 3 - найвищий вміст таких пептидів було виявлено у групах з найнижчим вмістом молекул протромбінового походження, у той час як найвищий вміст протромбіну був у групі з найнижчим вмістом пептидів, що детектуються за довжини хвилі 254 нм.

Крім того, певний внесок у зростання поглинання при 254 нм можуть вносити пуринові основі, нуклеозиди, нуклеотиди, а також прозапальні фенольні метаболіти, які можуть з'являтися у кровотоці внаслідок порушень у функціонуванні печінки, зокрема її детоксикаційної функції.

Найвище поглинання при довжині хвилі 238 нм спостерігалося у тих групах донорів для яких було встановлено найбільш виражене поглинання й при 254 нм. Це групи донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 55 ± 5 IgG Індекс (S/C) та 150 ± 5 IgG Індекс (S/C) - рівень молекул, що детектуються при 238 нм, був, відповідно, вищим вдвічі та у 2,48 рази та 2,17 рази у порівнянні з показником у групі донорів з нульовим титром антитіл (рис.5.11).

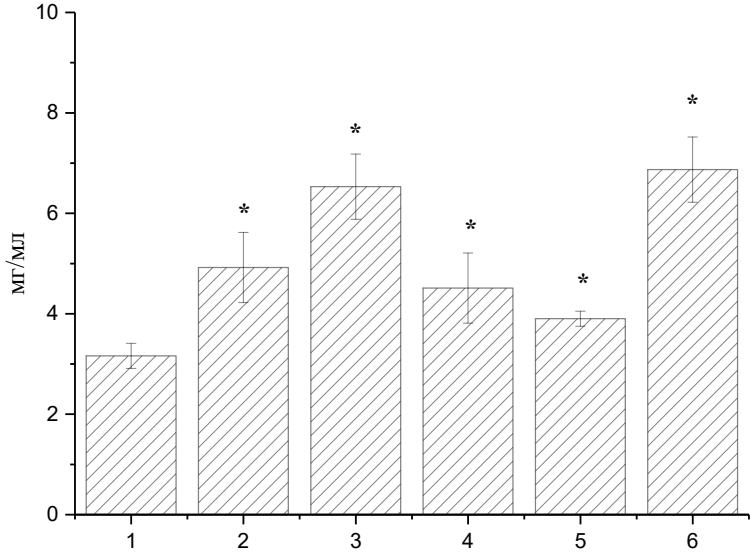


Рис. 5.11. Концентрація молекул, що детектуються при 238 нм, у складі фракції середньомолекулярних метаболітів, отриманої з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Оскільки зростання у плазмі крові рівня окремих СММ може бути непрямим свідченням порушення у роботі нирок та/чи печінки, нами було проаналізовано деякі маркери, які дозволяють оцінити функціональний стан цих органів. У літературі є дані, які підтверджують, що постковідний синдром значною мірою асоційований з тривалими змінами у функції нирок, зокрема зі зниженням швидкості клубочкової фільтрації та ризиком розвитку хронічної хвороби нирок [269,270], що для деяких осіб може бути віддаленим наслідком гіперзапальної відповіді під час гострої фази ковідної інфекції або бути результатом порушення кровопостачання нирок внаслідок розвитку ендотеліальної дисфункції чи ішемії ниркової тканини через утворення мікротромбів [271].

Нами не було виявлено зростання концентрації таких метаболітів як креатинін та сечова кислота у плазмі крові донорів з різними титрами анти-

SARS-CoV-2 IgG за виключенням групи з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C). Так, концентрація креатиніну була у 1,4 рази вищою за показник у групі донорів з нульовим титром антитіл, а концентрація сечової кислоти зростала у 1,1 рази. У цій же групі донорів було виявлено і найвищу концентрацію сечовини (рис.5.12).

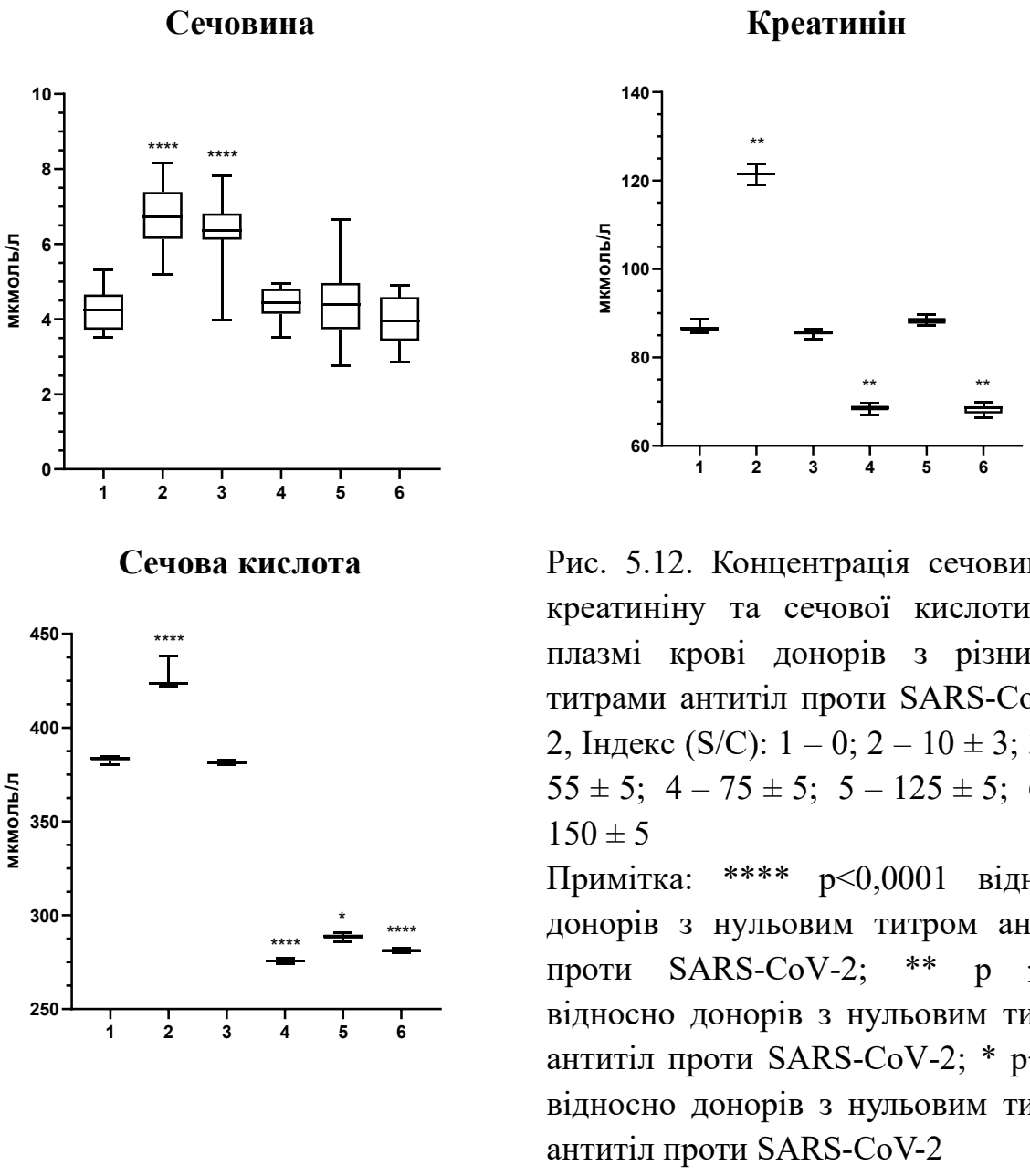


Рис. 5.12. Концентрація сечовини, креатиніну та сечової кислоти у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * p<0,05 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

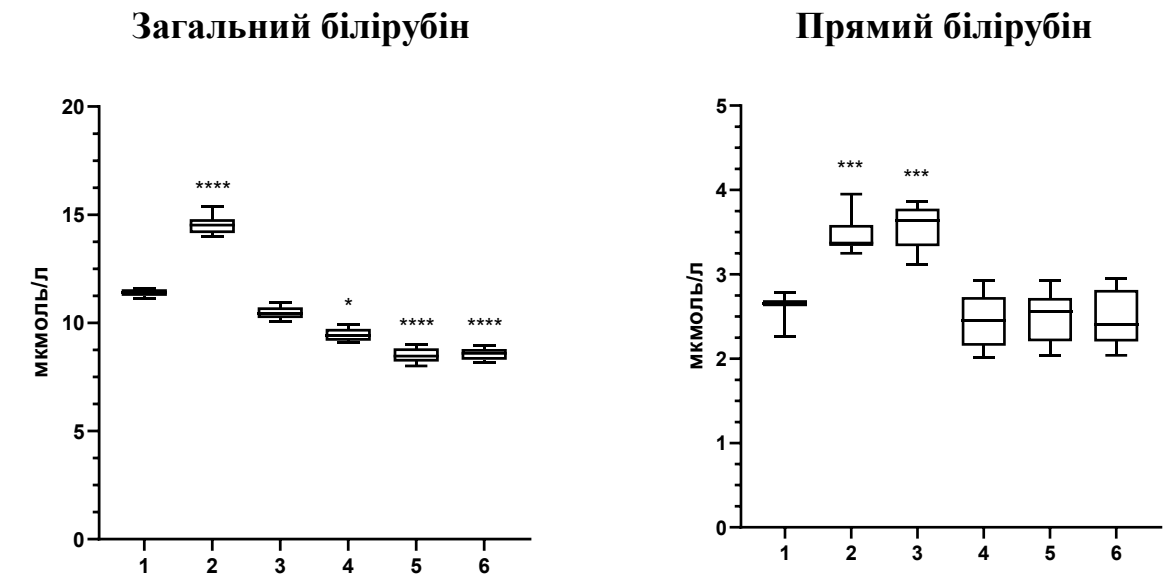
Отже, отримані нами результати не дозволяють зробити висновок про розвиток ниркової дисфункції у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у постковідний період. Певне порушення у функціонуванні нирок має

місце лише у групі донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), про що додатково свідчить виявлене нами суттєве зростання активності панкреатичної амілази.

З огляду на роль печінки як центрального органу метаболічної детоксикації, її дисфункція супроводжується порушенням обміну СММ, що призводить до їх накопичення в системному кровотоці. Тому нами було проаналізовано вміст білірубіну (загальний, прямий та непрямий білірубін), який слугує чутливим маркером функціонального стану гепатобіліарної системи, зокрема здатності печінки до кон'югації та екскреції метаболітів.

Зростання вмісту загального білірубіну, прямого та непрямого білірубіну було виявлено лише у групі донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C) (рис.5.13). Такі зміни відображають порушення декількох ключових функцій печінки: від кон'югації токсичних ліпофільних речовин (непрямий білірубін), до виведення гідрофільних метаболітів (прямий білірубін) та загального зниження метаболічної спроможності органа. Крім того, подібна динаміка може бути раннім індикатором холестатичних розладів або вторинного ушкодження ендотелію жовчовивідних шляхів, зумовленого персистуючим запаленням або імунною активацією.

У решті груп донорів всі досліджувані показники (за виключенням вмісту прямого білірубіну у плазмі крові донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) знижувалися у порівнянні з результатами у групі донорів з нульовим титром антитіл. Варто зазначити, що зниження вмісту загального, прямого і непрямого білірубіну може бути опосередкованим маркером печінкової гіпофункції, зниження інтенсивності обміну гемоглобіну або виснаження антиоксидантної системи організму. У контексті постковідного синдрому це може вказувати на субклінічну декомпенсацію метаболічних і детоксикаційних процесів.



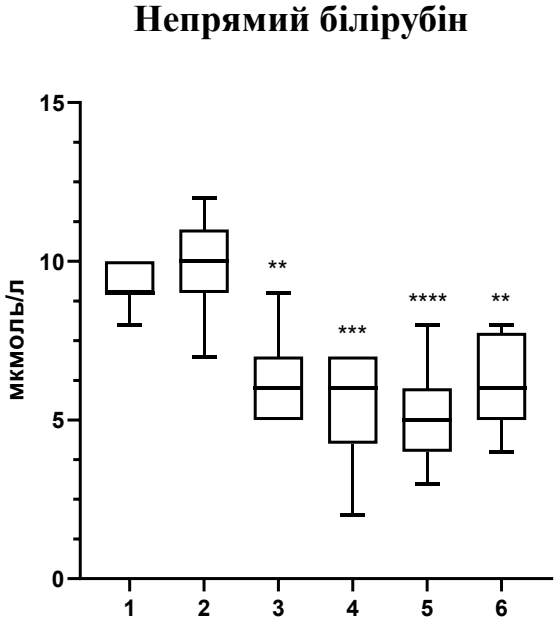


Рис. 5.13. Білірубіновий профіль у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** $p \leq0,01$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Отже, зміни якісного складу фракції середньомолекулярних метаболітів, зокрема пептидної складової, пов’язані переважно зі змінами протеолітичного профілю плазми крові донорів з різними титрами антитіл.

Підсумовуючи отримані результати можемо зробити висновок, що для донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 характерними є суттєві зміни вмісту та активності як серинових протеїназ, так і ММП у плазмі крові. Для більшості груп донорів виявлено зростання концентрації серинових протеїназ, що свідчить про активацію системного протеолізу навіть у відсутність

гострої фази захворювання. Одночасно спостерігалося порушення балансу між ММП та їх ендогенним інгібітором ТІМП-1, зокрема за рахунок переважання протеолітичної активності, що підтверджується зростанням коефіцієнта ММП-9/ТІМП-1 у деяких груп донорів з антитілами проти SARS-CoV-2. Профіль ферментів, що розщеплюють фібриноген, включав ензими з молекулярною масою у діапазоні 23–96 кДа, з виразними відмінностями для груп донорів з високими титрами антитіл, де з'являлися додаткові зони гідролізу (106 кДа). Зростання вмісту пептидів, що містять ароматичні амінокислоти, навіть за відсутності змін у загальній концентрації пептидів, опосередковано вказує на протеоліз білків, у тому числі альбуміну, гаптоглобіну та протромбіну, потенційно залучених до регуляції оксидативного стресу та гемостазу. На основі отриманих результатів можемо висунути гіпотезу щодо існування кореляції між ступенем порушення протеолітичного балансу та рівнем антитіл до SARS-CoV-2. Все більше наукових даних свідчить про накопичення у постковідний період як антитіл проти SARS-CoV-2, так і аутоантитіл, що може бути наслідком дестабілізації імунної системи в результаті надмірної імунної відповіді на збудник інфекції [272,273]. Є дослідження, що описують появу аутоантитіл до ММП при різних патологіях, зокрема при системній склеродермії, злоякісних новоутвореннях та артриті [274-278]. Виходячи з цього, можна припустити, що залежно від характеру циркуляції антитіл у крові, у постковідний період може виникати дестабілізація протеолітичних процесів. Ми вважаємо, що всі виявлені порушення можуть мати спільну імунологічну природу, пов'язану з впливом певних субпопуляцій антитіл. Хоча наразі ми не можемо безпосередньо підтвердити зв'язок між титрами IgG проти SARS-CoV-2 та ступенем протеолітичного дисбалансу, подальші дослідження із застосуванням очищених фракцій IgG, отриманих від донорів, що одужали після COVID-19, дозволять глибше зрозуміти механізми регуляції протеолізу та роль ММП у розвитку патологічних станів і прогресуванні захворювань.

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 5:

1. Halenova, T. I., Raksha, N. H., Vovk, T. B., **Karbovskyy, V. L.,** Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., Tomchuk, V. A., & Savchuk, O. M. (2024). Proteolytic imbalance in plasma of patients with multiple sclerosis following COVID-19. International Neurological Journal (Ukraine), 20(5), 222–227. **(Scopus Q4)**

2. Halenova, T., Rachkovska, A., Krenytska, D., Kostiuk, O., **Karbovskyy, V.,** Vovk, T., Raksha, N., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2024). Abnormal proteolytic activity profile in blood plasma of healthy volunteers depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. Journal of Biological Research, 97(2), Article 12567. https://doi.org/10.4081/jbr.2024.12567 **(Scopus Q4)**

3. Krenytska, D., Rachkovska, A., Savchuk, O., & **Karbovskyi, V.** (2023). Amylase concentration in donor groups depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 2(93), 18–21.

4. Галенова, Т., Калашнікова, М., **Карбовський, В.,** Шоломон, С., & Мельник, В. (2023). Біохімічні показники крові у хворих на розсіяний склероз, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(95), 13–19.

5. Креницька, Д., Рачковська, А., Павлівський, Ю., Чижик, Ю., & **Карбовський, В.** (2022). Біохімічні параметри печінки за наявності у кровотоці анти-SARS-CoV-2 IgG. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 1(88), 33–41.

6. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2022). Характеристика залізозалежних параметрів донорів за наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(91), 10–15.

7. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2022). Біохімічні параметри функціонування нирок у донорів за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(90), 45–52.

РОЗДІЛ 6
АНАЛІЗ ЗАПАЛЬНИХ ТА СТРЕС-АСОЦІЙОВАНИХ МАРКЕРІВ У ДОНОРІВ З РІЗНИМИ ТИТРАМИ АНТИТІЛ ПРОТИ SARS-CoV-2 У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД

Однією з провідних патогенетичних ланок під час гострої фази COVID-19 є цитокіновий шторм - масивне вивільнення прозапальних медіаторів, що сприяє генералізованому запаленню, ендотеліальній дисфункції та розвитку коагулопатій. Це явище вже достатньо вивчене у гострому періоді захворювання. Водночас, значно менше уваги приділено дослідженням стану мережі запально-регуляторних молекул у постковідний період, попри наявність стійкої клінічної симптоматики, характерної для синдрому тривалого COVID (втома, когнітивні порушення, постнавантажувальна слабкість, біль у м'язах та суглобах), які можуть бути опосередковані запальними механізмами [279,280]. Хоча об'єктивні біомаркери запалення часто відсутні або не специфічні, існує зростаюча кількість доказів, що підтримують участь імунної дисрегуляції та нейрозапалення в патогенезі постковідних ускладнень.

У попередніх розділах дисертаційної роботи було описано порушення у системі гемостазу, а також активацію протеолізу у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Відомо, що обидва ці процеси тісно пов’язані з хронічною низькорівневою запальною відповіддю, яка може зберігатися тривалий час після елімінації вірусу та закінчення гострого періоду хвороби.

Взаємозв’язок між системою гемостазу та запаленням є двонаправленим: за запального процесу відбувається активація коагуляційного гемостазу, а фактори системи гемостазу, у свою чергу, модулюють запальний процес. Під впливом прозапальних цитокінів, зокрема IL-1β, IL-6 та TNF-α, на поверхні ендотеліальних клітин і моноцитів активується експресія тканинного фактору - основного ініціатора зовнішнього шляху коагуляції, що запускає каскад утворення тромбіну. Одночасно запалення призводить до зниження активності

природних антикоагулянтних механізмів, таких як антитромбін, протеїн С та тромбомодулін, а також до пригнічення фібринолізу шляхом підвищення рівня ПАІ-1. Комплекс цих змін зумовлює розвиток гіперкоагуляційного стану, який за умови тривалого або надмірного прогресування призводить до формування мікросудинних тромбозів і поглиблення тканинної гіпоксії.

У свою чергу тромбін, що утворюється в процесі активації коагуляційного каскаду, не лише каталізує перетворення фібриноген на фібрин, але й виступає як сигнальна молекула, активуючи PAR-рецептори (protease-activated receptors) на поверхні ендотеліальних та імунокомпетентних клітин. Це стимулює секрецію прозапальних цитокінів, посилює адгезію лейкоцитів, сприяє вазодилатації та посиленню локальної запальної відповіді. Додатково, фібриноген і продукти його деградації функціонують як "молекулярні патерни ушкодження" (DAMPs), що ініціюють активацію вродженого імунітету. Тромбоцити, у свою чергу, вивільняють ряд прозапальних медіаторів, зокрема IL-1β, CD40L, RANTES, і активно взаємодіють з лейкоцитами, посилюючи як локальне, так і системне запалення. У разі порушення регуляції цих процесів формується запально-індукована тромботична мікроангіопатія, характерна, зокрема, для тяжких форм COVID-19 та його постінфекційних ускладнень.

Таким чином, доцільним є дослідити вміст маркерів запалення та стрес-асоційованих факторів у постковідний період, задля з’ясування їх внеску у патогенез постковідних ускладнень.

Для початку нами було проаналізовано цитокіновий профіль у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, зокрема досліджено вміст ключових про- (IL-6, IL-8, IL-1 β, IL-12 β, TNF-α) та протизапальних (IL-4, IL-10) цитокінів (рис.6.1).

Отримані результати свідчать про існування певного дисбалансу вмісту цитокінів, причому виявлені зміни не були однотипними, а різнилися залежно від групи донорів. Так, у групі донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C) було виявлено зростання вмісту всіх досліджуваних цитокінів за виключенням IL-12β, вміст якого знижувався. Зазначимо, що зростання вмісту

цього цитокіну спостерігалося лише для донорів з титром антитіл 55 ± 5 Індекс (S/C).

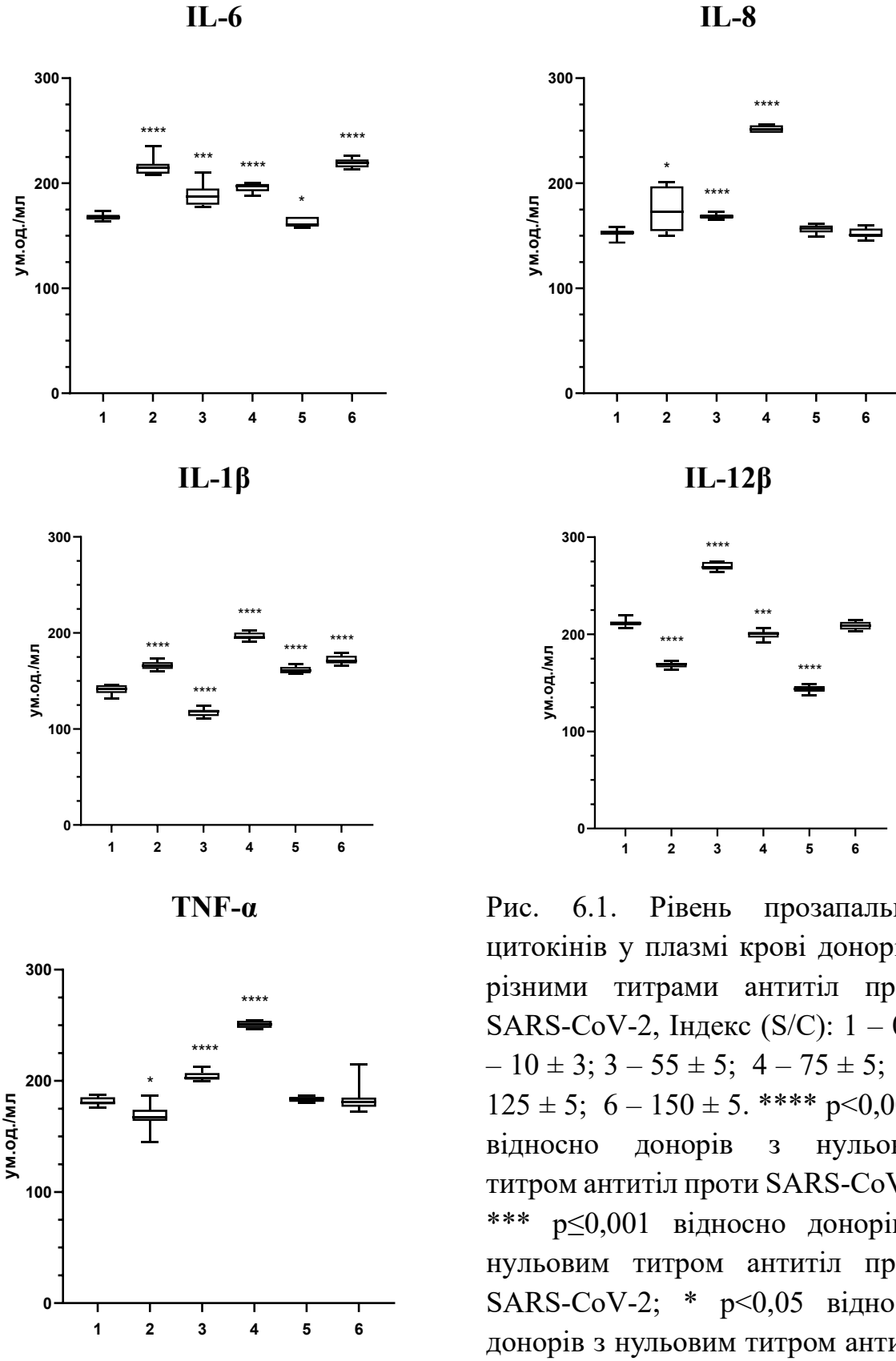


Рис. 6.1. Рівень прозапальних цитокінів у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5. **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Звертає на увагу факт зростання вмісту IL-6, який є одним із ключових прозапальних цитокінів, що відіграє центральну роль у взаємодії між імунною відповіддю та системою гемостазу. Нами показано зростання вмісту IL-6 у всіх групах донорів, окрім групи з титром антитіл проти SARS-CoV-2 125 ± 5 Індекс (S/C). Найбільш виражені зміни спостерігалися для донорів з титрами антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) - відповідно у 1,26 та 1,3 рази. Те, що вміст IL-6 підвищений у донорів у постковідний період, може свідчити про збереження хронічного низькорівневого запалення.

Відповідно до літератури, IL-6 здатен впливати на кілька ключових компонентів системи гемостазу, включаючи фактори коагуляційного каскаду, фібриногенез і тромбоцитарну активацію. На рівні судинного ендотелію IL-6 індукує експресію тканинного фактора - основного тригера зовнішнього шляху коагуляції [281]. Це запускає активацію каскаду згортання крові, утворення тромбіну та формування фібринового згустку. Паралельно IL-6 стимулює синтез фібриногену в печінці, тим самим підвищуючи плазмову коагуляційну активність [282]. Крім того, IL-6 сприяє пригніченню фізіологічного антикоагулянтного захисту, знижуючи експресію тромбомодулину на ендотелії та зменшуючи чутливість до протеїну С. Також цей цитокін опосередковано інгібує фібриноліз шляхом підвищення рівнів ПАІ-1 [283].

Також нами було виявлено зростання рівня ще одного потужного медіатора запалення - IL-1β у всіх групах донорів за виключенням групи з титром антитіл проти SARS-CoV-2 55 ± 5 Індекс (S/C). Оскільки цей цитокін не експресується конститутивно, зростання його вмісту у плазмі крові свідчить насамперед про персистуючий запальний процес - як локальний, так і системний. Він синтезується переважно активованими моноцитами, макрофагами та клітинами ендотелію у відповідь на пошкодження або інфекцію. У контексті гемостазу IL-1β виступає як ключовий медіатор коагуляційного зсуву в напрямку гіперкоагуляції. Один із головних ефектів IL-1β - індукція експресії тканинного фактора на ендотеліальних клітинах, моноцитах та фібробластах, що активує зовнішній шлях згортання крові. Додатково, IL-1β сприяє вивільненню

адгезійних молекул (Е-селектин, ICAM-1), що полегшують адгезію лейкоцитів до ендотелію та підтримують лейкоцитарно-тромбоцитарну кооперацію, яка відіграє вирішальну роль у мікросудинному тромбоутворенні. Також цей цитокін стимулює продукцію ПАІ-1, що інгібує фібриноліз, поглиблюючи гіперкоагуляційний стан. Зростання його вмісту часто спостерігається при аутоімунних захворюваннях (ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, псоріатичний артрит), а відтак може бути опосередкованим маркером розвитку аутоімунних реакцій у донорів у постковідний період. Таким чином, IL-1β є ключовим цитокіном, що замикає патофізіологічне коло "запалення-гемостаз".

На користь гіпотези про збереження запального процесу у віддалені терміни після перенесеного COVID-19 свідчить зростання вмісту IL-8, або CXCL8, який є хемоатрактантом для нейтрофілів, сприяючи їх рекрутуванню до місць запалення. Оскільки зростання його вмісту було виявлено у плазмі крові, це може вказувати як на системний запальний процес, так і на локальний на рівні ендотеліальних клітин. Підвищений рівень IL-8 асоціюється з активацією ендотелію, стимуляцією адгезійних молекул (ICAM-1, VCAM-1) та посиленням трансендотеліальної міграції лейкоцитів. Це створює прозапальне мікросередовище, в якому значно підвищується ризик локальної коагуляції. Крім того, IL-8 індукує дегрануляцію нейтрофілів із вивільненням протеаз і нейтрофільних позаклітинних пасток, що є потужним тригером тромбоутворення, зокрема в мікросудинному руслі. Також відомо, що IL-8 здатен модифікувати активність тромбоцитів, посилюючи їхню агрегацію та сприяючи утворенню лейкоцитарно-тромбоцитарних агрегатів, що відіграють ключову роль у запально-індукованій мікроангіопатії.

З-поміж досліджуваних цитокінів, найменш виражені зміни вмісту було виявлено для IL-12β – його рівень зростав лише у групі донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 55 ± 5 Індекс (S/C) (у 1,27 рази), знижувався у донорів з титрами 10 ± 3 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C) та залишався на рівні показника у групі донорів з нульовим титром антитіл.

Незважаючи на те, що IL-12β може брати участь у регуляції активності окремих факторів системи гемостазу [284], його вплив є помірним і переважно непрямим, головним чином через стимуляцію інших прозапальних цитокінів (наприклад, IFN-γ) [285].

Також нами встановлено зміни вмісту деяких протизапальних цитокінів, зокрема зростання рівня основного протизапального цитокіна IL-10 у всіх групах донорів за виключенням групи донорів з титром анти SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) та зростання рівня IL-4 у донорів з титрами антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C) і 150 ± 5 Індекс (S/C).

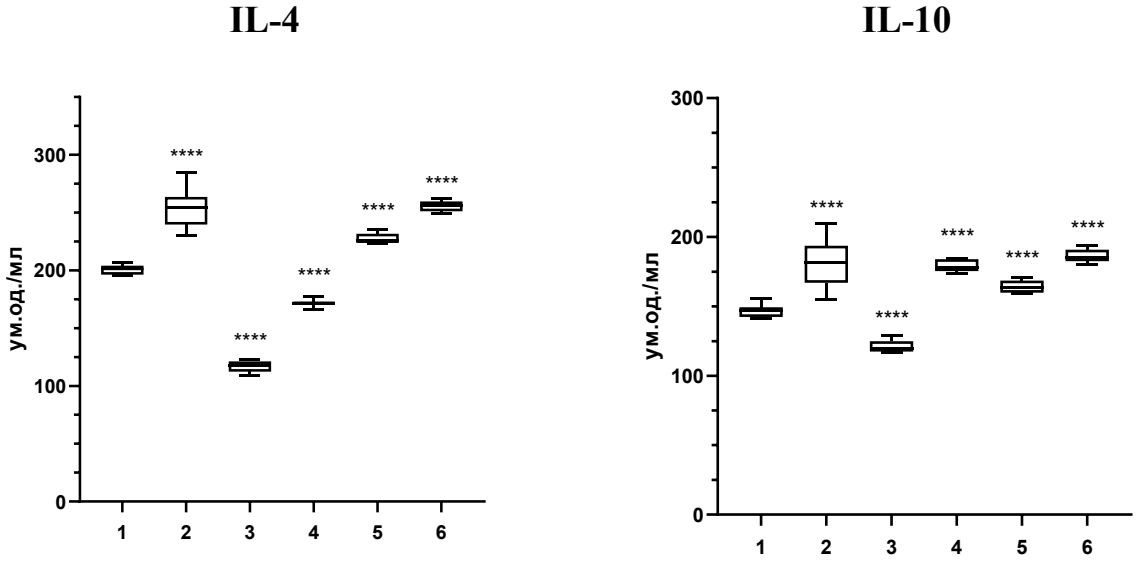


Рис. 6.2. Рівень деяких протизапальних цитокінів у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

У цілому, IL-10 та IL-4 відіграють двофазову роль у контролі запалення: спочатку - гальмуючи прозапальну відповідь, а згодом - активуючи регенеративну та ангіогенну відповідь. Вони є ключовими регуляторами балансу між пошкодженням та відновленням, а їх недостатність або дисфункція в умовах,

таких як постковідний синдром, може призводити до персистенції запалення та неповного відновлення тканин.

Одночасне зростання рівня прозапальних і протизапальних цитокінів є можна розглядати як прояв компенсаторної реакції організму і може вказувати на хронічний системний запальний процес, коли у відповідь на зростання продукції прозапальних цитокінів активується утворення протизапальних цитокінів. За нашими даними такий стан притаманний групі донорів з титром анти SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C).

Зниження рівня протизапальних цитокінів на тлі зростання прозапальних вказує на дисбаланс імунної регуляції в бік домінування запалення. Така картина спостерігалась у донорів з титром SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C). Крім того, зниження рівня IL-10 та IL-4 може призвести до порушення регенеративних процесів.

Дещо інша ситуація спостерігалася у донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 125 ± 5 Індекс (S/C) - зростання вмісту протизапальних цитокінів, зокрема IL-10, за відсутності підвищення рівня класичних прозапальних медіаторів (IL-6, TNF-α) може вказувати на активацію механізмів імунної толерантності або завершення гострої запальної фази. Зазначимо, що ситуація суттєво ускладнюється у випадку наявності хронічних захворювань, у тому числі й розсіяного склерозу (РС). Оскільки імунопатологія РС тісно пов’язана з дисбалансом між Th1- та Th2-ланками імунної відповіді, інфікування SARS-CoV-2 може суттєво впливати на перебіг цього захворювання. COVID-19 здатний посилювати вже наявні порушення імунної регуляції у хворих на РС, зумовлюючи надмірну активацію Th1-відповіді та гіпереекспресію прозапальних цитокінів (зокрема IL-1β, IL-6, TNF-α, IFN-γ) при одночасному зниженні рівнів протизапальних цитокінів (IL-4, IL-10) [286]. Такий зсув цитокінового балансу сприяє підсиленню автоімунного запалення, поглибленню демієлінізуючих процесів у центральній нервовій системі та, відповідно, погіршенню клінічного стану пацієнтів із РС у період або після перенесеної COVID-19-інфекції.

Також нами було розраховано коефіцієнт IL-6/IL-10, який є індикатором імунного балансу між основними прозапальними (IL-6) і протизапальними (IL-10) цитокінами. Цей показник активно використовується для оцінки тяжкості запального процесу, особливо в контексті COVID-19, сепсису, ARDS та аутоімунних хвороб.

Відповідно до отриманих результатів коефіцієнт IL-6/IL-10 становив 1,15 для донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; 1,17 – для донорів з титром антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C); 1,47 – для донорів з титром антитіл 55 ± 5 Індекс (S/C); 1,09 - для донорів з титром антитіл 75 ± 5 Індекс (S/C); 0,98 - для донорів з титром антитіл 125 ± 5 Індекс (S/C) та 1,17 - для донорів з титром антитіл 150 ± 5 Індекс (S/C). Значення коефіцієнту >1 вказує на запальний процес інтенсивність якого буде вищою при вищому значенні коефіцієнту; при коефіцієнті <1 домінує протизапальна відповідь, відновлення, або навіть імунна супресія; значення на рівні 1 свідчить про можливо фазу перехідного контролю або резолюції запалення.

Обраховані значення коефіцієнту IL-6/IL-10 у цілому узгоджуються з описаними вище станами, виявленими у окремих групах донорів, і свідчать про наявність певного запального процесу навіть у групі донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2.

Задля більш комплексної оцінки стану запалення у донорів з різними титрами антитіл SARS-CoV-2 було проаналізовано концентрацію С-реактивного білка (СРБ), який є класичним маркером гострої фази запалення, проте його підвищення не завжди однозначно свідчить лише про гостру реакцію. Рівень СРБ також може зростати при хронічних запаленнях, аутоімунних станах, метаболічному синдромі та неінфекційних захворюваннях.

Нами встановлено суттєве зростання концентрації СРБ у плазмі крові донорів усіх дослідних груп (рис.6.3), причому найвищий показник було виявлено у донорів (титр антитіл 55 ± 5 Індекс (S/C) для яких згідно значень коефіцієнту IL-6/IL-10 притаманний виражений запальний процес, а найнижче значення концентрації СРБ було у донорів (титр антитіл 125 ± 5 Індекс (S/C) для

яких за коефіцієнтом IL-6/IL-10 характерним є стан імунної толерантності чи відновлення. Оскільки IL-6 та меншою мірою IL-1β, TNF-α є головними індукторами синтезу СРБ у гепатоцитах [287] виявлене нами зростання рівня цього маркера може відбуватися у відповідь на підвищення рівнів прозапальних цитокінів і, перш за все, IL-6.

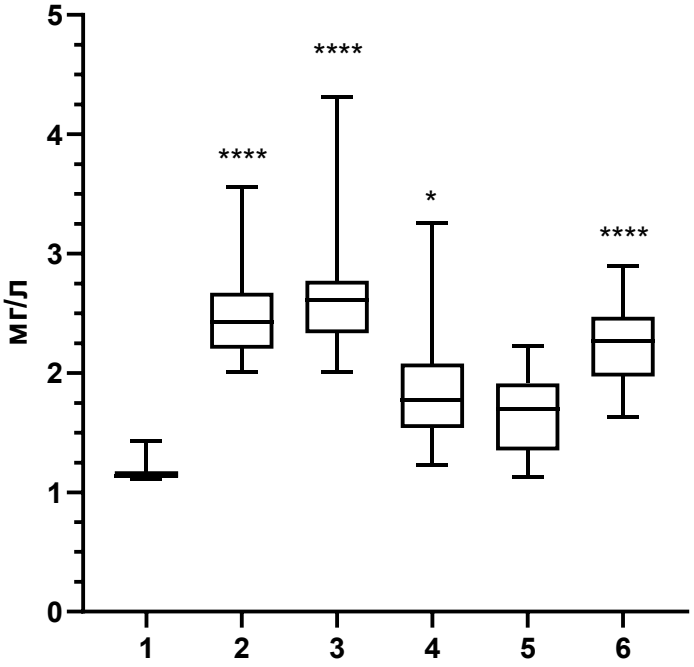


Рис. 6.3. Концентрація С-реактивного білка у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Зростання рівня СРБ є не лише індикатором наявності запального процесу, але й, подібно до прозапальних цитокінів, СРБ виконує роль ефекторної молекули, яка безпосередньо впливає на функціонування окремих компонентів системи гемостазу [288]. Зокрема, підвищений рівень СРБ асоціюється з активацією тромбоцитів, стимуляцією експресії тканинного фактору, пригніченням фібринолізу через пригнічення активності ТАП та, водночас,

стимуляцію синтезу ПАІ-1, а також з формуванням надміцних фібринових згустків незалежно від рівня фібриногену [289-291].

Усі ці ефекти сприяють збереженню протромботичного стану навіть після завершення гострої фази COVID-19, що є важливою патофізіологічною основою підвищеного ризику тромботичних ускладнень у постковідному періоді.

Отже, можна стверджувати, що вісь IL-6 → СРБ зберігає свою функціональну активність і в постковідному періоді, що свідчить про триваючий вплив прозапального мікросередовища на системні гомеостатичні механізми. Як наслідок, рівні прозапальних цитокінів, насамперед IL-6, залишаються достатніми для підтримки індукції синтезу С-реактивного білка в гепатоцитах, навіть за відсутності клінічних ознак гострого запалення.

Ще одним індикатором наявності запального процесу слугує феритин, вміст якого змінюється у залежності від стадії запалення. Феритин, окрім своєї основного ролі як фактору внутрішньоклітинного депонування заліза, є гострофазовим білком, експресія якого зростає у відповідь на зростання вмісту прозапальних цитокінів, зокрема IL-6, IL-1β, TNF-α. У гострих і хронічних запальних станах (інфекції, ревматоїдний артрит) вміст феритину може підвищуватися у десятки разів, слугуючи маркером системної активації імунної відповіді. Є дані, що підвищення його рівня тісно корелює з тяжкістю перебігу COVID-19, підвищеними рівнями цитокінів та ризиком органної дисфункції [292,293].

Тому задля отримання більш детальної інформації щодо механізмів, які можуть лежати в основі збереження запального процесу у осіб у віддалені терміни після перенесеного захворювання на COVID-19, нами було проаналізовано вміст феритину у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл до SARS-CoV-2.

Відповідно до отриманих результатів (рис.6.4), вміст феритину був суттєво підвищений у всіх досліджуваних групах донорів. Найбільш виражене зростання концентрації феритину спостерігалося у донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), найменш виражене - у донорів з титром антитіл 125 ±

5 Індекс (S/C), відповідно, у 5,48 рази та 1,81 рази порівняно з показником у групі донорів з нульовим титром антитіл.

Зростання вмісту феритину у цілому узгоджується з описаним вище зростанням у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл до SARS-CoV-2 вмісту прозапальних цитокінів. Однак феритин не є лише маркером запалення - він активно задіяний у підтриманні прозапальної відповіді, що передбачає залучення декількох механізмів.

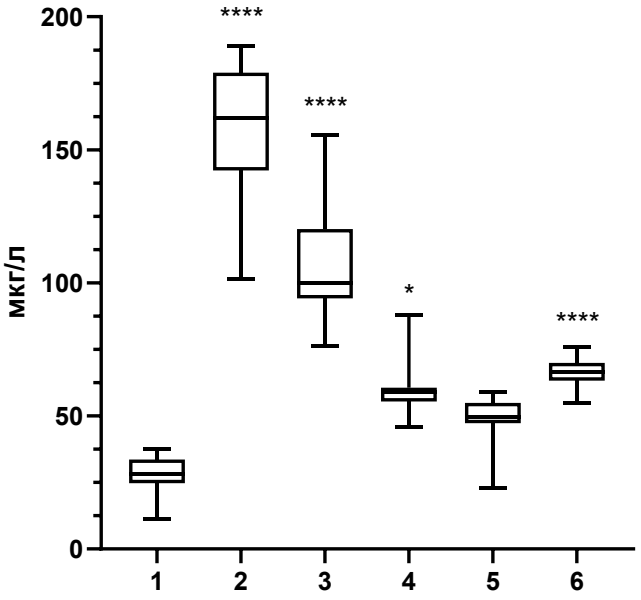


Рис. 6.4. Концентрація феритину у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Так, він може запускати каскад прозапальних реакцій, включаючи активацію інфламасом, утворення NETs та стимуляцію цитокінів. Є дані, що важкий ланцюг феритину здатен активувати інфламасому NLRP3 у печінкових зірчастих клітинах, стимулюючи у такий спосіб секрецію інтерлейкіну-1β (IL-1β) [31]. Автори припускають, що цей шлях вносить певний вклад у розвиток запалення

у печінці, яке викликає фіброгенез печінки та впливає на її функціональну активність. Крім того, в умовах сепсису високі рівні феритину стимулюють утворення NETs за участі рецептору MSR на нейтрофілах [294]. Це призводить до ушкодження легеневої тканини, посилюючи запальний процес та сприяючи формуванню системних порушень, притаманних пост ковідному синдрому.

З огляду на наведену в літературі інформацію щодо модуляції феритином імунної відповіді та його роль у патогенезі автоімунних захворювань [295,296] можемо припустити, що виявлене нами зростання вмісту феритину у плазмі крові донорів всіх досліджуваних груп може бути одним з чинників, що обумовлюють втрату імунної толерантності та розвиток аутоімунного процесу за ковідної інфекції. Серед аутоімунних захворювань, що асоційовані із гіперферитинемією, виділяють системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, РС та антифосфоліпідний синдром [297].

У межах запальної відповіді при COVID-19 особливе значення має дисбаланс обміну заліза, зумовлений гіперпродукцією прозапальних цитокінів, передусім IL-6. Поряд з феритином, ще одним важливим медіатором цього процесу є гепсидин, синтез якого активується IL-6 і який виконує регуляторну функцію шляхом інгібування феропортину - основного експортера заліза з клітини. Це призводить до накопичення заліза в макрофагах та інших клітинах), одночасно з підвищенням рівня феритину - білка депонування заліза і водночас гострофазового білка. Надмірне накопичення заліза в клітинах за умов оксидативного стресу призводить до появи "лабільного заліза" (LIP) - каталітично активної фракції Fe^{2+}, здатної ініціювати реакції Фентона з утворенням гідроксильного радикалу (•OH). Цей радикал є потужним індуктором пошкодження мембран, ДНК та білків, що стимулює вивільнення додаткових прозапальних цитокінів та активує NLRP3-інфламасому.

Відповідно до літератури [298,299] патогенез ковіду супроводжується порушенням обміну заліза - у пацієнтів із тяжкими формами захворювання спостерігається зниження рівнів сироваткового заліза, трансферину, загальної

залізозв’язувальної здатності крові (TIBC), тоді як рівні феритину різко зростають.

З метою комплексної характеристики стану залізозв’язувального гомеостазу у віддалені терміни після перенесеного COVID-19, було проведено визначення рівня трансферину - ключового білка-переносника заліза у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2.

Як бачимо з даних, наведених на рис.6.5, вміст трансферину був підвищеним у всіх групах. Найвищий вміст було виявлено у донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C) (у 1,43 рази) та 55 ± 5 Індекс (S/C) (у 1,34 рази) і саме у цих групах спостерігалися найвищі рівні феритину. Зазвичай при наявності запального процесу трансферин діє як негативний білок гострої фази - його рівень знижується під впливом IL-6.

Такі результати є переконливим свідченням розвитку системних порушень та дисинхронізації процесів, що зазвичай діють у межах тісно скоординованої та динамічно врівноваженої системи гомеостатичного контролю. Виявлена диспропорція між рівнями феритину та трансферину свідчить про порушення механізмів внутрішньої взаємодії між зберіганням і транспортом заліза, що може відображати глибші зміни у регуляції системної відповіді на запалення.

Суттєве зростання вмісту трансферину може бути компенсаторною реакцію, яка розвивається внаслідок функціонального або абсолютного дефіциту заліза. За таких умов у відповідь на низьке залізо у печінці посилюється синтез трансферину. Слід зазначити, що поєднання високих рівнів трансферину та феритину є досить нетиповим і може свідчити не про просту зміну запасів заліза, а про складний метаболічно-запальний фон, коли значні запаси заліза знаходяться «заблокованими» всередині клітини, але тканини сигналізують про нестачу цього елементу.

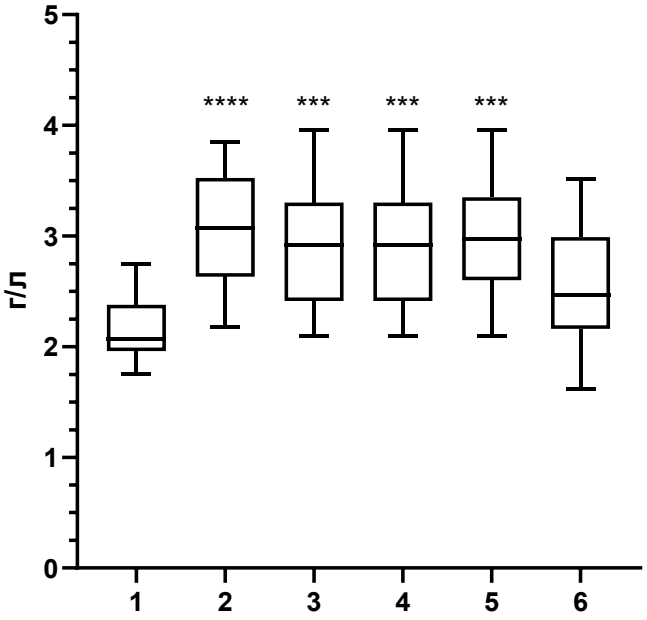


Рис. 6.5. Концентрація трансферину у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Як вже згадувалося вище, підвищення внутрішньоклітинної концентрації заліза спричиняє генерацію активних форм кисню, що ініціює оксидативний стрес, ушкодження ліпідного шару клітинних мембран і, як наслідок, порушення їхньої цілісності. Це веде до вивільнення внутрішньоклітинних компонентів у системний кровотік, сприяючи у такий спосіб посиленню запальної відповіді та вторинному ушкодженню тканин.

Отже, одночасне підвищення рівнів феритину і трансферину - це складна комбінація, яка виключає простий дефіцит або надлишок заліза і найчастіше свідчить про поєднання запалення і функціонального дефіциту заліза при якому залізо є, але воно недоступне.

Аналіз цитокінового профілю є необхідним для оцінки ступеню збереження запального фону та активності імунної відповіді після перенесеної інфекції

SARS-CoV-2, однак сам по собі цитокіновий дисбаланс є лише частиною складної патофізіології у постковідний період. Довготривалий запальний процес запускає каскад реакцій, що включає гіпоксичні сигнали, активацію ангіогенезу, клітинне ремоделювання та розлади ендотеліальної функції. Для цілісного розуміння цих процесів було проаналізовано вміст деяких факторів - HIF-1α, VEGF, NF-κB, FGF-2, PDGF у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2.

Вже доведено, що гіпоксія є поширеним і критичним фактором при COVID-19, особливо в тяжких формах захворювання. Вона не лише сигналізує про ураження легень, а й є предиктором летальності, навіть у пацієнтів без явної задишки (так звана "тиха гіпоксія") [300]. Не виключено, що гіпоксія може бути серед ускладнень у пацієнтів, які перенесли COVID-19. Так, після гострої фази хвороби, деякі пацієнти продовжують відчувати задишку, втому або мають зміни в насиченні крові киснем. Це може бути пов’язано з ураженням легень, серця або мікроциркуляторної системи.

Оскільки HIF-1α є ключовим транскрипційним фактором, який активується в умовах гіпоксії та регулює експресію генів, відповідальних за ангіогенез, метаболізм, виживання клітин і адаптацію до стресу нами перш за все було досліджено вміст цього фактору у різних груп донорів. Як бачимо з рис.6.6, зростання вмісту HIF-1α спостерігалося лише у групах донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C). У решті груп вміст цього фактору знижувався, що опосередковано свідчить про відсутність гіпоксичних умов.

Оскільки HIF-1α має короткий період напіврозпаду і може швидко деградувати після нормалізації кисню, його підвищений вміст у плазмі крові донорів деяких груп, вказує на існування постійного стимулюючого чинника, який сприяє підтриманню підвищених рівнів HIF-1α. Не виключено, що виявлене нами зростання вмісту HIF-1α може відбуватися у відповідь на персистуючий запальний процес, адже такі фактори, як TNF-α, IL-1β, можуть індукувати експресію HIF-1α через активацію NF-κB-опосередкованого

сигналінгу. І саме у донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено виражене зростання вмісту IL-1β та TNF-α (лише для донорів з титром антитіл 75 ± 5 Індекс (S/C).

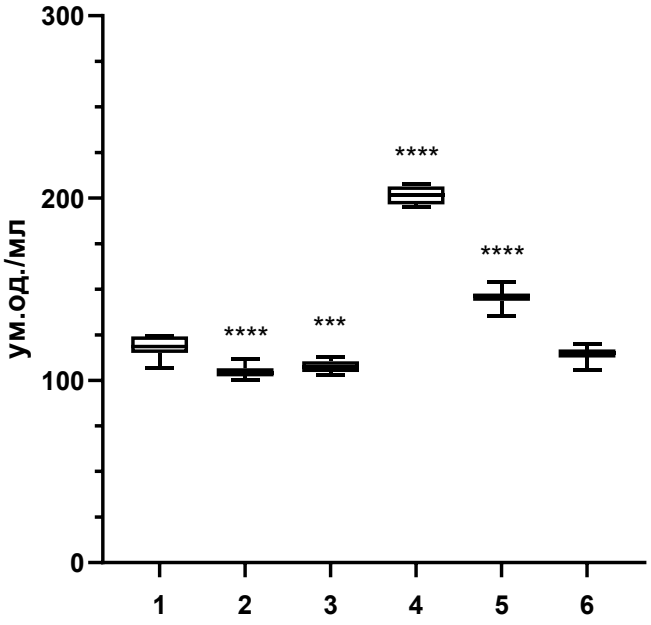


Рис. 6.6. Рівень HIF-1α у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Говорячи про зв'язок HIF-1α з системою гемостазу зазначимо, що HIF-1α індукує синтез ПАІ-1 і саме в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено найвищі рівні PAI-1.

Ще одним фактором експресія якого може індукуватися при гіпоксичних умовах та запаленні, є фактор VEGF, який є ключовим регулятором судинного росту, проникності та запалення. Його роль охоплює як фізіологічні процеси регенерації, так і патології - зокрема рак, ішемію, фіброз і автоімунні стани. Крім того, експресія VEGF регулюється HIF-1α.

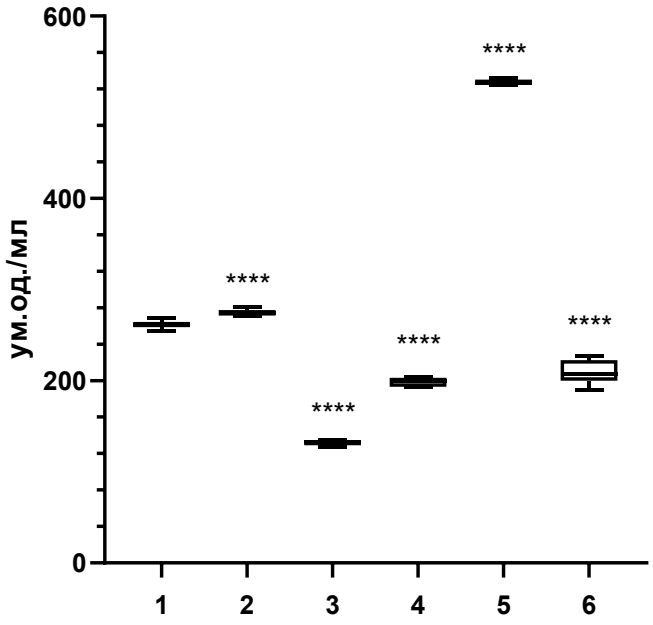


Рис. 6.7. Рівень VEGF у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Як бачимо з рис.6.7, вміст VEGF у плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG незначно зростав у групі донорів з титром антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C) та був удвічі вищим за показник у групі донорів з нульовим титром антитіл для донорів з титром 125 ± 5 Індекс (S/C).

Відсутність одночасного зростання VEGF і HIF-1α – факторів, експресія яких зазвичай зростає у відповідь на нестачу кисню, не виключає гіпоксію, але вказує, що вона може бути транзиторною, компенсованою, або маскованою іншими механізмами регуляції.

Аналіз вмісту фактор росту фібробластів (FGF-2) у досліджуваних групах донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 виявив зростання вмісту цього фактору у всіх групах донорів, за виключенням донорів з титром антитіл 55 ± 5 Індекс (S/C) (рис.6.8).

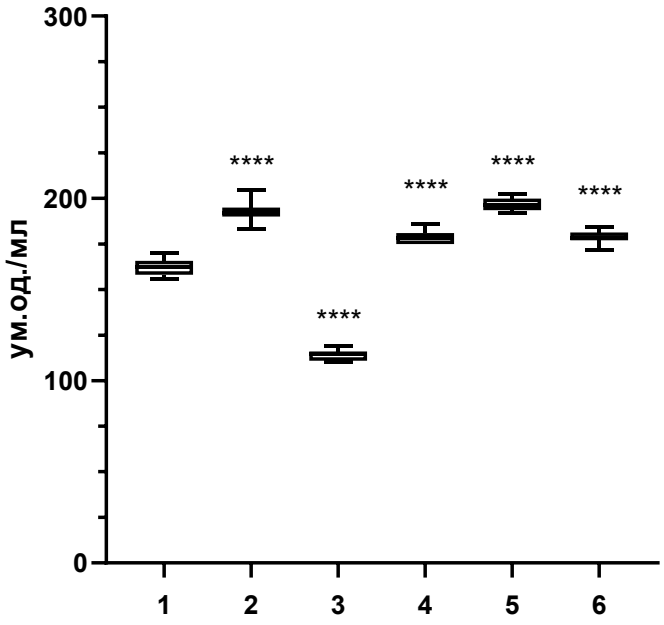


Рис. 6.8. Рівень FGF-2 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Оскільки FGF-2 - це білок з родини факторів росту фібробластів, який є потужним мітогеном, що стимулює ріст, виживання, міграцію та диференціацію різних типів клітин, особливо мезенхімальних і ендотеліальних, зростання його вмісту може бути своєрідною відповіддю організму на посилення деструкції тканин внаслідок активізації протеолітичних реакцій. Проте за тривалого підвищення вмісту, FGF-2 може бути одним з чинників, що лежать в основі активізації протеолізу, адже цей фактор індукує експресію ММП [18,19].

Разом з тим, FGF індукує експресію широкого спектра генів, пов’язаних із запальними процесами, включаючи прозапальні цитокіни/хемокіни та їхні рецептори, молекули адгезії ендотеліальних клітин, а також компоненти простагландинового шляху, що свідчить про його прозапальний характер [301,302]. Додатково, *in vivo* дані вказують на унікальну роль FGF у регуляції

хемокінів та інфільтрації моноцитів/макрофагів у процесі ангіогенезу, опосередкованого FGF.

Наступним фактором, вміст якого було досліджено з огляду на його можливу роль у розвитку чи підтриманні постковідних ускладнень, є тромбоцитарний фактор росту (PDGF). PDGF, як основний фактор міграції та проліферації фібробластів, може відігравати важливу роль у розвитку постковідних ускладнень, зокрема фіброзу легень, судинних ушкоджень і неврологічних розладів, діючи як фактор патологічного ремоделювання тканин [303].

Згідно отриманих нами результатів (рис.6.9), вміст PDGF знижувався лише у донорів з титром антитіл 55 ± 5 Індекс (S/C) та зростав у донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C), 150 ± 5 Індекс (S/C).

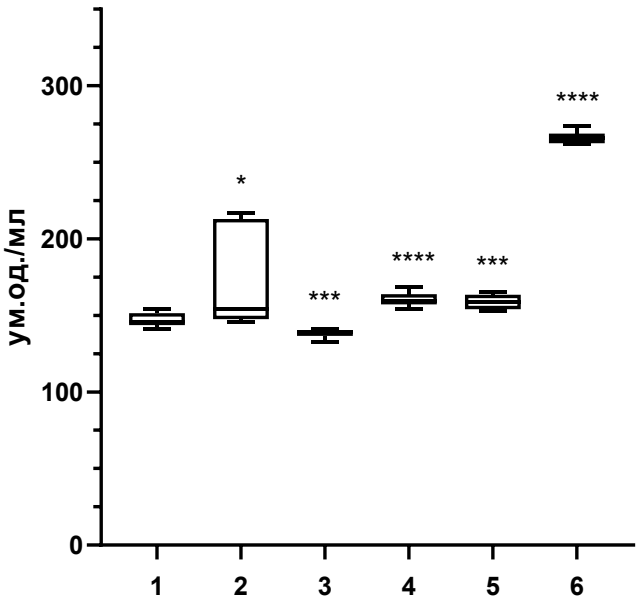


Рис. 6.9. Рівень PDGF у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; * $p<0,05$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Одночасне зростання PDGF та FGF-2 у плазмі крові може вказувати на активізацію процесів ремоделювання тканин, судинного запалення або фіброзу, адже PDGF та FGF-2 стимулюють проліферацію клітин сполучної тканини під впливом TGF-β та IL-13, що спостерігається при легеневому фіброзі [304]. Обидва ці фактори не лише сприяють ремоделюванню тканин та розвитку фіброзу, але також підтримують хронічне запалення. Враховуючи різнонаправленність ефектів факторів росту, зокрема PDGF, точна інтерпретація виявлених змін може бути здійснена лише після проведеннях поглиблених досліджень стану легень. Проте, беручи до уваги, що коефіцієнт IL-6/IL-10 для донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C), 150 ± 5 Індекс (S/C) незначно відхилявся від показника у групі донорів з нульовим титром антитіл, а для донорів з титром 125 ± 5 Індекс (S/C) навіть був нижчим, можемо висунути припущення про адаптивну реакцією організму на ушкодження під час перенесеного ковіду.

Цікавим є факт виявлення у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, у тому числі й донорів з нульовим титром антитіл, певних рівнів транскрипційного фактору NF-κB (рис.6.10), адже NF-κB не циркулює у вільній формі в плазмі крові. Зростання вмісту цього фактору у порівнянні з групою донорів з нульовим титром було виявлено у донорів з титрами антитіл 10 ± 3 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C).

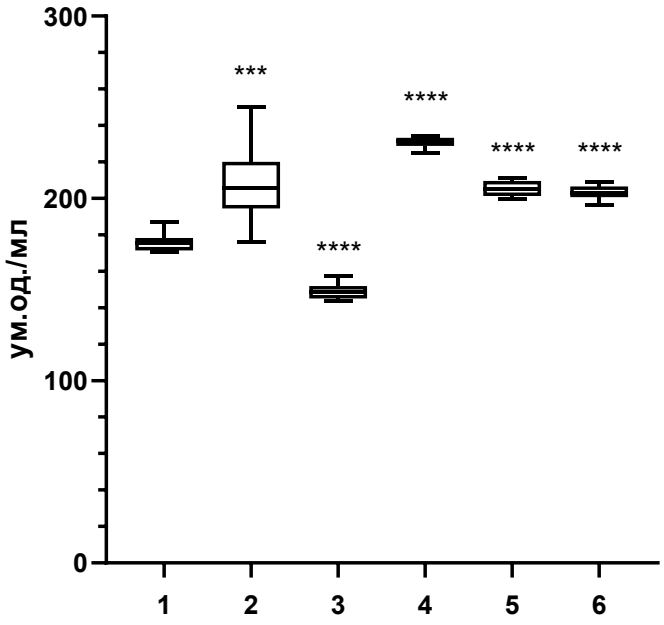


Рис. 6.10. Рівень NF-κB у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** $p<0,0001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** $p\leq0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

NF-κB є центральним регулятором імунної та запальної відповіді. Через широкий спектр клітинних мішеней і сигнальних шляхів, він відіграє ключову роль у регуляції імунної відповіді, запаленні, проліферації клітин, апоптозі і підтримці гомеостазу тканин, причому ефект може реалізуватися як у контексті захисних функцій, так і як частина механізму патогенезу захворювання. В умовах нашого дослідження висновок про залучення NF-κB-опосередкованого сигналінгу у формування патерну змін, характерних для пост ковідного періоду, можна зробити опосередковано за зростанням вмісту таких факторів, як TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-8.

Оскільки NF-κB є цитоплазматичним білком, реалізація ефектів якого відбувається на рівні впливу на експресію низки генів, його поява у кровотоці може вказувати на існування деструктивних процесів, пов’язаних з порушенням

цілісності клітин та вивільненням клітинного вмісту включно з транскрипційними факторами у плазму крові. За таких умов різниця між вмістом NF-κB у донорів з різними титрами антитіл може бути непрямим свідченням ступеню порушення цілісності клітин та проявом системного запалення, а не функціональною ознакою активації NF-κB-сигналінгу. Автори робіт [305,306] висловлюють припущення, що екзосоми й мікровезикули, які формуються у стресових умовах, можуть бути носіями молекул, які прямо або опосередковано активують NF-κB, або навіть містити NF-κB або його субодиниці (RelA/p65).

До факторів, вміст яких змінюється у відповідь на запальний процес, належать HSP - високо консервативні білки, що виконують функції молекулярних шаперонів, забезпечуючи правильне згортання білків, запобігаючи їхній агрегації та сприяючи деградації дефектних поліпептидів. Серед них ключову роль у реакції клітин на стресові впливи відіграють HSP-60 та HSP-70, які залучені до регуляції клітинної гомеостазі, апоптозу та імунної відповіді. У літературі є поодинокі роботи присвячені дослідженню вмісту цих факторів у пацієнтів під час гострої стадії COVID-19. Так, у роботі [307] автори показали, що рівні білків теплового шоку HSP70 та HSP90 були статистично значуще підвищеними у пацієнтів з COVID-19, особливо у хворих із тяжким перебігом захворювання порівняно з тими, хто переніс його в легкій формі. Отримані результати свідчать про можливу участь білків родини HSP у механізмах, що зумовлюють тяжкість клінічного перебігу COVID-19. У дослідженні також виявлено позитивну кореляцію між рівнями білків теплового шоку та іншими маркерами запалення, зокрема С-реактивним білком і креатинфосфокіназою, що було особливо виражено у групі пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 [307]. Ці дані свідчать про потенційну залученість HSP у реалізацію запальної відповіді, характерної для тяжких форм захворювання.

Проте проведений нами літературний пошук виявив відсутність робіт щодо вивчення вмісту HSP у пост ковідний період. Тому надалі нами було проаналізовано вміст HSP60 та HSP70 у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 у пост ковідний період. Оскільки нашим основним завданням було

виявити чинники, що сприяють хронічному перебігу запалення, визначення рівня HSP проводили у плазмі крові. Адже, HSP-60 та HSP-70 виконують подвійні функції - з одного боку, вони забезпечують захист клітини від стресу, а з іншого - можуть ініціювати та підтримувати запальну реакцію при вивільненні у позаклітинне середовище. Так, HSP-60 локалізується переважно в мітохондріях і забезпечує згортання білків у цій органелі. У контексті патологій, HSP-60 може транслокуватися на поверхню клітини або вивільнятися в позаклітинне середовище, де набуває функцій молекули «небезпеки» (danger-associated molecular pattern, DAMP). Подібно до HSP-60, HSP-70 може бути секретований клітиною і діяти як DAMP, активуючи вроджений імунітет та підтримуючи низько інтенсивне системне запалення.

Згідно отриманих результатів (рис.6.11), у постковідний період спостерігалося переважно зниження вмісту обох факторів у всіх групах донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Лише у групі донорів з титром антитіл 75 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено зростання вмісту HSP-60 у 1,3 рази у порівнянні з групою донорів з нульовим титром антитіл, а у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) мало місце незначне зростання вмісту HSP-70.

Виявлення HSP-60 та HSP-70 у плазмі крові може свідчити про підвищений рівень клітинного стресу або ушкодження тканин. Як вже зазначалося, у нормі ці білки локалізовані внутрішньоклітинно, однак за умов запалення, ішемії, оксидативного стресу або апоптозу може відбуватися їх активне або пасивне вивільнення в позаклітинний простір та, відповідно, в кровотік.

Позаклітинні HSP-60 та HSP-70 набувають імуномодулюючих властивостей. Вони розпізнаються рецепторами вродженого імунітету (зокрема TLR2 та TLR4) на поверхні ендотеліоцитів, моноцитів та дендритних клітин, що призводить до активації транскрипційного фактору NF-κB і секреції прозапальних цитокінів (IL-6, IL-1β, TNF-α). Це сприяє хронічному субклінічному запаленню, що відіграє ключову роль у прогресуванні ускладнень, які часто виявляються у пост ковідний період.

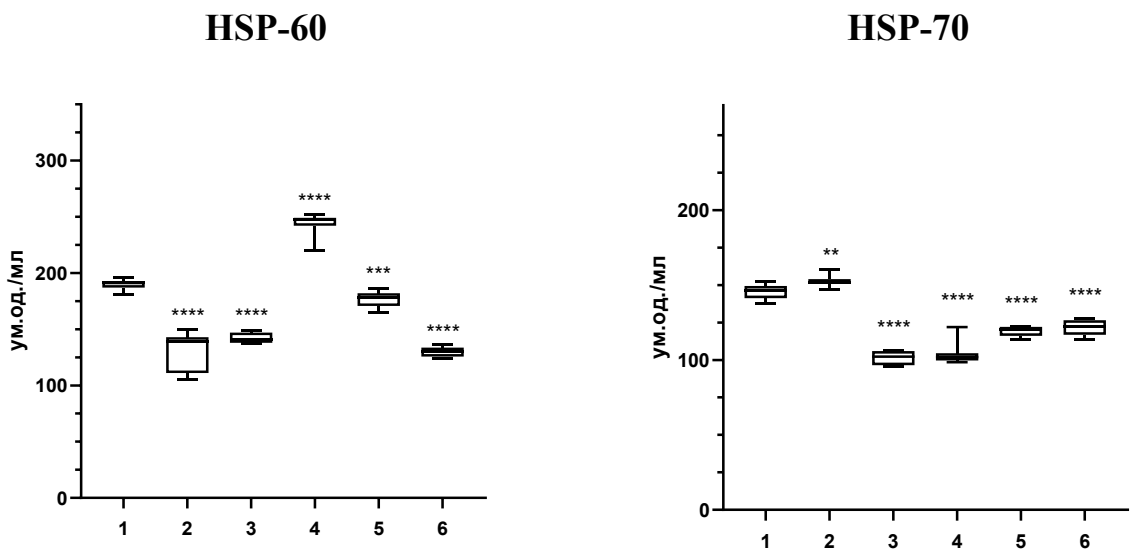


Рис. 6.11. Рівень HSP60 та HSP70 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

Примітка: **** p<0,0001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; *** p≤0,001 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** p ≤0,01 відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Саме через активацію TLR4 позаклітинний HSP-60 може стимулювати продукцію ММР-2 і ММР-9. І, як було показано у попередньому розділі роботи, найвищий вміст ММП-9 спостерігався у групі донорів з підвищеним вмістом HSP-60 - донори з титром антитіл 75 ± 5 Індекс (S/C).

У цілому результати проведених досліджень дозволяють говорити про існування певних порушень у функціонуванні імунних клітин, дисбалансі регуляторних механізмів контролю вмісту та активності ключових стрес-асоційованих молекул у постковідний період, що сприяє збереженню персистуючого запалення, при цьому молекулярні механізми його підтримки відрізняються залежно від титру антитіл до SARS-CoV-2 у різних груп донорів.

З-поміж досліджуваних груп донорів звертають на себе увагу донори з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C), для яких зниження рівнів HIF-

1α, VEGF, NF-κB, FGF-2 та PDGF на тлі зростання IL-6/IL-8 і пригнічення IL-4/IL-10/IL-1β може свідчити про виснаження або неефективність регенеративно-запальної відповіді, при якій зберігається персистуюче запалення, але без належної репарації або ангіогенезу. Клітини, відповідальні за продукцію HIF-1α, VEGF, NF-κB (напр., макрофаги, ендотеліальні клітини), можуть бути функціонально виснажені або десенсибілізовані на тлі персистуючого IL-6/IL-8-середовища. Це може бути частиною імунної дисфункції або "застиглого" запалення, характерного для постковідного синдрому. Це типово для дисрегульованого або хронічного запального середовища, яке спостерігається при деяких постінфекційних синдромах і може бути типово для постковіду.

У донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) зниження вмісту HIF-1α на тлі зростання вмісту VEGF, NF-κB, FGF-2 та численних цитокінів (IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, IL-1β) і зниження рівня TNF-α може вказувати на перехід від гіпоксично-запального до ангіогенно-регенеративного фазового стану. Це може свідчити про хронізацію запалення, де HIF-1α вже не є ключовим медіатором, а цитокінові шляхи домінують у підтримці ангіогенезу та запальної активності.

Підсумовуючи, отримані результати свідчать про збереження в постковідному періоді хронічного низькорівневого запального процесу, що супроводжується дисбалансом вмісту прозапальних та протизапальних цитокінів, а також порушенням регуляції факторів ангіогенезу, гіпоксії та гемостазу. Виявлене підвищення рівнів IL-6, IL-8 та IL-1β на тлі пригнічення IL-4, IL-10 та IL-12β свідчить про домінування прозапального середовища з тенденцією до хронізації запальної відповіді.

Паралельне зростання СРБ й активація осі IL-6 → СРБ демонструє збереження функціональної активності запального каскаду, що може бути пов’язано з тривалим впливом цитокінів на гепатоцити.

Зміни вмісту HIF-1α, VEGF, NF-κB, FGF-2 та PDGF залежать від імунного статусу та тяжкості перенесеної інфекції, відображаючи як спробу компенсації пошкоджень, так і виснаження регенеративних резервів. У певних групах донорів

виявлено зниження ангіогенних та гіпоксіє-чутливих факторів на тлі зростання прозапальних цитокінів, що свідчить про дестабілізацію імунного контролю та потенційне зниження здатності до ефективної регенерації.

Виявлене підвищення рівня трансферину на тлі ознак хронічного запалення може свідчити про компенсаторну відповідь організму на прихований або функціональний дефіцит заліза. У поєднанні з гіперферитинемією така картина відображає порушення регуляції обміну заліза, що опосередковується через IL-6-залежний гепсидиновий каскад. Така неузгодженість між високим феритином і трансферином потенційно вказує на розлад у системах депонування, транспорту і використання заліза, що здатне сприяти гіпоксії, порушенню еритропоезу, ендотеліальній дисфункції і є метаболічним маркером затяжного постковідного синдрому.

Сукупність виявлених змін дозволяє припустити, що хронічне запальне середовище у постковідний період не лише підтримує імунну активацію, а й створює умови для порушення гомеостатичних механізмів, що регулюють гемостаз, ангіогенез, метаболізм заліза та тканинну регенерацію. Це, у свою чергу, формує патофізіологічне підґрунтя для розвитку постковідних ускладнень, включаючи ендотеліальну дисфункцію, мікроангіопатії, аутоімунні прояви, фіброз та метаболічну дизрегуляцію заліза.

Варто звернути увагу на те, що виявлене нами підвищення рівнів низки ростових факторів на тлі цитокіновиго дисбалансу та дезінтеграції координованих регуляторних взаємозв’язків між біологічно активними молекулами, які зазвичай функціонують у координованій взаєморегуляції, свідчить про дестабілізацію регуляторних механізмів імунного гомеостазу. Такий молекулярний контекст може не лише створювати умови для зниження порогу активації імунної відповіді, а й потенціювати запуск аутоімунних каскадів. Зокрема, порушення взаємної регуляції між прозапальними цитокінами та ангіогенними факторами, як-от TNF-α та FGF2, може сприяти утворенню імуногенних мікрооточень, що активують презентацію аутоантигенів власних

антигенів імунокомпетентним клітинам, що веде до персистенції аутоімунного запалення [308].

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 6:

1. Krenytska, D.I., **Karbovskyy, V.L.,** Abenavoli, L., Falalyeyeva, T.M., Scarlata, G.G.M., Raksha, N.G., Vovk, T.B., Kot, L.I., Savchuk, O.M., Gambardella, M.L., Kovalchuk, O.I., Pankiv, V.I., & Ostapchenko, L.I. (2025). The levels of inflammatory, angiogenic, and stress biomarkers in plasma of donors depending on anti-SARS-CoV-2 IgG titers. Mìžnarodnij Endokrinologìčnij Žurnal, 21(2), 112–120. https://doi.org/10.22141/2224-0721.21.2.2025.1507**(Scopus Q4)**

2. Halenova, T. I., Raksha, N. H., Vovk, T. B., **Karbovskyy, V. L.,** Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., & Savchuk, O. M. (2024). Cytokine profile in multiple sclerosis patients with and without COVID-19. Wiadomości Lekarskie (Medical Advances), 77(4), 640–645. https://doi.org/10.36740/WLek202404104 **(Scopus Q4)**

3. Krenytska, D., Rachkovska, A., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Ostapchenko, L., & Halenova, T. (2023). Cytokine profile depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in the blood plasma of healthy volunteers. Journal of Biological Research, 96(2), Article 11256. https://doi.org/10.4081/jbr.2023.11256

4. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2021). Біохімічні параметри функціонального стану печінки у хворих на гепатит В за умови коінфекції SARS-CoV-2. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(87), 12–18.

РОЗДІЛ 7
КОМПЛЕКСИ АНТИТІЛ З МОЛЕКУЛАМИ ПЛАЗМІНОГЕНОВОГО ПОХОДЖЕННЯ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ ТРИГЕРИ ПОРУШЕНЬ ГОМЕОСТАЗУ У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД

Результати, описані нами у попередніх розділах роботи, вказують на існування певних відхилень у функціонуванні системи гемостазу у донорів із різними титрами антитіл до SARS-CoV-2, які відбуваються на тлі системного запального процесу та протеолітичного дисбалансу. Особливу увагу привертає той факт, що отримані результати не демонструють очікуваних кореляцій та причинно-наслідкових зв'язків між ключовими досліджуваними показниками, які за нормальних умов функціонально взаємопов'язані в межах інтегрованої реакції організму на інфекційне навантаження. Незважаючи на відсутність у донорів клінічно виражених ускладнень у постковідному періоді, у них фіксуються певні системні відхилення, що свідчать про збереження субклінічних проявів порушення гомеостазу.

Як ми вважаємо, така ситуація може вказувати на наявність у кровотоці донорів ендогенних тригерних або модуляторних факторів, що сприяють персистенції патологічних процесів, зокрема через активацію імунної системи, порушення коагуляційного балансу та підтримання хронічного запального процесу.

Під час аналізу протеолітичного профілю плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 ми звернули увагу на присутність у складі очищеної нами фракції серинових протеїназ білків з молекулярною масою понад 200 кДа, які, з огляду на їх масу, можуть бути білковими комплексами. Методи, використані нами для очищення фракції серинових протеїназ та їх аналізу, зокрема афінна хроматографія з використанням буферу елюції, що містив NaCl та електрофорез за денатуруючих умов, свідчать, що ці білкові комплекси утворені за рахунок ковалентних взаємодій.

З-поміж серинових протеїназ, що присутні у кровотоці, на особливу увагу заслуговує плазмін та його профермент плазміноген через свої унікальні функціональні та структурні властивості, які обумовлюють їх значний патологічний потенціал, особливо в умовах порушеного гомеостазу після перенесеного COVID-19. І хоча, як ми вже зазначали, до складу комплексів можуть входити й інші серинові протеїнази, у тому числі й фактори системи гемостазу, у своєму досліджені ми зупинилися на вивченні плазміногену та його деградованих форм як можливих складових комплексів.

Такий вибір продиктований перш за все багатофункціональністю плазміногену та його залученням до низки процесів, що не пов'язані з системою гемостазу, адже плазмін бере участь не лише в розчиненні фібринового згустку, а також у деградації позаклітинного матриксу, модуляції запальної відповіді, регуляції системи комплементу, та навіть у міграції клітин. Завдяки такій мультифункціональності, порушення механізмів контролю активності плазміногену (плазміну) може спричинити каскад патологічних ефектів - від геморагічних до імунозапальних. Також варто згадати про унікальність будови молекули плазміногену, яка пов'язана з наявністю кринглів - дискретних білкових доменів, які забезпечують високо специфічну взаємодію з різними субстратами, рецепторами та клітинними поверхнями. Саме ці домени є критичними для адресної дії плазміногену і можуть бути частиною механізму реалізації патогенетичних ефектів плазміногену чи його деградованих форм через неконтрольовану взаємодію з відповідними лігандами або слугувати потенційними сайтами для зв'язування з іншими білками чи бути мішенями для неправильного розпізнавання аутоантитілами, особливо в умовах його структурної модифікації під час запалення чи деградації. Плазміноген навіть у складі імунних комплексів потенційно може зберігати ферментативну активність або змінювати свою активність у напрямку розщеплення не канонічних субстратів. Це відкриває можливість реалізації неконтрольованих протеолітичних ефектів, особливо за умов, коли білкові комплекси утворюються ковалентно і не кліренсуються системами фагоцитозу. Більш того, деградовані

форми плазміногену, які часто утворюються в умовах оксидативного стресу чи високої активності фібринолізу, можуть втрачати здатність до регуляторної взаємодії з природними інгібіторами (наприклад, α2-антиплазміном), але зберігати або навіть змінювати активність. Це означає, що існує можливість “обходу” канонічних механізмів контролю, що значно підвищує патологічну загрозу.

Таким чином, плазміноген та його деградовані форми є не лише ймовірними мішенями аутоімунного розпізнавання, а й потенційно незалежними тригерами подальшої патологічної активації систем фібринолізу, запалення та тканинного пошкодження, особливо у стабільних, імуноглобулін-зв’язаних формах. Саме ці властивості визначили доцільність обрання даного білка як об’єкта для подальшого детального аналізу як можливої складової комплексів, що з’являються у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19.

Якщо одним з компонентів комплексу є плазміноген (плазмін) чи їх деградовані форми, то іншим білком за нашим припущенням може бути антитіло. На користь такого припущення свідчить порівняння електрофоретичних профілів розподілу білків у зв’язаній фракції за відновлювальних та невідновлювальних умов – ймовірно, що білковим смугам з молекулярною масою вище 150 кДа відповідають комплекси, утворені за рахунок нетипових білок-білкових взаємодій між антитілами та іншими білками.

За нормальних умов взаємодія імуноглобулінів з антигенами відбувається за рахунок нековалентних зв’язків (електростатичних, водневих, гідрофобних), що забезпечує високу специфічність та оборотність. Проте під час патологічних станів, що супроводжуються довготривалим запаленням, оксидативним стресом та модифікацією білкових структур, зростає ймовірність утворення ковалентних комплексів. Потенційно, це може відбуватися через залучення декількох механізмів, з-поміж яких окиснення сульфгідрильних груп у білках плазми крові, що сприяє утворенню дисульфідних містків між білками та антитілами; модифікації лізинових та аргінінових залишків білків з утворенням реактивних карбонільних проміжних продуктів, здатних взаємодіяти з N-групами антитіл;

NO-опосередкованого нітрозилювання тирозину та інші модифікації, які змінюють електрофільні властивості білків, підвищуючи афінність до Fc або Fab-фрагментів антитіл.

Особливості патогенезу COVID-19 - зокрема масивна продукція цитокінів, тривале системне запалення, порушення редокс-гомеостазу, дисбаланс між функціонуванням окремих факторів системи гемостазу та оксидативний стрес - потенційно створюють умови для модифікації білкових структур, що може сприяти їх аномальному розпізнаванню імунною системою та зв’язуванню з антитілами за рахунок ковалентних взаємодій. У цьому контексті виявлення стабільних імунних комплексів із білками, що регулюють гемостаз (наприклад, плазміноген), може вказувати на патологічну фіксацію регуляторних молекул у неактивному або, навпаки, гіперактивному стані. Така форма молекулярної взаємодії заслуговує на окреме дослідження, оскільки вона не лише ускладнює кліренс імунних комплексів, але й може підтримувати хронічне запалення та порушення судинно-гемостатичного балансу, навіть у клінічно стабільних постковідних осіб.

Говорячи про антитіла варто звернути увагу на той факт, що за умов патологій нерідко формуються також аутоантитіла - як наслідок побічної активації або молекулярної мімікрії [309,310]. Наявність функціонально активних аутоантиіл була задокументована під час гострої фази інфекції SARS-CoV-2 [311,312]. Такі аутоантитіла виявляють реактивність до антигенів широкого спектра тканин і органів, зокрема: щитоподібної залози, серцевого та скелетного м'язу, легеневої тканини, суглобів, печінки, нирок, головного мозку та кісткового мозку, периферичної нервової системи, шкіри, жирової тканини, шлунково-кишкового тракту, а також до мітохондріальних білків [313-315]. Саме аутоантитіла можуть опосередковувати розвиток тяжких ускладнень перебігу COVID-19, а також сприяти формуванню постковідного синдрому, зумовлюючи тривалу дисфункцію органів-мішеней навіть після елімінації вірусу.

У нормі рівень антитіл знижується зі стабілізацією імунного гомеостазу. Втім, згідно результатів чотирирічних незалежних ретроспективних досліджень,

що охопили мільйони пацієнтів із COVID-19, після перенесеної інфекції зберігався підвищений ризик (на 20–40%) розвитку нових аутоімунних захворювань [316,317]. На підставі цього можна висунути гіпотезу, що персистенція аутоантитіл може бути патогенетичним чинником окремих проявів постковідного синдрому, навіть якщо клінічна картина не відповідає класичним критеріям встановленого аутоімунного захворювання. Таким чином, аутоантитіла в умовах постковідного синдрому здатні ініціювати широкий спектр порушень - від нервової дисфункції до запалення та ураження органів-мішеней.

Аутоантитіла, що формуються у пацієнтів із постковідним синдромом, можуть реалізувати свій патогенний вплив через низку взаємопов'язаних механізмів. Серед яких молекулярна мімікрія, за якої антитіла, індуковані SARS-CoV-2, перехресно реагують із білками організму, ініціюючи аутоімунні процеси. Певну роль може відігравати блокування або агоністична дія аутоантитіл на мембранні рецептори, зокрема β2-адренергічні та мускаринові холінергічні рецептори, що призводить до порушення вегетативної регуляції та нейрофункціональних симптомів. Аутоантитіла здатні активувати комплемент, опосередковуючи цитоліз клітин-мішеней, або формувати імунні комплекси, що осідають у тканинах і запускають місцеві запальні реакції. Крім того, через вплив на G-білок-зв'язані рецептори аутоантитіла можуть порушувати міжклітинну сигналізацію, а антифосфоліпідні антитіла - сприяти тромбозам і ендотеліальній дисфункції [318-321]. Сукупна дія цих механізмів пояснює мультисистемний характер уражень, хронічний перебіг і складність клінічних проявів постковіду навіть після елімінації вірусу.

На додачу до вище перерахованих можливих шляхів впливу аутоантитіл, ми припускаємо, що однією з потенційно-можливих причин виявлених системних порушень у функціонуванні гемостатичних, запальних та стрес-асоційованих механізмів у клінічно стабільних донорів у постковіднийперіод може бути утворення стабільних, ковалентних комплексів між антитілами та плазміногеном чи/та його деградованими формами, які у складі ковалентних комплексів з антитілами змінюють свою фізико-хімічні властивості; можуть набувати нових

біологічних властивостей; потенційно підтримують персистуюче субклінічне запалення та порушення гемостатичної рівноваги.

З огляду на викладене вище, наступний етап роботи було присвячено очищенню з плазми крові донорів комплексів антитіл з акцентом на комплекси між антитілами і плазміногеном та/чи його деградованими формами, верифікацію ковалентного характеру взаємодій, а також первинну оцінку наявності у таких комплексів функціональної активності, зокрема здатності розщеплювати хромогенний субстрат для плазміногену.

На рис.7.1 наведено електрофореграму плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, як вихідного матеріалу, що був використаний для очищення комплексів, а також електрофореграми незв'язаних і зв'язаних фракцій (рис.7.2), отриманих після нанесення зразків плазми крові донорів на бензамідин-сефарозу.

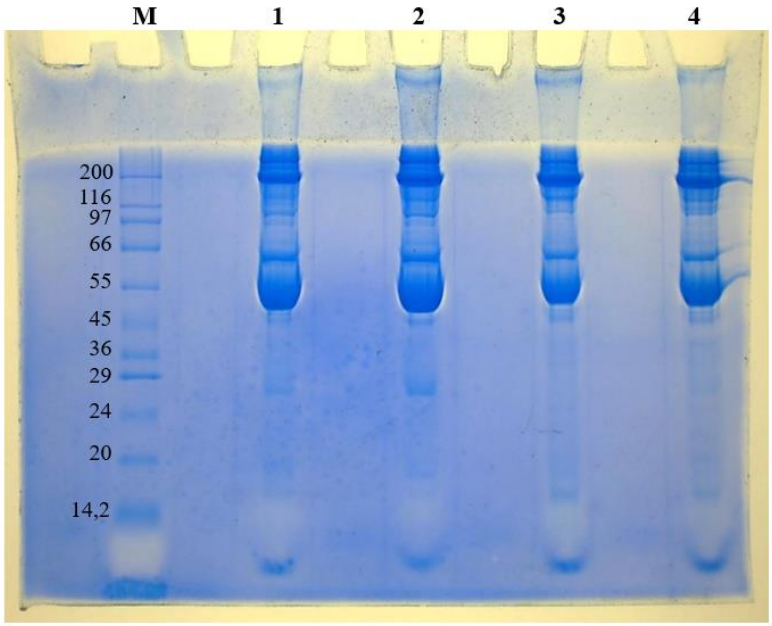


Рис. 7.1. Електрофореграма зразків плазми крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): M – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 75 ± 5; 4 – 150 ± 5

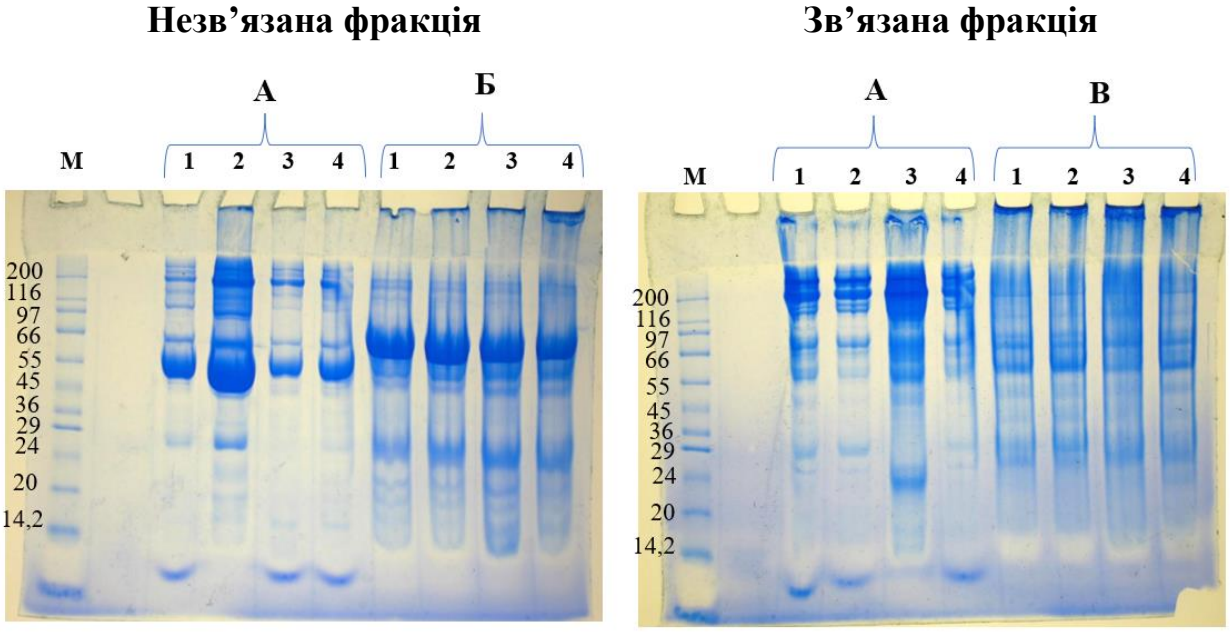


Рис. 7.2. Електрофореграми (А – електрофорез за невідновлювальних умов; Б – електрофорез за відновлювальних умов) фракцій, отриманих на бензамідин-сефарозі, з плазми крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 75 ± 5; 4 – 150 ± 5

Порівняння білкових профілів зв'язаної та незв'язаної фракцій за невідновлювальних та відновлювальних умов (рис.7.2А і 7.2Б) свідчить про присутність у складі фракцій високомолекулярних білкових комплексів, утворених ковалентними, зокрема дисульфідними зв'язками, адже обробка проб β-меркаптоетанолом приводила до зникнення смуг, які відповідають білкам з молекулярною масою понад 200 кДа. Звертає на увагу той факт, що такі комплекси виявлялися як у зв'язаній, так і у незв'язаній фракціях. І, як бачимо з рис.7.2, у зв'язаній фракції за проведення електрофорезу за невідновлювальних умов візуалізується більше білкових смуг з молекулярною масою 200 кДа та вище, у порівнянні з результатами у незв'язаній фракції.

До складу комплексів, що присутні у незв'язаних фракціях, можуть входити будь які білки, що є у кровотоці донорів, у той час як обов'язковим компонентом комплексів, виявлених у зв'язаній фракції, є білки, що мають спорідненість до бензамідин-сефарози, а це, переважно, серинові протеїнази.

Оскільки нашою метою було отримати комплекси між плазміногеном (плазміном) та антитілами, фракції, елюювані з бензамідин-сефарози, наносили на протеїн А-сефарозу. Завдяки високій спорідненості білка А до Fc-фрагменту антитіл, цей носій забезпечує селективне та ефективне зв'язування антитіл.

Надалі обидві фракції (незв'язану та зв'язану), отримані після нанесення проб на протеїн А-сефарозу аналізували методом електрофорезу за денатуруючих умов у 10% ПААГ, результати якого наведено на рис.7.3. Як бачимо, картина розподілу білків була типовою для всіх груп донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 – незв'язана фракція містила низку смуг у ширшому діапазоні молекулярних мас, у той час як склад фракції, елюйованої з протеїн А-сефарози, був представлений декількома білковими смугами, які з огляду на молекулярну масу понад 200 кДа можуть належати комплексам антитіл з білками.

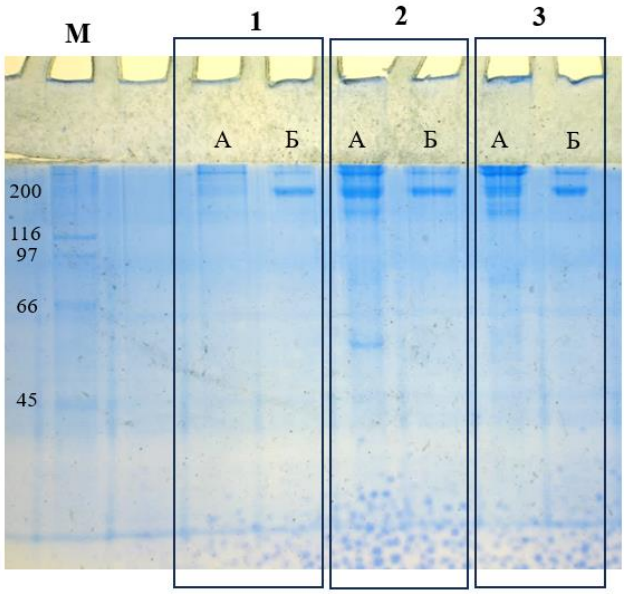


Рис. 7.3. Електрофореграма фракцій (А – незв'язана; Б – зв'язана), отриманих на протеїн А-сефарозі: М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 0; 2 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 75 ± 5; 3 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 150 ± 5

Примітка: електрофорез проведено у 10% ПААГ

Для того, щоб більш точно визначити молекулярну масу білків, зв'язані фракції після протеїн А-сефарози було додатково проаналізовано у 8% ПААГ (рис.7.4), що дозволило встановити присутність білків з молекулярною масою понад 300 кДа. Також чітко видно смугу з молекулярною масою близько 170 кДа, яка може бути комплексом антитіл з фрагментами плазміногену, що містять п'ятий кринґл або серин-протеїназний домен.

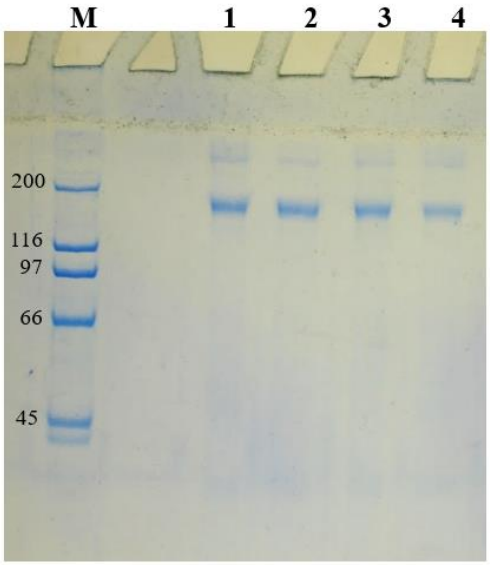


Рис. 7.4. Електрофореграма фракцій, отриманих на протеїн А-сефарозі: М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 0; 2 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 10 ± 3; 3 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C); 75 ± 5; 4 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 150 ± 5

Примітка: електрофорез проведено у 8% ПААГ

Отже, у результаті поєднання методів афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі та протеїн А-сефарозі з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 було очищено фракції до складу яких входять комплекси (надалі по тексту «комплекси»), що складаються з антитіл та білків, які мають спорідненість до бензамідин-сефарози серед яких, як ми припускаємо, і плазміноген та/чи його деградовані форми. Оскільки обидва методи передбачають елюцію зв'язаного матеріалу за умов, що унеможливлюють утримання молекул за рахунок нековалентних взаємодій (присутність 0,5 М NaCl

у буфері у випадку елюції матеріалу з бензамідин-сефарози та буфер зі значенням pH 3,0 при елюції матеріалу з протеїн А-сефарози), такі результати слугують непрямим доказом на користь ковалентної природи білок-білкових взаємодій між складовими комплексу.

Додатковим підтвердженням існування саме ковалентних зв'язків слугують результати електрофоретичного аналізу зв'язаних фракцій за відновлювальних та невідновлювальних умов (рис.7.5, табл.7.1). З даних, наведених на рис.7.5, видно, що обробка проб β-меркаптоетанолом приводила до зникнення значної частини білкових смуг, що відповідають високомолекулярним білкам. Натомість з'являлась низка смуг з молекулярною масою нижче 100 кДа. Кількісно найбільш вираженими були смуги, що відповідають білкам з молекулярною масою 53-56 кДа, які складали 57 %, 47 %, 42 % та 55 % від загального вмісту, відповідно, для груп донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 та титрами 10 ± 3 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C) і 150 ± 5 Індекс (S/C).

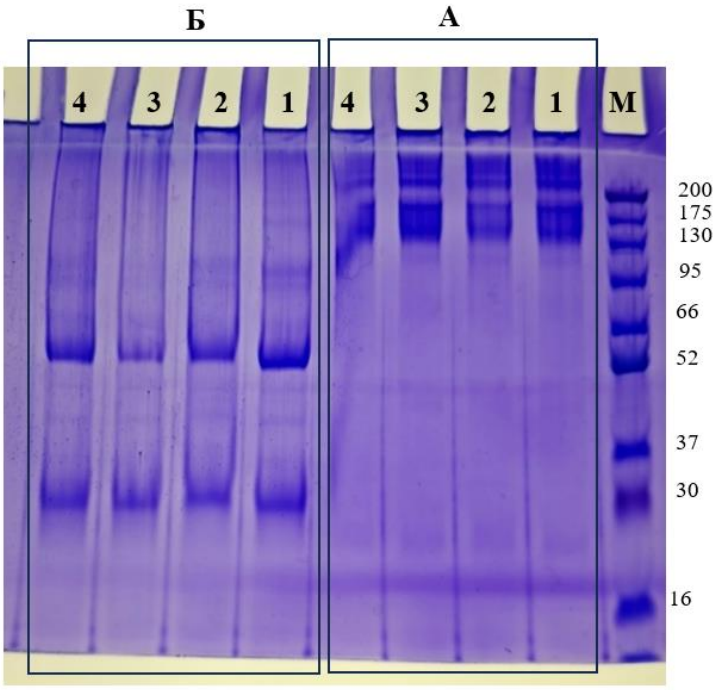


Рис. 7.5. Електрофореграма зв'язаних фракцій, отриманих на протеїн А-сефарозі, за невідновлювальних (А) та відновлювальних (Б) умов: М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 0; 2 – титр

анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 10 ± 3; 3 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C); 75 ± 5; 4 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 150 ± 5

Примітка: електрофорез проведено у 8% ПААГ

Таблиця 7.1

Профіль молекулярної маси білків зв'язаної фракції, отриманої на протеїн А-сефарозі

Групи донорів, Індекс (S/C)	Кількість білкових смуг	Умови проведення електрофорезу			
		Невідновлювальні умови		Відновлювальні умови	
		Відносний рівень, %	Мол. маса, кДа	Відносний рівень, %	Мол. маса, кДа
0	1	23,15	413	12,52	439
	2	15,89	368	0,28	310
	3	16,3	315	0,31	229
	4	9,57	237	1,01	157
	5	7,07	194	3,38	106
	6	15,34	157	1,14	92
	7	12,28	147	57,23	53
	8	0,4	135	1,84	46
	9	-	-	1,22	41
	10	-	-	0,19	35
	11	-	-	20,88	29
10 ± 3	1	29,31	410	17,21	434
	2	11,48	373	0,09	302
	3	16,14	302	2,5	112
	4	12,25	229	1,98	92
	5	8,06	163	47,8	56
	6	15,67	148	1,63	46
	7	6,35	137	0,73	41
	8	0,74	115	0,08	35
	9	-	-	27,97	30
75 ± 5	1	31,88	423	23,9	423
	2	6,9	365	42,93	54
	3	18,34	328	0,81	46
	4	11,6	215	2,06	41
	5	13,52	163	0,18	35
	6	17,37	140	30,12	29
	7	0,39	116	18,54	431
	1	33,47	413	2,52	100

150 ± 5	2	20,14	373	55,25	56
	3	27,14	331	0,26	46
	4	5,05	202	1,15	41
	5	6,94	159	22,28	29
	6	7,26	135	18,54	431

За результатами аналізу отриманих фракцій методом електрофорезу зробити чіткий висновок про відповідність білкових смуг конкретним білкам дуже складно, проте можемо припустити, що білки з молекулярною масою 92 кДа можуть бути плазміногеном, з молекулярною масою 35 кДа – міні-плазміном, смуги з молекулярною масою 53-56 кДа - відповідати важким ланцюгом антитіл, у той час молекулярній масі близько 29 кДа може відповідати як легкий ланцюг антитіл, так і легкий ланцюг плазміну (результати за відновлювальних умов).

Примітно, що навіть після обробки проб β-меркаптоетанолом на електрофореграмі були помітні білкові смуги, що відповідають білкам з молекулярною масою від 229 кДа до 439 кДа, що є свідченням існування комплексів, утворених за участі інших, ніж дисульфідні, ковалентних зв'язків.

Те, що серед білків фракцій, отриманих після нанесення на бензамідин-сефарозу, домінуючими є молекули плазміногенового походження опосередковано свідчать результати експерименту з використанням інгібітору pNGB, який через реактивну гуанідинобензойну групу необоротно зв'язується з серином у тріаді каталітичного центру ферменту. Внесення цього інгібітору у кінцевій концентрації 10 мМ до проби перед нанесенням на колонку з бензамідин-сефарозою не впливало на білковий профіль зв'язаної фракції (дослід проводили на прикладі фракції, отриманої з плазми крові донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C) (рис.7.6).

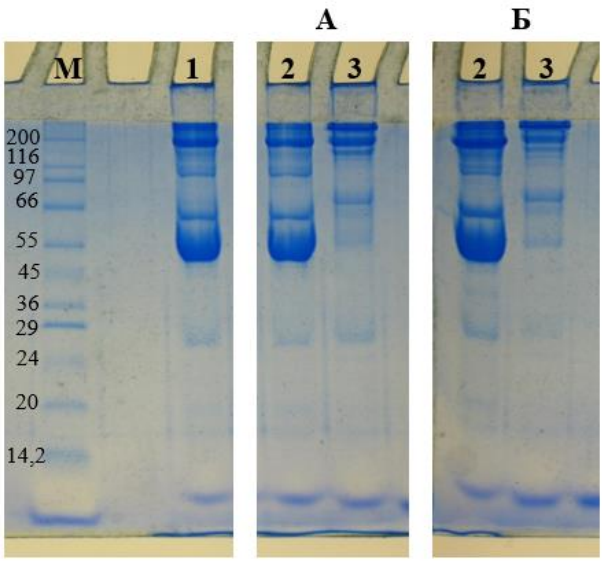


Рис. 7.6. Електрофореграма фракцій, отриманих на бензамідин-сефарозі, за додавання до вихідної проби 10 мМ pNPGB (А) та без додавання pNPGB (Б): М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – вихідна проба; 2 – незв'язана фракція; 3 – зв'язана фракція

Тобто, взаємодія з хроматографічним носієм відбувалась переважно не за активним центром, а отже, основна частина білків, що зв'язалися з бензамідин-сефарозою не належала до активних ферментів. Автори роботи [322] досліджували локалізацію та характерні особливості лігандзв'язувальних центрів у молекулі Ліз-плазміногену, а також у його окремих фрагментах і доменах використовуючи метод афінної хроматографії з сорбентами, модифікованими аргініноподібними лігандами. У ході дослідження було встановлено, що лізинзв'язувальні ділянки Ліз-плазміногену, важкого ланцюга та фрагмента К1-3 здатні взаємодіяти з гуанідил-карбоксильною парою, іммобілізованою на гомоаргінін-агарозі. Водночас, лізинзв'язувальний сайт у домені К4, який виявляє спорідненість до аміно-карбоксильної пари на лізин-агарозі, не взаємодіє з гуанідил-карбоксильною групою, що свідчить про відмінності в просторовій організації або хімічній специфічності даних зв'язувальних центрів. Крім того, автори встановили наявність трьох аргінінзв'язувальних сайтів у структурі плазміногену, здатних взаємодіяти з

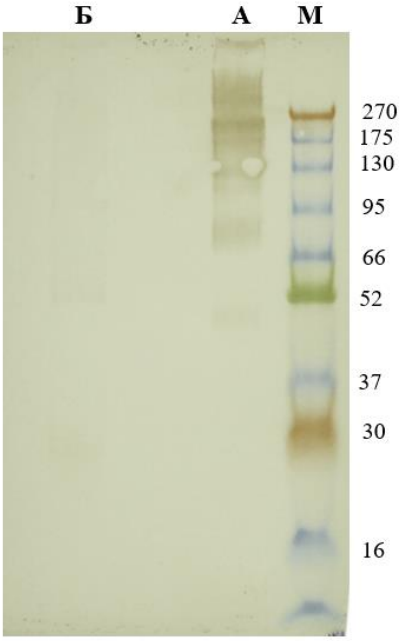
гуанідиловими групами гомоаргінін-агарози. Два з них ідентифіковано як відомі бензамідинзв'язувальні центри, розташовані у домені K5 та у легкому ланцюзі плазміну. Третій сайт, який раніше не описувався, виявлено у фрагменті K1-3; він не виявляє афінності до бензамідин-агарози, що може свідчити про наявність альтернативного механізму розпізнавання гуанідильних структур або про унікальну будову цього зв'язувального домену.

Отже, оскільки, у плазмі крові одним з найбільш представлених за вмістом білків, що мають спорідненість до бензамідину, є плазміноген, то можемо припустити, що саме плазміноген чи/та його деградовані форми, які містять сайти зв'язування з бензамідином можуть затримуватися на колонці.

Для того, щоб переконатися, що комплекси складаються з антитіл та плазміногену їх було проаналізовано методом вестерн блоту з використанням антитіл до плазміногену та антитіл проти людських IgG. Нагадуємо, що оскільки під час отримання комплексів було використано підходи, які несумісні зі збереженням нековалентних взаємодій між білками, одночасна детекція плазміногену та антитіл у складі одних і тих білкових смуг на мембрані може бути непрямим, але вагомим підтвердженням ковалентного характеру взаємодії між цими молекулами.

Так як картина розподілу білкових смуг під час електрофорезу була типовою для всіх груп донорів, методом вестерн блоту було проаналізовано лише один зразок - фракцію, отриману з плазми крові донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C); дослідження проводили як за відновлювальних, так і невідновлювальних умов.

Результати, отримані з використанням антитіл до плазміногену, доводять, що до складу очищених комплексів входять молекули плазміногенового походження (рис.7.7).



Кількість білкових смуг	Невідновлювальні умови (А)		Відновлювальні умови (Б)	
	Відносний рівень, %	Мол. маса, кДа	Відносний рівень, %	Мол. маса, кДа
1	9,75	363	5,06	300
2	17,44	314	2,7	242
3	24,78	219	3,47	179
4	14,2	166	17,99	97
5	5,27	125	2,07	60
6	4,48	110	41,14	50
7	16,86	82	27,58	27
8	7,22	47	-	-

Рис. 7.7. Блотограма фракції, елюйованої з протеїн А-сефарози: М – маркери молекулярної маси (кДа); А – проба за невідновлювальних умов; Б – проба за відновлювальних умов

Примітка: як первинні антитіла використано антитіла до плазміногену

Той факт, що молекулярна маса ідентифікованих за допомогою антитіл білкових смуг становила 110 кДа, 125 кДа, 166 кДа, 219 кДа, 314 кДа, 363 кДа слугує доказом включення плазміногену та/чи його деградованих форм до складу комплексів. Також було виявлено смуги з молекулярною масою 47 кДа та 82 кДа.

Аналіз зразків після їх обробки β-меркаптоетанолом дозволяє зробити декілька висновків. По-перше, частина комплексів між антитілами та плазміногеном та/чи його деградованими формами утворена за рахунок дисульфідних зв’язків, про що свідчить поява смуг з молекулярною масою 27 кДа, 50 кДа, 60 кДа, 97 кДа, які не спостерігалися при поділу зразка методом електрофорезу за невідновлювальних умов. По-друге, оскільки на блотограмі були присутні смуги, що відповідають високомолекулярним білкам - 179 кДа, 242 кДа, 300 кДа, це може вказувати на те, що у частині комплексів взаємодія між білками відбувається за рахунок інших ковалентних взаємодій, так як β-

меркаптоетанол не викликав дисоціації цих білкових комплексів на окремі складові.

Без детальних досліджень сказати, які саме ковалентні взаємодії потенційно можуть виникати між двома білками досить складно – це, до прикладу, можуть бути дитирозинові зв'язки. Дитирозинові зв'язки часто утворюються в умовах оксидативного стресу і вважаються одним з маркерів окислювального пошкодження білків [323]. Ці зв'язки стабілізують білкові агрегати, але також можуть викликати їхню нерозчинність і токсичність. Так, вони відіграють ключову роль у патогенезі нейродегенеративних та запальних захворювань, оскільки призводять до формування нерозчинних агрегатів (наприклад, тау, α-синуклеїн, Aβ), які стійкі до протеолізу [324,325].

Є низка робіт [326-328], де автори на основі виявлених змін у маркерах окиснювального пошкодження, а також дослідження ефективності антиоксидантної терапії (GSH, NAC, HBOT) як потенційного терапевтичного підходу роблять висновок про формування своєрідного «оксидативного фону» як можливого патогенетичного механізму розвитку постковідного синдрому. Оксидативний стрес формується у відповідь на хронічну імунну активацію та виснаження резерву системи антиоксидантного захисту. Провідна роль при цьому відводиться прозапальним цитокінам, зокрема IL-6, IL-1β, TNF-α та IFN-γ, рівні яких, згідно з результатами, описаними у розділі 3, зростали у різних груп донорів з титрами анитіл проти SARS-CoV-2. Зв'язування зазначених молекул із відповідними рецепторами на поверхні клітин імунної системи (макрофагів, нейтрофілів), ендотеліоцитів та астроцитів ініціює активацію внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, зокрема NF-κB, JAK/STAT та MAPK (ERK, JNK, p38), що в подальшому стимулює експресію генів, пов'язаних з індукцією оксидативного стресу. Ці механізми створюють замкнене патогенетичне коло: цитокінова стимуляція → генерація ROS → активація NF-κB → вторинна продукція цитокінів, що підтримує запальну реакцію навіть за відсутності первинного інфекційного агента. Крім того, ROS активують інфламасомні комплекси (зокрема, NLRP3), що ще більше стимулює секрецію

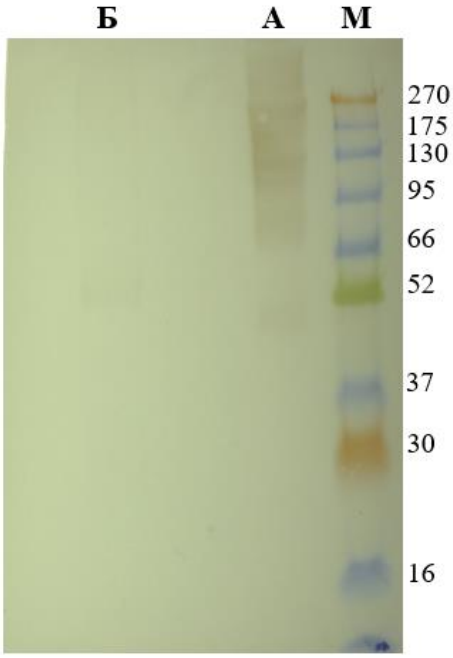
цитокінів, підсилюючи системне запалення. Результатом надмірного утворення ROS є окиснення ліпідів мембран, пошкодження ДНК та окиснювальні модифікації білкових молекул, що веде до активації сигнальних шляхів апоптозу або некроптозу, порушення мітохондріальної функції та зниження клітинної енергетики.

Варто зазначити, що формування ковалентних зв'язків між білками під впливом оксидативного стресу не обмежується лише залишками тирозину, а охоплює широкий спектр амінокислот, що потенційно асоціюється з порушенням нормальної біологічної функції білкових молекул. До таких модифікацій належать зшивання між цистеїном і тирозином, триптофаном, лізином, серином, фенілаланіном; між тирозином і гліцином, гістидином, триптофаном; а також між гістидином і гістидином, аргініном, лізином, та триптофаном і триптофаном.

На користь можливості утворення ковалентних зв'язків із залученням антитіл свідчать результати досліджень Yoo та співавт. (2003), які виявили ковалентні димери IgG2 у сироватці крові людини, проте не провели кількісної характеристики [329]. Розщеплення ціаногенбромідом показало, що один або кілька залишків цистеїну в шарнірній ділянці γ2-ланцюга IgG2 беруть участь у формуванні димерів. Надалі Yang та співавт. (2014) показали, що приблизно 0,4% IgG2 у плазмі крові перебуває у формі ковалентного димеру, тоді як для IgG1 ця частка не перевищує 0,03%, і тому може вважатися незначною або умовно випадковою [330]. Крім того, було встановлено, що ковалентні димери IgG2 здатні формуватися *in vitro* в умовах, які моделюють циркуляторне середовище крові, що підтверджує можливість його утворення *in vivo* під час кровообігу. Отже, невелика частка IgG2 природно існує в ковалентно димеризованій формі.

Тобто, наше припущення про можливість залучення антитіл до формування ковалентних зв'язків з іншими білковими молекулами, особливо за умов перенесеного патологічного процесу, має певне експериментальне підґрунтя.

Використання антитіл проти людських IgG дозволило встановити, що іншим білком у складі комплексів є саме антитіло (рис.7.8).



Кількість білкових смуг	Невідновлювальні умови (А)		Відновлювальні умови (Б)	
	Відносний рівень, %	Мол. маса, кДа	Відносний рівень, %	Мол. маса, кДа
1	7,75	386	6,26	375
2	15,14	322	17,96	283
3	11,91	229	18,79	204
4	18,7	150	7,48	96
5	17,48	118	49,51	51
6	9,08	107	-	-
7	6,89	83	-	-
8	2,62	69	-	-
9	10,42	47	-	-

Рис. 7.8. Блотограма фракції, елюйованої з протеїн А-сефарози: М – маркери молекулярної маси (кДа); А – проба за невідновлювальних умов; Б – проба за відновлювальних умов

Примітка: використано антитіл проти людських IgG

Подібно до алгоритму, використаного нами для оцінки присутності у складі комплексів молекул плазміногенового походження, зразок було проаналізовано за відновлювальних та невідновлювальних умов. Як бачимо, вихідна проба містила низку смуг з молекулярною масою 47 кДа, 69 кДа, 83 кДа, 107 кДа, 118 кДа, 150 кДа, 229 кДа, 322 кДа та 386 кДа, у той час як обробка β-меркаптоетанолом приводила до зникнення частини білкових смуг та появи смуг з молекулярною масою 51кДа, 96 кДа, 204 кДа, 283 кДа, 375 кДа, причому у відсотковому співвідношенні найбільше було білків з молекулярною масою 51 кДа - 49,5%. Так як використані нами антитіла проти людських IgG виявляли специфічність до важких ланцюгів антитіл, ідентифіковані білкові смуги належали саме важким ланцюгам антитіл.

При порівнянні блотограм при використанні антитіл проти людських IgG та антитіл до плазміногену звертає на себе увагу присутність смуг, які детектуються обома антитілами. Це смуги, що відповідають молекулярній масі 47 кДа при

аналізі проби за невідновлювальних умов та смуги з молекулярною масою біля 50 кДа за обробки проби β-меркаптоетанолом. В останньому випадку присутність на блотограмі смуги, що одночасно детектується анти-людськими антитілами та антитілам до плазміногену вказує на те, що ковалентні взаємодії між білками у складі комплексу не є дисульфідними.

У ході аналізу комплексів, очищених із плазми крові донорів, як методом електрофорезу, так і вестерн блоту з використанням антитіл проти людських IgG, було виявлено виразну смугу з молекулярною масою приблизно 150 кДа, що типовим чином відповідає імуноглобулінам класу G. Але враховуючи, що проби піддавалися процедурі двоетапного очищення спершу на бензамідин-сефарозі, далі - на протеїн А-сефарозі виникає обґрунтоване питання щодо природи білка, оскільки стандартно IgG не повинні зв’язуватися з бензамідином, а отже - утримуватись у колонці на цьому етапі.

Однак, з огляду на особливості перебігу патогенезу COVID-19 та імунну дисрегуляцію, не можна виключати можливість, що в кровотоці таких пацієнтів утворюються антитіла з нетиповими властивостями - зокрема, здатні до взаємодії з бензамідином. Таке явище може бути зумовлене формуванням так званих каталітичних антитіл (абзимів), які частково імітують структуру або функції серинових протеїназ. Бензамідин є добре відомим аналогом аргініноподібних субстратів, що селективно зв’язуються з активними центрами серинових протеїназ, його гуанідиноподібна група імітує позитивно заряджену бічну групу аргініну, що дозволяє йому займати S1-сайт каталітичної кишені ферменту.

Таким чином, за умови існування в плазмі антитіл із структурною подібністю до ферментів або з каталізуючою активністю, вони гіпотетично можуть специфічно зв’язуватись із бензамідином, подібно до природних субстратів серинових протеїназ. Після утримання на колонці бензамідин-сефарози, такі антитіла - будучи за природою IgG - не втрачають здатності до взаємодії з протеїн А-сефарозою, що взаємодіє з Fc-доменом імуноглобулінів, і виводяться в остаточному очищеному препараті.

Наявність смуги у 150 кДа у такому випадку потенційно відображає наявність IgG із нетиповими функціональними доменами або аномальною специфічністю до бензамідину. Це спостереження може свідчити про участь атипових імуноглобулінів у патогенезі постковідного синдрому і потребує подальшого поглибленого молекулярного та функціонального вивчення.

Узагальнюючі отримані результати можемо зробити висновок, що до складу частини комплексів, очищених з плазми крові донорів з різними титрами антитіл, входять антитіла та плазміноген і його деградовані форми, які зберегли п’ятий кringл чи/та сериновий протеїназний домен плазміну, а також не виключеною є присутність антитіл зі зміненими структурно-функціональними характеристиками.

На наступному етапі роботи фракцію, отриману після двох стадійного очищення на бензамідин-сефарозі і далі на протеїн А-сефарозі, було нанесено на лізин-сефарозу – носій, який використовують для очищення плазміногену та плазміну. Такий підхід нами було використано, щоб виділити з-поміж пулу комплексів ті, до складу яких входять саме молекули плазміногенового походження. Зв’язування плазміногену з лізин-сефарозою відбувається через лізин-зв’язувальні ділянки, які знаходяться у кринглах і залежно від локалізації у кринглах мають різну спорідненість до залишків лізину. Так, найвищу афінність виявляють ділянки, що розташовані у 1, 2 та 4 кринглах, у той час як п'ятий кringл зв'язує переважно внутрішньомолекулярні залишки лізину [331,332].

Отримані нами результати наведено на рис. 7.9 - електрофоретичний аналіз комплексів, очищених з плазми крові (на прикладі донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C) на бензамідин-сефарозі (рис.7.9А), з подальшим нанесенням на протеїн А-сефарозу (рис.7.9Б) виявив картину, подібну до описаної вище, що є ще одним свідченням відтворюваності результатів по отриманню з плазми крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG.

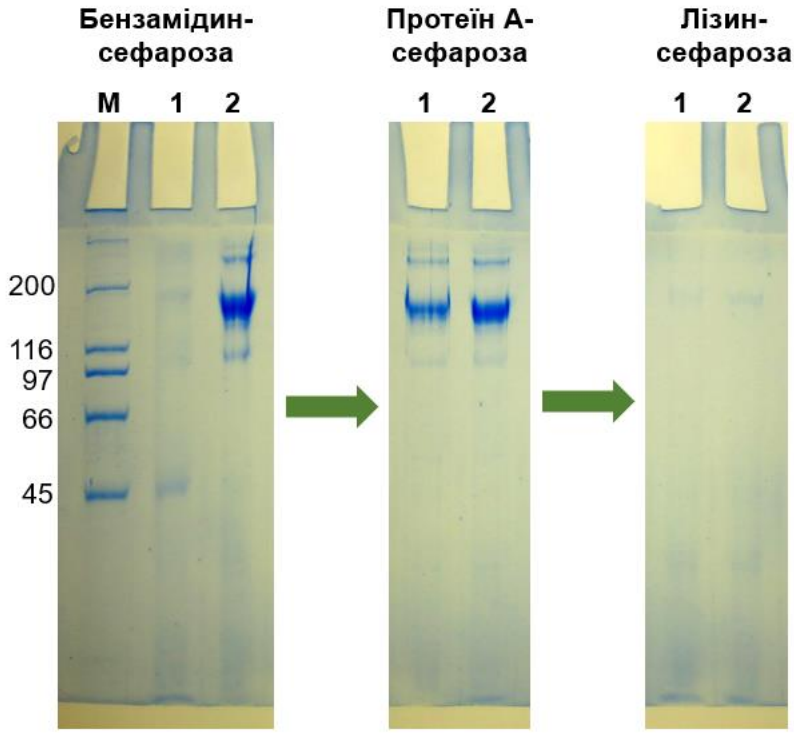


Рис. 7.9. Електрофореграми фракцій, очищених з плазми крові донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 Індекс (S/C): M – маркери молекулярної маси; 1 – незв'язана фракція; 2 – зв'язана фракція

Нанесення фракції, елююваної з протеїн А-сефарози, на лізин-сефарозу (рис.7.9В) дозволило отримати фракцію, що містила декілька білкових смуг. Одна з них відповідає молекулярній масі близько 160-170 кДа і може бути комплексом антитіл з фрагментами плазміногену з молекулярною масою 10-20 кДа; молекулярна маса решти смуг знаходиться вище 200 кДа, що може бути наслідком включення до складу комплексів не лише деградованих форм плазміногену, а і його повно розмірних молекул.

Зазначимо, що подібні смуги було виявлено і у незв'язаній фракції після лізин-сефарози, що може бути обумовлено неналежною сорбційною ємністю використаного нами носія, проте це жодним чином не впливає на інтерпретацію основного результату цього експерименту, а саме того факту, що нами вперше було встановлено присутність у кровотоці осіб, що перенесли COVID-19, нетипових комплексів антитіл з білками, з-поміж яких і молекули

плазміногенового походження. Крім того, наявність білкових смуг у незв'язаній фракції свідчить про присутність білкових комплексів, до складу яких можуть входити компоненти, відмінні від молекул плазміногенового походження. Не виключено, що такими компонентами можуть бути фрагменти протромбіну.

Як додатковий тест, що підтверджує ковалентну природу взаємодій між антитілами та молекулами плазміногенового походження у складі комплексів було використано метод імуноферментного аналізу. Крім того, це дозволило нам порівняти вміст окремих складових комплексів у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Хочемо окремо наголосити, що в лунки плашки для проведення імуноферментного аналізу вносили однакову концентрацію очищених білкових комплексів.

Таблиця 7.2

Рівень молекул плазміногенового походження та рівень антитіл у складі білкових комплексів, очищених з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 (M ± m)

Групи донорів, Індекс (S/C)	За використання антитіл до плазміногену	За використання антитіл проти людських імуноглобулінів класу G	За використання протеїну G
	ум. од/мг білка		
0	0,004±0,0002	0,135±0,0023	0,007±0,0003
10 ± 3	0,233±0,012*	1,156±0,0589*	0,080±0,0043*
75 ± 5	0,142±0,0068*	1,146±0,0400*	0,064±0,0030*
150 ± 5	0,159±0,0072*	1,250±0,0380*	0,130±0,0020*

Примітка: * – $p < 0,05$ різниця значуща у порівнянні з групою донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Використання антитіл до плазміногену підтвердило присутність у складі комплексів молекул плазміногенового походження, причому їх рівень різнився у залежності від титру антитіл проти SARS-CoV-2 (табл.7.2). Так, найнижчий рівень було виявлено у донорів з нульовим титром антитіл – 0,004 ум.од./мг білка.

У донорів з титром 10 ± 3 Індекс (S/C) цей показник був у 58 разів вищим і складав 0,233 ум.од./мг білка.

Для підтвердження присутності у складі комплексів антитіл нами було використано антитіла проти людських імуноглобулінів класу G та протеїн G, кон'югований з пероксидазою хрону (табл.7.2).

При використанні протеїну G, кон'югованого з пероксидазою хрону, найнижчий рівень антитіл, як складових комплексів, було виявлено у донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 - 0,007 ум.од./мг білка. У решті досліджуваних груп донорів рівень детектованих антитіл був суттєво вищим і складав 0,080 ум.од./мг білка, 0,064 ум.од./мг білка та 0,13 ум.од./мг білка, відповідно, для донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C).

При використанні антитіл проти людських імуноглобулінів класу G найнижчий рівень антитіл також було виявлено у донорів з нульовим титром, у той час як найвищий – у групі з титром 10 ± 3 Індекс (S/C) (1,15 ум.од./мг білка). Незважаючи на певні відмінності у рівнях антитіл, визначених при використанні різних систем для детекції, результати, отримані в обох експериментах, доводять присутність у складі комплексів антитіл.

Одним із ключових положень, висунутих у рамках нашого дослідження, є припущення, що у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, циркулюють молекули, які потенційно здатні впливати на функціонуванні окремих органів та систем організму. Як було показано у попередніх розділах роботи, а також підтверджено даними сучасної літератури у постковідному періоді зберігається дисбаланс між про- та протизапальними цитокінами, спостерігається порушення рівноваги у системі антиоксидантного захисту, що супроводжується неконтрольованим протеолізом і, у кінцевому результаті, призводить до модифікації протеому та накопичення структурно-змінених білків. Ці зміни, в сукупності, створюють патофізіологічне середовище, яке сприяє утворенню молекул зі зміненими функціональними характеристиками. У контексті висунутого припущення плазміноген та його деградовані форми у складі

комплексів з антитілами можуть належати до таких ефекторних молекул та виявляти атипову ферментативну активність. Така активність потенційно може відрізнятися від властивостей нативного плазміногену як за субстратною специфічністю, так і за регуляторною чутливістю, що вказує на їхню участь у патогенезі затяжних функціональних порушень у постковідному періоді. Ми не наполягаємо, що другим білком у складі комплексів, що циркулюють у кровотоці, обов'язково має бути плазміноген чи його деградовані форми. Це можуть бути й інші білки як системи гемостазу, так й іншого функціонального спрямування, що потребує подальших уточнюючих досліджень. Отримані комплекси можуть розглядатися як новий клас біологічно активних молекул, що можуть бути задіяні у збереженні чи навіть індукції патологічних процесів на системному рівні.

З метою перевірки цього припущення було досліджено чи виявляють комплекси, очищені з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, здатність до гідролізу специфічного для плазміну хромогенного субстрату. Для отримання більш повної картини, оцінку проводили у зразках без додавання стрептокінази та після інкубації зразків із стрептокіназою. Стрептокіназа, не проявляючи протеолітичної або естеразної активності, здатна активувати плазміноген через утворення активуючого комплексу. Тому її відносять до активаторів непрямої дії або індукторів каталізаторної активності. Згідно з сучасними уявленнями, механізм дії стрептокінази полягає в утворенні комплексу з плазміногеном або плазміном, внаслідок чого латентний або активний центр останніх набуває здатності гідролізувати пептидний зв'язок Арг561-Вал562 вільного або зв'язаного у комплексі плазміногену.

Такий підхід дозволяє оцінити як реальну активність, притаманну молекулам плазміногенового походження у складі комплексів, так і латентну активність, яка може бути реалізована за відповідних умов.

Як видно з рис.7.10, додавання до зразків, що містять очищені комплекси, стрептокінази приводило до зростання значень оптичної щільності проб. Такі результати вказують на присутність у складі комплексів активних ферментів, що здатні розщеплювати хромогенний субстрат, а оскільки нами було використано

субстрат, специфічний для плазміну, то такі результати є ще одним свідченням присутності у складі комплексів молекул плазміногенового походження, які виявляють ферментативну активність.

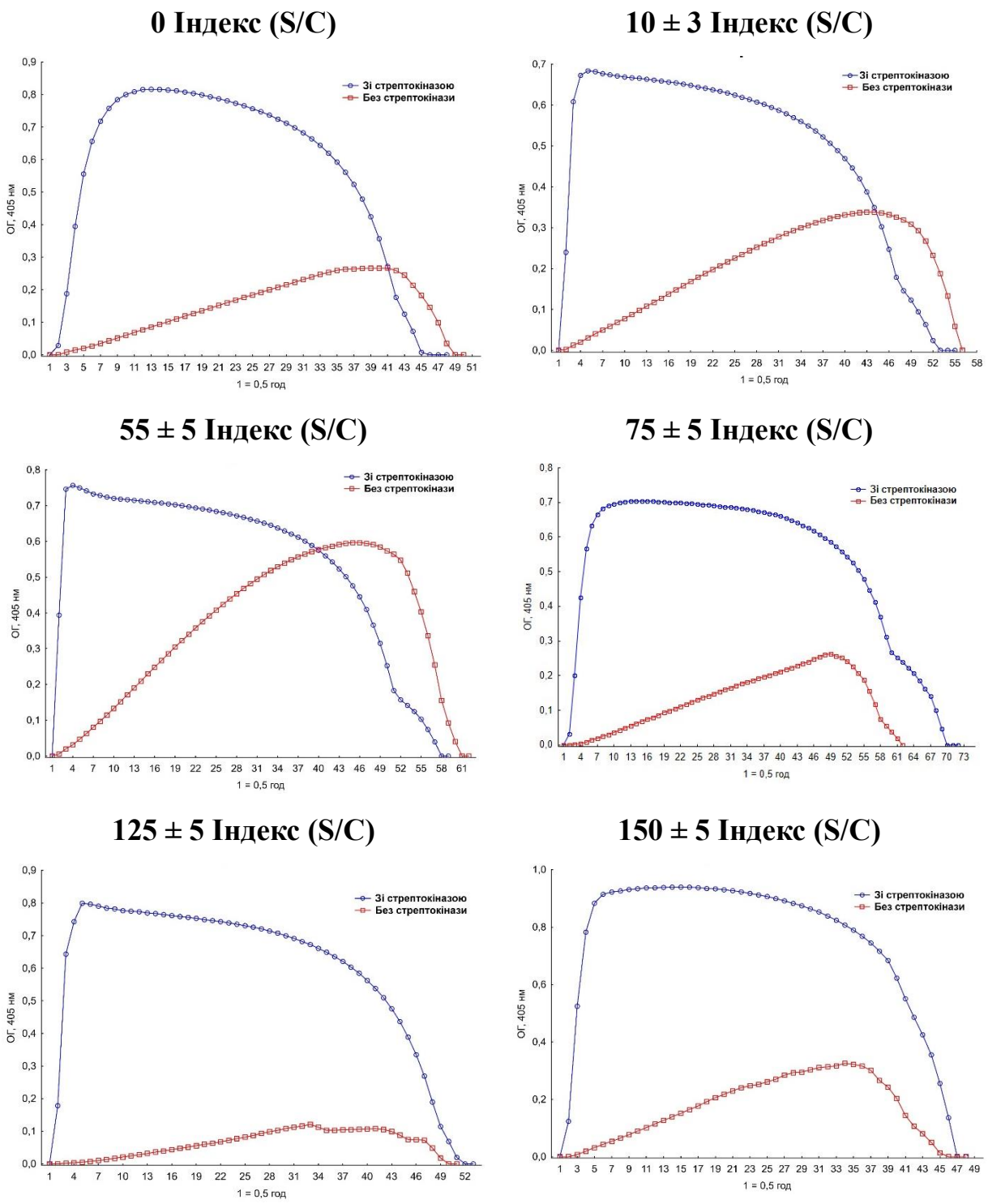


Рис. 7.10. Оптична щільність проб, що містять очищені комплекси, за умов їх інкубації із стрептокіназою та за її відсутності

У цілому картина була схожою для всіх груп донорів і описувалась дзвіноподібною кривою з подовженим спадом. Відмінності між групами донорів стосувалися переважно тривалості плато, максимального значення оптичної щільності проб та часу досягнення максимального значення. Так, у групі донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 максимальне значення оптичної щільності спостерігалося через 5,5 год інкубації і складало близько 0,8 опт. од. Звертає на увагу той факт, що у цій групі донорів зростання оптичної щільності проб відбувалося дещо повільніше, ніж у решті досліджуваних груп – оптична щільність почала зростати лише через годину інкубації із стрептокіназою, у той час як групах донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C) оптична щільність зростала вже через 0,5 год.

Найвище значення оптичної щільності проб складало 0,69 опт. од., 0,79 опт. од., 0,68 опт. од., 0,8 опт. од. та 0,9 опт. од., відповідно, для груп донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C), 125 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C).

Різний час досягнення максимальних значень оптичної щільності та тривалість плато може опосередковано свідчити про доступність для стрептокінази молекул плазміногенового походження. Як показано у роботах [333-335] індукція каталітичної активності плазміногену стрептокіназою відбувається поетапно. На першому етапі стрептокіназа зв'язується із молекулою плазміногену, що викликає певні конформаційні перебудови у протеїназному домені плазміногену з подальшою експозицією каталітичного центру. Можна виокремити дві точки зору щодо механізму формування активного центра в плазміногені за участі різних ділянок молекули стрептокінази. Згідно одної з них, α-аміногрупа N-кінцевого ізолейцину стрептокінази замість аналогічної групи валіну, який з'являється за ферментативного гідролізу активаційного пептидного зв'язку Арг561-Вал562, утворює соляний місток з карбоксильною групою Асп740, що є необхідною умовою дієздатності каталітичної тріади та формування субстрат-зв'язувального центра. Згідно іншої, γ-домен

стрептокінази зв’язується з серин-протеїназним доменом плазміногену в безпосередній близькості від консервативного залишку Ліз698 (156 за нумерацією α хімотрипсиногену), викликає коформаційні зміни цієї ділянки молекули, що забезпечує утворення необхідного соляного містка між Ліз698 та Асп740 [336,337].

Тривале плато на кривих, що описують динаміку прояву ферментативної активності у відповідь на інкубацію із стрептокіназою може відображати процес залучення комплексів стрептокінази з фрагментами плазміногену у процес активації інших молекул плазміногенового походження, адже той факт, що ці молекули у свою чергу входять до складу комплексів з антитілами може створювати певні стеричні перешкоди утруднюючи доступ до ділянок розташування каталітичного домену.

Отже, на основі результатів експерименту з використанням стрептокінази можна зробити декілька висновків: по-перше, це доводить присутність у складі комплексів молекул плазміногенового походження, що містять латентний каталітичний домен – міні-плазміноген, мікро-плазміноген, легкий ланцюг плазміну, а також плазміноген. В результаті утворення комплексу в плазміногені відбуваються конформаційні перебудови, які приводять до формування активного центра і появи каталітичної активності. Різна динаміка прояву максимальної активності по відношенню до хромогенного субстрату частково може бути обумовлена відмінністю якісного складу молекул плазміногенового походження, що входять до складу комплексів. Адже відомо, що стрептокіназа індукує каталітичну активність мікроплазміногену повільніше, ніж глу- чи ліз-плазміногену, а індукція каталітичної активності ліз-плазміногену протікає майже у чотири рази швидше, ніж глу-плазміногену. Гриненко Т.В. показала, що відсутність перших чотироьх або всіх п’яти кринглових доменів, що містять лізин-зв’язувальні ділянки, в молекулі міні- та мікро-плазміногену відповідно, зменшує в 40 разів швидкість їх активації у порівнянні з Ліз-плазміногеном [336]. З іншого боку, повільна динаміка зростання активності у групі донорів з

нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 узгоджується з найнижчим рівнем молекул плазміногенового походження, що було описано нами вище.

По-друге, на основі результатів з використанням стрептокінази можемо припустити, що в утворенні ковалентних зв'язків між антитілами та молекулами плазміногенового походження амінокислотні залишки серинового протеїназного домену плазміногену безпосередньо не задіяні.

По-третє, формування таких взаємодій відбувається на певній відстані від локалізації протеїназного домену, адже стрептокіназа, яка є білком з молекулярною масою 47 кДа, для прояву ефекту має зв'язатися з певними ділянками молекул плазміногенового походження, а відтак ці ділянки мають бути просторово доступними.

Отже, результати, отримані за умов використання стрептокінази, вказують на наявність у складі досліджуваних комплексів молекул плазміногенового походження, які, за певних умов, можуть набувати здатності до прояву ферментативної активності. Така активність може залишатися на рівні потенційної, проте її реалізація за певних фізіологічних чи терапевтичних умов становить потенційну загрозу. Це означає, що в організмі постійно існує "запрограмований" ризик запуску протеолітичних реакцій за участі плазміну, субстратом для якого є не лише фібринові згустки, а й широкий спектр білків, розщеплення яких може спричинити розвиток клінічних проявів або ускладнень, і не лише у контексті дисбалансу системи гемостазу. З огляду на це, даний аспект слід обов'язково враховувати при призначенні пацієнтам, що перенесли COVID-19, тромболітичної терапії, зокрема із застосуванням стрептокінази, яка здатна активувати навіть включені до складу комплексів фрагменти плазміногену.

Водночас, результати, отримані без використання стрептокінази, мають вищу інформативну цінність для оцінки актуального стану донорів, оскільки відображають наявний у кровотоці профіль протеолітичної активності без додаткової зовнішньої активації. Такий підхід дозволяє більш об'єктивно охарактеризувати функціональний статус циркулюючих білкових комплексів на поточний момент часу.

Тому нами було також проаналізовано спонтанну активність молекул плазміногенового походження, що входять до складу комплексів з антитілами, щодо специфічного для плазміну хромогенного субстрату (рис.7.10).

Отримані результати без перебільшення є новітніми та досить провокативними, адже нами вперше показано, що комплекси, очищені з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, виявляють здатність до розщеплення хромогенного субстрату. Характер кривої, що описує залежність прояву ферментативної активності від часу, суттєво відрізнявся від такого при додаванні до проб стрептокінази – спостерігалося значно повільніше зростання темпів прояву активності та значно нижче значення оптичної щільності проб. Так, максимальне значення оптичної щільності було виявлено у часовому проміжку від 16,5 год до 27,5 год, при чому цей показник різнився у залежності від групи донорів.

Найменш виражені зміни було виявлено у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125±5 Індекс (S/C) – 0,1 опт. од. через 16,5 год експерименту. Для донорів з нульовим титром антитіл цей показник складав близько 0,27 опт. од. (через 21 год); донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75±5 Індекс (S/C) – 0,28 опт. од. (через 25 год); донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 150±5 Індекс (S/C) – 0,3 опт. од. (через 17,5 год). Найвищий прояв ферментативної активності спостерігався у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55±5 Індекс (S/C) і складав 0,3 опт. од. на 23 год інкубації з субстратом.

Схожий характер кривих у всіх групах донорів вказує на залучення схожих механізмів, що лежать в основі прояву ферментативної активності молекулами плазміногенового походження у складі комплексів з антитілами.

У цілому, існування спонтанної активності є доволі негативним фактором, який свідчить про існування постійно існуючої загрози, адже серед пулу комплексів антитіл з білками, що знаходяться у кровотоці осіб, які перенесли ковідну інфекцію, присутні й ті, що містять каталітично активні молекули плазміногенового походження, які здатні розщеплювати певний спектр білкових субстратів. І хоча їх активність чи спорідненість щодо тих чи інших субстратів

може бути значно нижчою у порівнянні з проявом активності повноцінної молекули плазміну чи його деградованих форм, постійна присутність таких активних молекул в організмі є одним з чинників, що залучені у формування та/чи підтримання певного патогенетичного фону притаманного для постковідного синдрому.

Слід зазначити, що використання хромогенних субстратів, попри їхню високу чутливість та зручність у стандартних протеолітичних тестах, має низку обмежень. Такі субстрати є синтетичними низькомолекулярними структурами, які відтворюють лише короткі пептидні послідовності, і, відповідно, не здатні адекватно моделювати природні просторово-конформаційні властивості білків крові. З огляду на це, виникає потреба доповнити функціональну оцінку протеолітичної активності використанням нативного білкового субстрату - фібриногену, який є ключовим компонентом системи гемостазу та однією з мішеней для дії плазміну.

Отже доцільно було перевірити, чи зберігають молекули плазміногенового походження у складі комплексів здатність до розщеплення фібриногену. Для того, щоб відповісти на це питання нами було використано метод ензим-електрофорезу з фібриногеном як субстратом, що дає змогу не лише виявити факт гідролізу субстратного білка, а й визначити молекулярну масу комплексів до складу яких входять молекули плазміногену та/чи його деградованих форм, що виявляють активність. Оскільки згідно результатів, описаних вище, молекулярна маса комплексів була вище 200 кДа використання класичного підходу щодо проведення ензим-електрофорезу буде не доцільним так, як білкові комплекси просто не зможуть увійти у гель. Тому нами було використано адаптований підхід, який включав два етапи: 1) розділення проб у 6% ПААГ згідно стандартного протоколу, описаного у відповідному пункті методів дослідження, що дозволило досягти максимального розділення білків (комплексів) у складі проби; 2) подальший електротрансфер на субстратний гель із заполімеризованим у ПААГ фібриногеном. Наступні етапи були ті самі, що використовуються під час проведення ензим-електрофорезу.

Отримані нами результати, представлені на рис.7.11, переконливо свідчать про наявність у складі досліджуваних комплексів протеолітично активних молекул, здатних до гідролізу фібриногену. Як бачимо, молекулярна маса таких комплексів є вищою 130 кДа, що узгоджується з попередніми даними, зокрема з результатами імуноблотингу з використанням антитіл до плазміногену (рис.7.7), відповідно до яких молекули плазміногенового походження були виявлені у складі комплексів з молекулярною масою 166 кДа, 219 кДа, 314 кДа та 363 кДа.

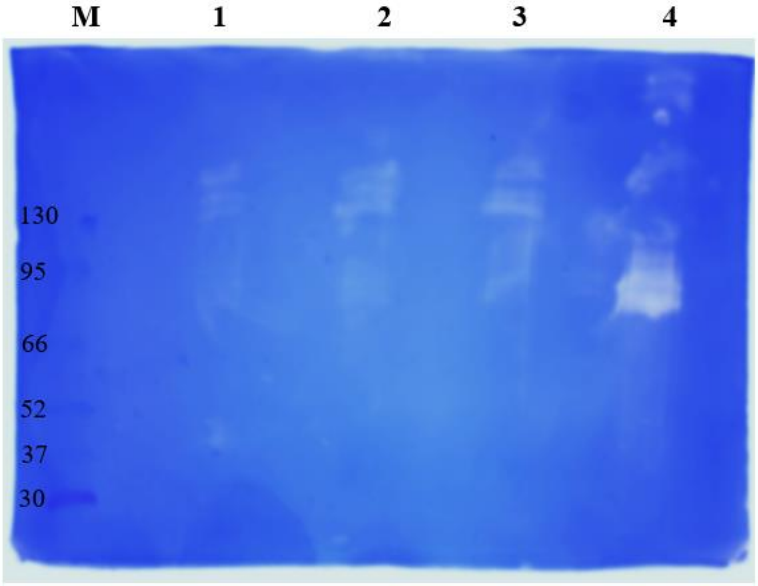


Рис. 7.11. Ензим-електрофореграма фракцій, що містять комплекси антитіл з молекулами плазміногенового походження: М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 0; 2 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 10 ± 3; 3 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C); 75 ± 5; 4 – 150 ± 5

Виявлена різниця в інтенсивності зон гідролізу при аналізі комплексів, очищених із плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, свідчить про існування певної залежності між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та протеолітичною активністю молекул, що входять до складу цих комплексів. Такий зв’язок є надзвичайно важливим з точки зору патофізіології, оскільки фібриноген є не лише ключовим компонентом системи гемостазу, беручи участь у формуванні фібринового згустку, але й відіграє значну роль у

запальних процесах, клітинній адгезії, ангіогенезі та міжклітинній взаємодії. Встановлення здатності комплексів антитіл з білками до специфічного гідролізу фібриногену вказує на їх потенційно патогенетичну функцію, зокрема у контексті постковідної дисфункції судинного та імунного гомеостазу. Більше того, не можна виключати можливості розщеплення й інших білкових мішеней у плазмі або позаклітинному середовищі, що суттєво розширює спектр біологічних ефектів таких комплексів і посилює їх потенційну роль у формуванні хронічних ускладнень після перенесеної SARS-CoV-2-інфекції.

Враховуючи комплексність патогенезу COVID-19 та залучення у перебіг захворювання складних багаторівневих механізмів не виключеним є залучення нетипових механізмів реалізації біологічної активності окремих молекул, у тому числі й прояву активності у складі комплексів. Результати нашого дослідження дозволяють висунути припущення, що плазміногенова складова у частині комплексів, може знаходиться у каталітично неактивному стані в умовах організму. Однак у контексті штучно створених умов інкубації під час проведення експерименту - зокрема при концентруванні проб, зміні відносної стехіометрії білків на одиницю об’єму, їх взаємного просторового розміщення у розчині, а також можливої взаємодії між окремими комплексами, - можуть реалізовуватись умови для відкриття каталітичного центру у частині молекул плазміногенового походження.

На користь такого сценарію свідчить повільна динаміка зростання ферментативної активності у досліджуваних фракціях. У всіх досліджуваних зразках активність щодо хромогенного субстрату проявлялась не раніше ніж через 15 годин інкубації, що узгоджується з гіпотезою про повільний, неферментативно індукований перехід плазміногену в активну форму унаслідок структурних змін або дестабілізації комплексу.

Це дозволяє розглядати виявлену активність не як результат присутності каталітично активних фрагментів плазміногену чи плазміну, а як феномен контекстуально-індукованої активації плазміногену в межах білкових комплексів, що формуються після перенесеного COVID-19. Такий механізм може

мати патогенетичне значення у підтриманні низькорівневого протеолізу у постінфекційному періоді, зокрема за умов тривалої персистенції таких комплексів в організмі.

Результати досліджень, проведених співробітниками Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України [338], що були присвячені вивченню механізмів неканонічної активації плазміногену за участі моноклональних антиплазміногенових антитіл IV-1c, відкривають нові підходи до розуміння потенційної ролі антитіл у модифікації ферментативного потенціалу цього білка. Згідно з даними дисертаційного дослідження Соломінського О.Ю. активація плазміногену в присутності антитіл значною мірою залежить від фізико-хімічних параметрів середовища, зокрема від концентрації протонів. Автор продемонстрував, що кінетика індукції активності в цій моделі відрізняється від класичної pH-залежності, характерної для активації плазміногену стрептокіназою, що вказує на особливий механізм дії антитіл. Також значення має температура за якої протікає реакція та концентрація двох валентних катіонів і аніонів.

Зазначене положення дозволяє пояснити і наші результати - поступове зростання оптичної щільності проб, зафіксоване під час експерименту, може бути наслідком повільної структурної перебудови у межах білкових комплексів, яка супроводжується експозицією каталітичного центру у молекулах плазміногенового походження. Цей процес, ймовірно, індукується або стабілізується взаємодією з антитілами у специфічних умовах модельної системи.

Важливим доповненням до запропонованої моделі є також встановлений у згаданому дослідженні факт, що індукція каталітичної активності плазміногену не є процесом з абсолютною ефективністю. Соломінським О.Ю. було показано, що ймовірність експозиції активного центру у присутності моноклонального антитіла IV-1c становить лише 20%, що свідчить про статистичну природу процесу та наявність внутрішньомолекулярних обмежень у структурі комплексу. Цей акцент на неповній ефективності антитіло-опосередкованої активації

набуває особливого значення в контексті дослідження білкових комплексів постковідної етіології, де аналогічні механізми можуть бути реалізовані *in vivo*.

Не виключено, що в умовах хронічного низькоінтенсивного запалення, оксидативного стресу та локального ацидозу, які притаманні багатьом патологічним станам, у тому числі постінфекційним синдромам, відбувається спонтанна або стабілізована експозиція каталітичних центрів серинових протеїназ, асоційованих з імунними комплексами. Це може мати функціональні наслідки, пов'язані з активацією низькорівневого протеолізу, порушенням контролю за активністю фібринолітичної системи та сприяти хронізації патологічного процесу.

У контексті вище описаного, відмінності у значеннях оптичної щільності досліджуваних проб та часові досягнення максимального прояву активності можуть бути обумовлені різним спектром молекул плазміногенового походження у складі комплексів. Так, згідно з літературними даними [338], індукція каталітичної активності Ліз-плазміногену відбувається після коротшого латентного періоду, незалежно від типу активатора, і характеризується вищою швидкістю активації. Це пов'язано з більш відкритою конформацією Ліз-форми, що забезпечує кращу доступність протеїназного домену для зовнішньої активації. Натомість у випадку протеолітично модифікованого мініплазміногену, який втратив кринґл-домени 1–4, а отже - і лізинзв'язуючі ділянки, каталітична активація за участі антиплазміногенових моноклональних антитіл не реалізується. Це свідчить про необхідність збереження специфічної доменної архітектури молекули для ініціації відповідної структурної перебудови, що веде до активації. Цими ж авторами показано, що впродовж перших годин інкубації Глу-плазміногену з антитілами IV-1c не спостерігається ані його перетворення в Ліз-форму, ані утворення плазміну. Ознаки початку протеолізу з'являються лише після 6 годин, а вже через 20 годин інкубації виявляється значна кількість активного плазміну. Це дозволяє припустити, що взаємодія з антитілом IV-1c індукує конформаційні зміни, які з часом призводять до експозиції активного центру у складі комплексу плазміноген–антитіло IV-1c.

Незважаючи на нижчу, у порівнянні з нативним плазміном, ферментативну активність патогенетичний потенціал молекул плазміногенового походження у складі комплексів може бути досить суттєвим, що обумовлено низкою механізмів.

Перш за все, з огляду на змінену будову деградовані форми плазміногену є функціонально дестабілізованими, а відтак вони більш легко активуються чи мають знижену чутливість до інгібіторів і можуть уникати регуляції за участі канонічних механізмів. Зміна конформації та деградація молекули можуть знижувати її афінність до α2-антиплазміну, основного інгібітору плазміну, внаслідок чого навіть при нормальному рівні інгібітору спостерігається неповне або неефективне пригнічення протеолітичної активності. Це створює умови для неконтрольованого руйнування компонентів екстрацелюлярного матриксу, активації каскадів запалення та розвитку тканинної деструкції. З іншого боку, у зв'язаній з антитілами формі, плазмін чи деградовані форми плазміногену, що містять експонований каталітичний домен, можуть бути механічно захищені від інгібуючої дії α2-антиплазміну, завдяки чому розщеплення субстратів може відбуватися навіть за присутності інгібітору.

По-друге, з огляду на те, що однією з ключових функцій кринґл-доменів у структурі плазміногену є забезпечення специфічної та таргетної взаємодії з субстратними білками, втрата окремих кринглів або їх структурні модифікації неминуче впливають на субстратну специфічність молекули. Така трансформація не лише змінює афінність до фізіологічних мішеней, але й потенційно розширює спектр білкових субстратів, включаючи до нього молекули, які за нормальних умов не розпізнаються плазміном як субстрати. Це створює загрозу активації нефізіологічних протеолітичних каскадів, що можуть реалізовуватись за рахунок «несанкціонованого» розщеплення білкових компонентів екстрацелюлярного матриксу, плазми, клітинних рецепторів чи регуляторних молекул, і таким чином сприяти прогресуванню патологічного процесу неконтрольованими шляхами.

Особливу увагу варто звернути на той факт, що йдеться про молекули плазміногенового походження у складі імунних комплексів з антитілами, які

циркулюють у кровотоці тривалий час. Їх наявність забезпечує тривале збереження протеолітичного потенціалу в умовах системної циркуляції. При цьому такі комплекси можуть транспортуватися з током крові до різних органів і тканин, де стають джерелом локальної ферментативної активності, особливо в разі контакту з активаторами плазміногену або пошкодженими тканинами.

Таким чином, модифіковані або деградовані форми плазміногену, що втрачають регуляторну роль кринглів, можуть чинити системну патогенну дію, зумовлюючи як розширення кола мішеней для гідролізу, так і хронізацію ушкоджень, пов'язаних з неадекватною протеолітичною активністю. Це особливо актуально в контексті пост-COVID патології, де подібні комплекси можуть виступати персистуючим фактором підтримки запалення, судинної дисфункції та тканинного ремоделювання.

Крім того, такі деградовані форми, позбавлені повного набору кринглдоменів, зокрема K1, K4 і K5, можуть набувати відкритої конформації, що є більш схильною до активації незалежно від наявності субстрату (наприклад, фібрину). Відсутність або порушення функції кринглів, які містять лізин-зв'язувальні ділянки, призводить до втрати просторового контролю над активацією плазміногену.

З огляду на те, що йдеться про білкові комплекси, які формуються *in vivo* за умов патологічного стану і відсутні в організмі здорових осіб, не можна виключити можливість, що взаємодія між їхніми складовими призводить до конформаційних перебудов не лише в молекулі плазміногену, а й у структурі антитіл. Подібні конформаційні зміни можуть спричинити появу нових функціональних властивостей, у тому числі каталітичної (ферментативної) активності, яка є нетиповою для антитіл у фізіологічних умовах.

Така гіпотеза узгоджується з сучасними уявленнями про структурну пластичність білків та потенціал антитіл до набуття абзимоподібних функцій у специфічному мікросередовищі. Song та співавт. у роботі [339] наводять опис ферментативної активності, подібної до активності ангіотензинперетворювального ферменту 2 (ACE2), яка асоційована з

імуноглобулінами у пацієнтів, інфікованих SARS-CoV-2. Автори висловлюють гіпотезу, згідно з якою у частини пацієнтів можуть формуватись антитіла з каталітичною активністю - так звані абзими, здатні впливати на ключові протеолітичні регуляторні каскади. Рецепторзв'язувальний домен (RBD) спайкового білка SARS-CoV-2 зв'язується з ACE2 на поверхні клітини-господаря, що вказує на те, що RBD є своєрідним молекулярним негативом ACE2, тобто має просторову структуру, комплементарну до ділянки зв'язування ACE2, що забезпечує специфічність їхньої взаємодії. Відповідно, деякі антитіла, спрямовані проти RBD, можуть мати просторову комплементарність, подібну до ACE2, і таким чином набути каталітичної активності, подібної до ACE2. Іншими словами, частина анти-RBD антитіл може функціонувати як ACE2-подібні абзими, здатні втручатися у фізіологічні процеси організму. Такий механізм може частково пояснювати патогенетичну складність клінічних проявів COVID-19 та, можливо, довготривалі постінфекційні порушення.

Нещодавні комп'ютерні аналізи структурної гомології між антигенами SARS-CoV-2 та протеомом людини виявили наявність кількох спільних епітопів. Зокрема, у дослідженні Kanduc та співавт. було ідентифіковано декілька лінійних гексапептидних епітопів, які демонструють збережену гомологію між білками SARS-CoV-2 та 460 білками людини [340]. Інші наукові групи, використовуючи дещо відмінні методологічні підходи, також повідомляють про наявність у білках SARS-CoV-2 ділянок, які можна розглядати як «гарячі точки молекулярної мімікрії» [341,342].

Отже, не виключено, що серед пулу комплексів, очищених з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV, може бути частина комплексів, у складі яких антитіла характеризуються нетиповими властивостями, зокрема виявляють здатність до розщеплення низькомолекулярних субстратів.

Очищені нами білкові комплекси з плазми крові донорів, що перенесли SARS-CoV-2-інфекцію, можуть репрезентувати не лише функціонально активні форми, зокрема, здатні до прояву протеолітичної активності, але й інертні

молекулярні утворення, що, попри свою функціональну пасивність, можуть чинити істотний вплив на системи гомеостатичної регуляції.

Така дія зумовлена низкою їхніх структурно-функціональних характеристик: високою стабільністю, потенційною імуногенністю, а також здатністю до сорбції та індукованої перебудови інших розчинних білків - як функціонально повноцінних, так і вже дестабілізованих продуктів білкового метаболізму.

Варто наголосити, що зазначені білкові комплекси можуть виступати в ролі своєрідних молекулярних матриць або "ядер" агрегації, індукуючи процеси структурування нерозчинних білкових депозитів шляхом конформаційного нав’язування власної структури розчинним білкам - механізму, аналогічного до пріоноподібного поширення неправильно згорнутих білків.

У цьому контексті наявність подібних структур у кровотоці може вважатися перманентним джерелом ендогенної дестабілізації білкового пулу, що не лише ускладнює підтримку гомеостазу, але й створює передумови для розвитку або поглиблення патологічних процесів, асоційованих з хронічним запаленням, мікротромбозом або дисфункцією кліренсних систем.

За даними [343,344] порушення процесів обміну білка у кровотоці пацієнтів веде до локального накопичення білкових і пептидних компонентів та розвитку ендогенної інтоксикації. Особливо виражені порушення білкового метаболізму спостерігаються при нейродегенеративних захворюваннях (хвороба Альцгеймера, Паркінсона, Хантінгтона), для яких характерне формування стабільних нерозчинних агрегатів, зокрема фібрилярного β-амілоїду, тау-протеїну чи α-синуклеїну [345]. Також порушений катаболізм білків спостерігається при атеросклеротичному судинному запаленні [346]. Подібні процеси можуть мати місце й при системних запальних та аутоімунних патологіях, де активне утворення активних форм кисню та азоту, а також порушення антиоксидантного захисту, сприяють формуванню ковалентних зшивок, таких як дитирозинові зв’язки. В умовах тривалого запалення та

ендогенної інтоксикації ці агрегати стають стійкими до фізіологічного протеолізу.

Окрему увагу слід звернути на порушення білкового обміну при інфекційних захворюваннях, зокрема при SARS-CoV-2-інфекції. Сучасні дослідження свідчать про формування в крові таких пацієнтів білкових комплексів з ознаками підвищеної стабільності, нерозчинності та імуногенності, що містять білки гострої фази, фібрин, компоненти комплементу, фібринолітичні інгібітори (наприклад, α_2-антиплазмін). Утворення подібних структур корелює з порушенням системного гомеостазу, зокрема коагуляційного балансу, і може сприяти формуванню зшитого, резистентного до плазміну фібрину, що, в свою чергу, обумовлює зниження ефективності тромболітичної терапії. У світлі зазначеного, білкові комплекси можуть розглядатися не лише як маркери порушення обміну, але і як активні патогенетичні чинники, здатні викликати структурну дестабілізацію протеому, ініціювати хронічне запалення, порушення кліренсу та тканинну деструкцію.

Отже, у рамках виконаного дослідження вперше було отримано та комплексно охарактеризовано білкові комплекси з плазми крові донорів, які перенесли COVID-19, з фокусом на компоненти плазміногенового походження у взаємодії з антитілами. Проведене афінне очищення з використанням специфічних носіїв (протеїн А-сефароза, бензамідин-сефароза, лізин-сефароза) дало змогу виявити наявність ковалентних циркулюючих комплексів, до складу яких входять фрагменти плазміногену, антитіла, а у ряді випадків й інші білкові молекули, що мають спорідненість до бензамідин-сефарози.

Функціональна активність виявлених комплексів була підтверджена як через активацію плазміногену за допомогою стрептокінази, так і за відсутності активаторів, що свідчить про можливість прояву спонтанної протеолітичної активності у циркуляторному руслі. Це вказує на потенційний ризик формування в організмі постійної загрози неконтрольованого фібринолізу з можливими наслідками у вигляді тканинних ушкоджень або мікросудинних ускладнень. Аналіз очищених комплексів, зокрема, за допомогою методів електрофорезу у

ПААГ за денатуруючих умов та вестерн блотингу показав наявність як повнорозмірного плазміногену, так і його деградованих форм, що потенційно позбавлені окремих кринґл-доменів чи містять модифіковані домени. Це дозволяє припустити зміщення конформаційної рівноваги у бік активнішої або менш контрольованої форми, з можливою втратою афінності до природних інгібіторів (наприклад, α2-антиплазміну) та набуттям нових субстратних специфічностей.

Особливу увагу заслуговує потенційна імуногенність та підвищена стабільність отриманих комплексів. У контексті постковідних станів, наявність таких циркулюючих комплексів може сприяти тривалій дисрегуляції гомеостазу, підтриманню запального фону, формуванню мікротромбозів та зниженню ефективності тромболітичної терапії. Результати дослідження підкреслюють важливість врахування зазначених молекулярних механізмів при веденні пацієнтів, які перенесли тяжку або тривалу форму COVID-19, зокрема у разі призначення тромболітиків.

РОЗДІЛ 8
ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД У ПАЦІЄНТІВ З РОЗСІЯНИМ СКЛЕРОЗОМ ТА ОСТЕОАРТРИТОМ

Останній розділ роботи присвячений дослідженню стану системи гемостазу у пацієнтів із РС та ОА. РС є аутоімунним захворюванням, тоді як ОА класифікується як дегенеративна патологія, однак обидві патології характеризуються хронічним запаленням, яке може впливати на коагуляційний гомеостаз. Необхідність такого дослідження зумовлена результатами, отриманими у попередніх розділах роботи, де було виявлено тісний взаємозв'язок між системою гемостазу та запальними процесами у осіб, які перенесли COVID-19. Зокрема, нами описано формування нетипових білкових комплексів у плазмі крові таких пацієнтів, що потенційно може виступати додатковим чинником, який поєднує запалення, порушення ліпідного обміну та активацію системи зсідання крові в єдиний патогенетичний механізм. Крім того, вивчення системи гемостазу у таких пацієнтів у постковідний період є важливим, оскільки COVID-19 асоціюється з порушеннями коагуляції, а зазначені патології самі по собі можуть супроводжуватися змінами у гемостатичному балансі. Поєднання постковідного синдрому з аутоімунним або дегенеративним фоном може підвищувати ризик тромботичних ускладнень, що обґрунтовує необхідність моніторингу та дослідження гемостатичних показників у цій популяції пацієнтів.

РС - це хронічне аутоімунне демієлінізуюче захворювання центральної нервової системи, патогенез якого пов'язаний із дисрегуляцією імунної відповіді, хронічним запаленням та ураженням ендотелію. Згідно з офіційною статистикою, станом на 2020 рік у світі налічувалося близько 2,8 млн осіб, хворих на РС [347,348]. Переважну частку пацієнтів становлять особи молодого віку: середній вік дебюту захворювання коливається в межах 29–33 років. На жаль,

уже через 10–15 років від моменту встановлення діагнозу близько 50 % хворих зазнають виражених порушень моторної функції та втрачають працездатність, що істотно знижує якість їхнього життя [349].

В основі розвитку РС лежать аутоімунні механізми, за яких імунна система пацієнта помилково розпізнає власні структури як чужорідні та спрямовує імунну відповідь проти мієлінової оболонки аксонів. Руйнування мієліну порушує провідність нервових імпульсів і призводить до дисфункції відповідних нейронних шляхів [350]. Як наслідок, у хворих виникає широкий спектр неврологічних розладів: від порушень моторної активності, координації та рівноваги до погіршення когнітивних функцій, а у тяжких випадках - до втрати зору та розвитку паралічу. Різноманітність клінічних проявів зумовлена множинністю вогнищ демієлінізації та варіаціями їх локалізації в межах різних відділів центральної нервової системи [347].

У пацієнтів із РС часто виявляють ознаки активації системи гемостазу та зміненої функції судинного ендотелію, що розглядається як один із компонентів нейрозапального процесу. Наявність системного запального фону, імунної дисфункції та, у деяких випадках, тривалого прийому імуносупресивних препаратів створює умови для стійкого дисбалансу між прокоагуляційними та антикоагуляційними механізмами.

Разом з тим, інфекція SARS-CoV-2, особливо у гострій фазі COVID-19, супроводжується вираженою активацією коагуляційного каскаду, підвищенням рівнів фібриногену, D-димеру та маркерів тромбінемії, а також зниженням активності природних антикоагулянтів, таких як антитромбін III та протеїн С.

У постковідний період, навіть після зникнення клінічних симптомів, у частини пацієнтів зберігаються ознаки підвищеної схильності до коагуляції. У попередніх розділах нашої роботи було встановлено, що у постковідний період, навіть за умови успішного подолання гострої фази захворювання, у значної частини осіб зберігаються порушення у функціонуванні коагуляційного каскаду, які протікають на тлі зниження активності фібринолізу. Такі зміни формують

підвищений ризик розвитку тромботичних станів, що можуть виникати віддалено від моменту інфікування SARS-CoV-2.

Крім того, нами було виявлено присутність у кровотоці реконвалесцентів імунних ковалентних комплексів, до складу яких входять антитіла та інші білкові молекули, зокрема білки плазміногенового походження. Водночас не виключається наявність у складі цих комплексів й інших білкових молекул. Вперше у нашому дослідженні показано, що такі комплекси не є інертними утвореннями - вони виявляють біологічну активність, а відтак здатні на перебіг окремих процесів та певною мірою визначати спрямованість змін в організмі осіб, що перенесли ковід. Тому їх присутність може виступати додатковим фактором ризику рецидивів та ускладнень, особливо у осіб, які вже мають хронічні захворювання з імунозалежним патогенезом, зокрема таких, як РС.

Для хворих на РС поєднання хронічного аутоімунного процесу з постковідними змінами гемостазу може мати кумулятивний ефект, посилюючи активаційний стан коагуляційної системи, поглиблюючи ендотеліальну дисфункцію та створюючи додаткові передумови для мікро- і макротромбозів. Імунозапальні механізми, притаманні РС, можуть модифікувати відповідь організму на SARS-CoV-2, а також впливати на відновлення коагуляційного балансу після інфекції.

Таким чином, дослідження стану системи гемостазу у постковідний період у осіб із розсіяним склерозом є актуальним з точки зору розуміння патофізіологічних механізмів взаємодії аутоімунного процесу та постковідних ускладнень. Зважаючи на це, наступним завданням роботи було провести комплексну оцінку стану системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом, які перенесли COVID-19, з метою встановлення механізмів коагуляційних порушень та оцінки їхнього внеску у розвиток постковідних ускладнень у цієї вразливої категорії хворих.

Оцінювання показників біохімічного аналізу крові є рутинним інструментом як на початковому етапі діагностики, так і в процесі лікування, оскільки воно дозволяє не лише охарактеризувати ефективність терапії, але й своєчасно

виявити можливі супутні ускладнення на ранніх стадіях. Зважаючи на те, що біохімічний аналіз крові є інформативним методом лабораторної діагностики, який дає змогу оцінити загальний стан пацієнта та виявити порушення у функціонуванні внутрішніх органів і систем, його результати можуть слугувати цінним індикатором змін у перебігу хвороби. Порівняльний аналіз показників біохімічного аналізу крові у хворих на РС, які мали або не мали в анамнезі підтверджений діагноз COVID-19, відкриває можливість виявити специфічні зміни, зумовлені перенесеною коронавірусною інфекцією, а також встановити потенційні біомаркери, що сигналізують про модифікацію стану хворого під впливом SARS-CoV-2. Такий підхід може стати вдалою вихідною точкою для подальшого дослідження патогенезу РС у постковідному періоді та допоможе визначити пріоритетні напрями майбутніх досліджень, спрямованих на глибше розуміння механізмів розвитку патології.

Таблиця 8.1

Загальна характеристика осіб, які брали участь у дослідженні

Критерій	Відносно здорові донори (n = 30)	Хворі на розсіяний склероз	
		Не хворіли на COVID-19 I група (n = 56)	Після COVID-19 II група (n = 41)
Вік, роки	41,3 ± 5,5	41,3 ± 5,5	40,2 ± 5,6
Стать			
чоловіки, n (%)	10 (33)	20 (36)	14 (34)
жінки, n (%)	20 (67)	36 (64)	27 (66)
Тривалість захворювання, роки	-	4,4 ± 1,5	4,6 ± 1,3
Індексанти SARS-Cov-2 антитіл, S/C	< 1,40 (негативний)	< 1,40 (негативний)	70 ± 8 (позитивний)

Зазначимо, що у дослідженні взяли участь 127 осіб, серед яких 97 пацієнтів із діагнозом РС та 30 відносно здорових донорів, підібраних за віком і статтю з метою відповідності основній групі. Загальна характеристика обстежених осіб

представлена у таблиці 8.1. На момент забору крові всі учасники - як донори, так і пацієнти з РС - були додатково обстежені на наявність антитіл до SARS-CoV-2 для верифікації факту інфікування у випадках можливого безсимптомного або прихованого перебігу коронавірусної хвороби (табл.8.1).

Результати проведених досліджень наведено у таблиці 8.2. Встановлено, що у пацієнтів із РС за відсутності підтвердженого COVID-19 в анамнезі (I група) спостерігалися наступні зміни показників біохімічного аналізу крові порівняно з групою відносно здорових донорів: зниження концентрації креатиніну на 30 % ($p < 0,05$) та сечової кислоти на 40 % ($p < 0,05$); зниження рівнів окремих ліпідних фракцій, зокрема ліпопротеїнів дуже низької щільності та триацилгліцеролів, - на 45 % і 40 % відповідно ($p<0,05$); зменшення активності лужної фосфатази (ЛФ) на 25 % ($p<0,05$) та лактатдегідрогенази на 35 % ($p < 0,05$). У 50 % пацієнтів цієї групи відзначалося підвищення концентрації феритину у 2,7 рази ($p< 0,05$) відносно значень у групі відносно здорових донорів, тоді як у решти 50 % рівень цього показника залишався у межах норми. Концентрація СРБ у сироватці крові пацієнтів із РС I групи була на 83 % вищою ($p<0,05$), ніж у контрольній групі. Інші показники біохімічного аналізу кровіу пацієнтів із РС I групи знаходилися у межах фізіологічної норми (табл.8.2).

Аналогічні зміни показників біохімічного аналізу крові були виявлені й у пацієнтів із розсіяним склерозом, які протягом останніх 4–7 місяців перенесли інфекцію SARS-CoV-2 (II група) (табл.8.2). Для основних параметрів - концентрацій креатиніну, сечової кислоти, ЛПДНЩ, триацилгліцеролів, СРБ, а також активності лужної фосфатази та лактатдегідрогенази - достовірної різниці між I та II групами не виявлено, що свідчить про ймовірну зумовленість цих змін патогенетичними механізмами РС, незалежно від перенесеної коронавірусної інфекції.

Варто зазначити, що згідно результатів наших попередніх досліджень [351] у осіб, які перенесли COVID-19, спостерігаються зміни показників ліпідного обміну, причому характер цих змін залежить від рівня антитіл до SARS-CoV-2. Порушення метаболізму ліпідів, може сприяти розвитку серцево-судинних

захворювань та посиленню системного окисного стресу. Крім того, воно, ймовірно, спричиняє поширене запалення, активує систему комплементу та запускає каскад згортання крові.

Для пацієнтів ІІ групи були зафіксовані певні особливості, зокрема, підвищення амілазної активності на 58 % ($p<0,05$) та зниження концентрації феритину у 3 рази ($p<0,05$) порівняно з показниками у групі відносно здорових донорів.

Таблиця 8.2

Біохімічні показники плазми крові донорів (M±SD)

Показник	Відносно здорові донори (n = 30)	Хворі на розсіяний склероз	
		І група (n = 56)	ІІ група (n = 41)
Загальний білок, г/л	59,10 ± 7,02	60,22 ± 3,69	60,60 ± 3,63
Альбумін, г/л	41,17 ± 3,57	39,69 ± 2,50	38,28 ± 2,21
Креатинін, мкмоль/л	70,45 ± 6,24	51,90 ± 5,19*	57,96 ± 6,22*
Сечовина, мкмоль/л	4,25 ± 0,56	4,24 ± 1,14	4,14 ± 0,46
Загальний білірубін, мкмоль/л	9,07 ± 1,13	9,54 ± 2,61	7,84 ± 1,21
Прямий білірубін, мкмоль/л	1,97 ± 0,43	2,28 ± 0,63	1,81 ± 0,36
Непрямий білірубін, мкмоль/л	7,00 ± 1,22	7,43 ± 1,99	6,00 ± 1,00
Сечова кислота, мкмоль/л	331,40 ± 17,51	199,03 ± 25,02*	210,67 ± 34,53*
Холестерин, ммоль/л	4,50 ± 0,61	4,53 ± 0,89	4,00 ± 0,83
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,43 ± 0,02	0,24 ± 0,02*	0,29 ± 0,04*

Продовження табл. 8.2

ЛПНЩ, ммоль/л	2,51 ± 0,34	2,72 ± 0,72	2,19 ± 0,49
ЛПВЩ, ммоль/л	1,16 ± 0,23	1,75 ± 0,27	1,52 ± 0,44
ТАГ, ммоль/л	0,95 ± 0,06	0,57 ± 0,03*	0,64 ± 0,08*
Коефіцієнт атерогенності	1,92 ± 0,51	1,94 ± 0,70	1,70 ± 0,50
АлАТ, Од/л	16,18 ± 3,26	12,27 ± 1,87	12,99 ± 1,54
АсАТ, Од/л	20,96 ± 3,17	15,06 ± 1,66	17,84 ± 2,17
ГГТ, Од/л	15,17 ± 4,96	8,26 ± 2,00	13,15 ± 2,79
ЛФ, Од/л	49,56 ± 2,49	36,57 ± 3,60*	33,90 ± 1,05*
ЛДГ, Од/л	165,83 ± 14,48	112,92 ± 15,15*	113,94 ± 8,06*
Амілаза, Од/л	38,08 ± 4,21	33,40 ± 2,08	51,63 ± 3,78*#
Трансферин, г/л	2,14 ± 0,30	2,46 ± 0,33	2,13 ± 0,20
Феритин, мкг/л	42,44 ± 1,10	115,0 ± 7,7* (50 %) 35,34 ± 9,48 (50 %)	14,22 ± 4,24*#
С-реактивний білок, мг/л	0,42 ± 0,09	0,77 ± 0,20*	0,68 ± 0,11*

Примітка: * – $p < 0,05$ порівняно з показниками групи умовно здорових донорів, # – $p < 0,05$ порівняно з показниками I групи хворих на РС

Узагальнюючи отримані результати може зробити висновок, що обидві групи пацієнтів мають аналогічні зміни досліджуваних показників порівняно з показниками здорових донорів. Відсутність статистично значущих відмінностей між показниками біохімічного аналізу крові у пацієнтів із розсіяним склерозом, які мали або не мали підтверджений COVID-19 в анамнезі, свідчить про відсутність прямого взаємозв'язку між перенесеною інфекцією SARS-CoV-2 та змінами більшості досліджуваних параметрів. Водночас, серед отриманих результатів привертає увагу різноспрямована динаміка концентрації феритину в пацієнтів із РС до та після перенесеного COVID-19, що може відображати відмінності у перебігу метаболічних і запальних процесів у цих групах.

Цікавими виявилися результати, отримані при оцінці амілазної активності у сироватці крові пацієнтів із розсіяним склерозом. У хворих I групи (без підтвердженого COVID-19 в анамнезі) цей показник перебував у межах референтних значень, тоді як у пацієнтів II групи він був статистично вищим порівняно як із відносно здоровими донорами, так і з хворими на РС, які не перенесли SARS-CoV-2. α-Амілаза крові розглядається як один із ключових біохімічних маркерів ушкодження підшлункової залози. Дані попередніх досліджень свідчать про існування зв'язку між інфекцією SARS-CoV-2 та дисфункцією органів шлунково-кишкового тракту, зокрема підшлункової залози [352]. Висувається гіпотеза, що гострий панкреатит у пацієнтів із COVID-19 може бути зумовлений як прямим цитопатичним впливом вірусу через локальну реплікацію в тканинах, так і опосередковано - внаслідок гіпоксії та надмірної продукції прозапальних цитокінів під час гіперзапальної відповіді. Водночас остаточні механізми ураження підшлункової залози при COVID-19 залишаються невизначеними, що обумовлює актуальність подальших досліджень цього напряму для поглиблення розуміння впливу інфекції SARS-CoV-2 на перебіг РС.

Останнім часом зростає увага до факторів згортання крові як потенційних тригерів нейродегенеративних процесів при РС [353]. Показано, що у пацієнтів із РС підвищується проникність гематоенцефалічного бар'єра, внаслідок чого окремі фактори згортання, зокрема фібриноген, можуть проникати в паренхіму головного мозку та відкладатися в його тканинах, відіграючи важливу роль в активації запалення у центральній нервовій системі, пригніченні процесів тканинної репарації та індукції утворення вогнищ ураження [354,355]. Такі дані надають вагомі підстави вважати фібриноген складовою патологічного каскаду, що призводить до нейрональної дисфункції при РС. Водночас роль інших факторів згортання у прогресуванні нейрональних уражень залишається недостатньо з'ясованою. З іншого боку, система гемостазу є одним із критичних мішеней для інфекції SARS-CoV-2 [356].

Тому, комплексне дослідження рівнів фібриногену, протромбіну, РФМК, плазміногену, ТАП, ПАІ-1 та показників функціональної активності

антитромбіну III, протеїну С і ТМ у пацієнтів із РС, які перенесли COVID-19, є актуальним і науково обґрунтованим. Таке дослідження сприятиме покращенню розуміння окремих патологічних механізмів, що можуть бути залучені до прогресування хвороби у постковідний період.

Відповідно до отриманих результатів, у плазмі крові пацієнтів із РС спостерігалося підвищення рівня двох основних факторів згортання - протромбіну та фібриногену (рис.8.1).

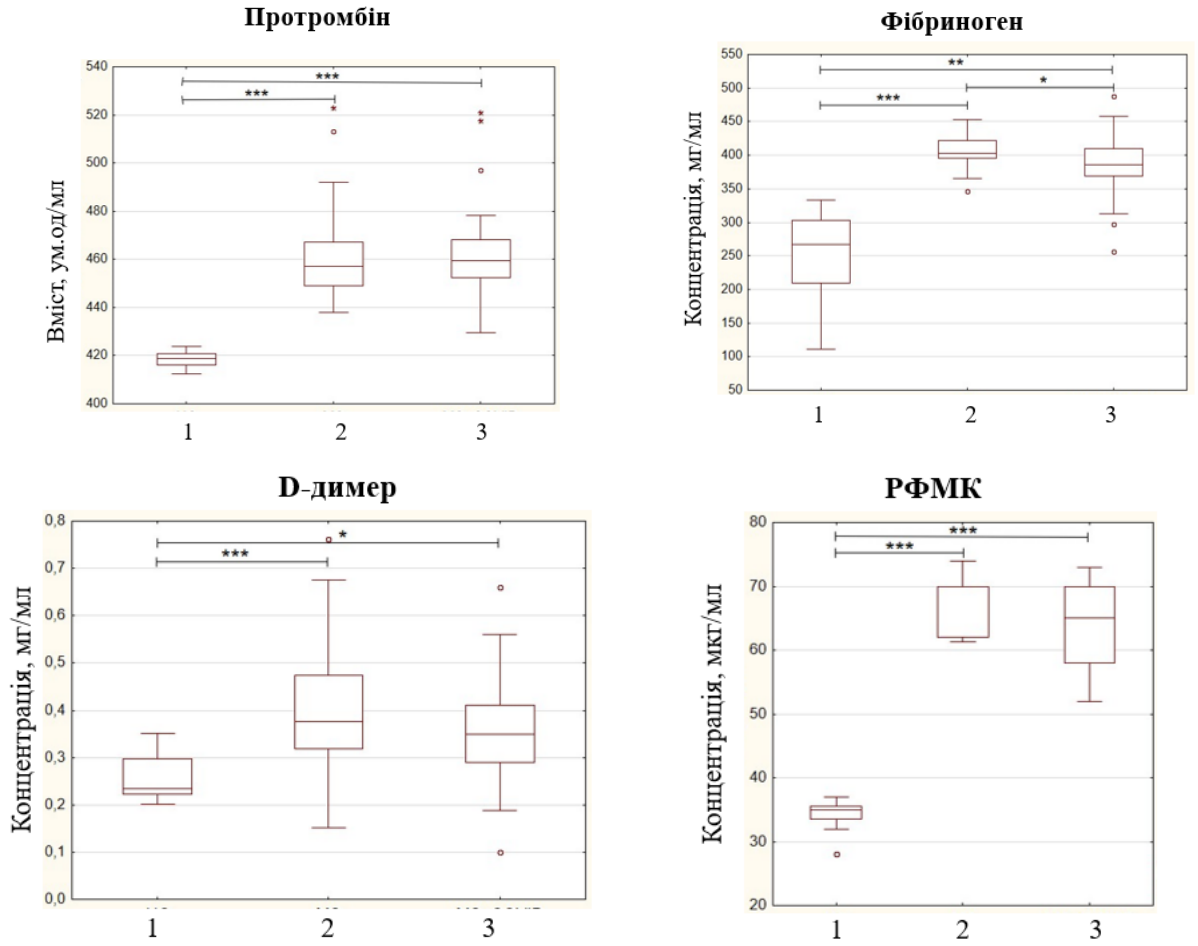


Рис. 8.1. Ключові показники, що характеризують стан коагуляційної ланки системи гемостазу у пацієнтів з розсіяним склерозом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з розсіяним склерозом; 3 – пацієнти з розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19 (середнє значення ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** $p<0,001$; ** $p\leq0,005$; * $p<0,01$

Як видно з наведених даних, коронавірусна інфекція не впливала на рівень протромбіну при РС, проте у пацієнтів із РС, які раніше перенесли інфекцію SARS-CoV-2, було відзначено незначне зниження концентрації фібриногену. Подібні зміни можна пояснити впливом вірусної інфекції на проникність гематоенцефалічного бар'єра, що, у свою чергу, може призводити до підвищеної інфільтрації фібриногену з сироватки у тканини головного мозку [357].

Поява D-димерів у плазмі крові пацієнтів із РС (рис.8.1) свідчить про наявність продуктів деградації фібрину, а також вказує на активацію як коагуляційного каскаду (через утворення тромбіну), так і фібринолітичного каскаду (через утворення плазміну). Важливо зазначити, що істотних відмінностей у рівнях як D-димерів, так і розчинних фібрин-мономерних комплексів у пацієнтів із РС, які раніше перенесли інфекцію SARS-CoV-2, порівняно з пацієнтами із РС без COVID-19 в анамнезі, виявлено не було.

Рівень протеїну С у плазмі крові, який відіграє ключову роль як антикоагулянт шляхом інактивації факторів згортання Va та VIIIa [358], був достовірно нижчим у групі пацієнтів із РС, що перенесли COVID-19, порівняно з групами відносно здорових донорів та пацієнтів із РС, які не мали в анамнезі коронавірусної інфекції (рис.8.2).

Отримані нами результати узгоджуються з даними попередніх досліджень [359] і можуть свідчити про те, що інфекція SARS-CoV-2 супроводжується станом гіперкоагуляції та є фактором ризику розвитку венозної тромбоемболії.

Нами було виявлено підвищені рівні розчинного ТМ у пацієнтів із РС (рис.8.2), що може бути наслідком запального процесу. Також встановлено достовірну різницю у рівні тромбомодуліну у пацієнтів з РС після перенесеної інфекції SARS-CoV-2, що може пояснюватися підвищенням ступеня ушкодження ендотеліальних клітин, а також інтенсифікацією запалення. Подібні зміни можуть слугувати предиктором несприятливих серцево-судинних наслідків у постковідний період у пацієнтів із РС.

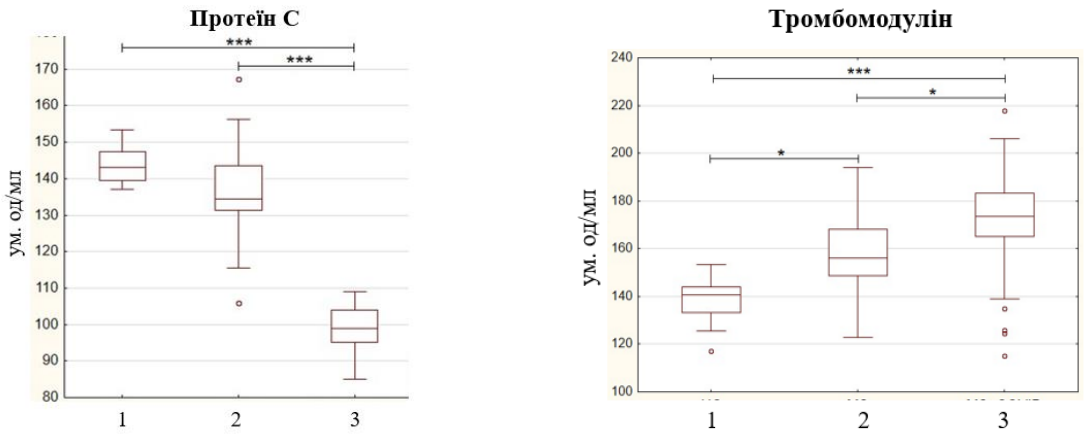


Рис. 8.2. Рівень протеїну С та тромбомодуліну у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з розсіяним склерозом; 3 – пацієнти з розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19 (середнє значення ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** p<0,001; ** p≤0,005; * p<0,01

На рис.8.3 наведено результати визначення рівня плазміногену та його потенційної активності (А і Б відповідно) у плазмі крові пацієнтів із РС та групі відносно здорових донорів. Отримані дані показали, що в обох групах пацієнтів із РС рівень плазміногену у плазмі був достовірно знижений порівняно з групою здорових донорів (p < 0,0001); водночас цей показник не мав статистично значущих відмінностей між групами РС та РС+COVID (p = 0,59). Крім того, у пацієнтів з РС рівень потенційної активності плазміногену був знижений порівняно з результатами у групі відносно здорових донорів (p = 0,0008). У той же час рівень потенційної активності плазміногену у пацієнтів із РС, які перенесли COVID-19, суттєво не відрізнявся від відповідного показника у відносно здорових донорів.

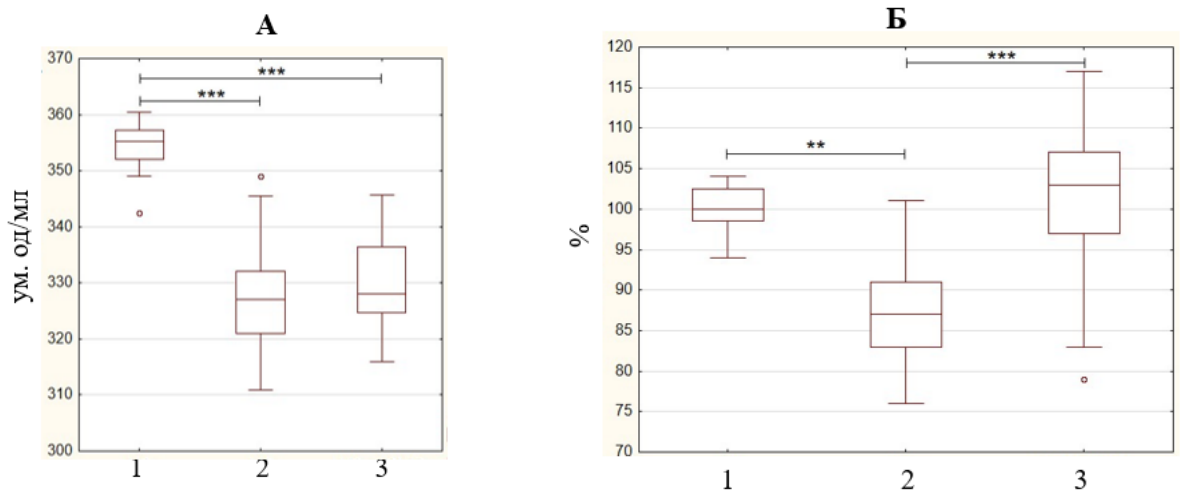


Рис. 8.3. Рівень плазміногену (А) та його потенційна активність (Б) у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з розсіяним склерозом; 3 – пацієнти з розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19 (середнє значення ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** $p<0,001$; ** $p\leq0,005$; * $p<0,01$

Також нами було проаналізовано рівень ТАП та ПАІ-1 (рис.8.4.А та 8.4Б відповідно) та виявлено, що рівень ТАП був достовірно знижений у плазмі крові пацієнтів з РС ($p = 0,0003$) та тих, хто перенесли COVID ($p < 0,0001$) порівняно із результатами у групі відносно здорових донорів. Водночас різниці між обома групами пацієнтів з РС виявлено не було ($p = 1,00$). Порівняно зі відносно здоровими донорами, у пацієнтів із РС, незалежно від наявності в анамнезі коронавірусної інфекції, спостерігався підвищений рівень ПАІ-1 ($p<0,0001$). Однак цей показник не мав статистично значущих відмінностей між двома групами РС ($p = 0,53$).

Відмінності також були виявлені у рівнях активності α-2-антиплазміну у пацієнтів із РС порівняно з відносно здоровими донорами (рис.8.4В). Так, у пацієнтів групи РС рівень активності α-2-антиплазміну в плазмі був підвищеним ($p = 0,012$). Варто зазначити, що у пацієнтів із РС, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2, активність α-2-антиплазміну в плазмі відрізнялася ще більш значуще як від групи здорових донорів, так і від групи РС ($p<0,0001$ та $p<0,0001$ відповідно).

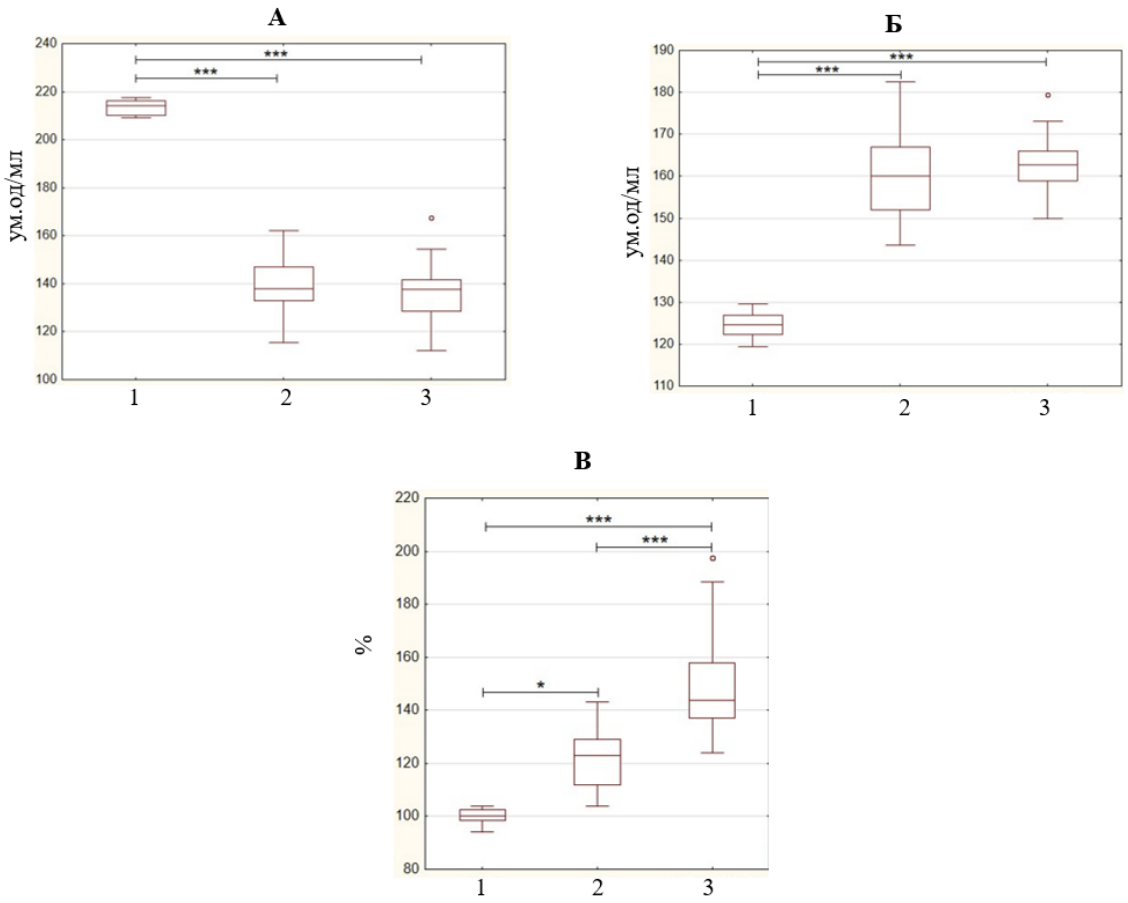


Рис. 8.4. Рівень ТАП (А), ПАІ-1 (Б) та відносний інгібіторний потенціал α2-антиплазміну (В) у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з розсіяним склерозом; 3 – пацієнти з розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19 (середнє значення ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** $p<0,001$; ** $p\leq0,005$; * $p<0,01$

У цілому знижені рівні плазміногену та ТПА у пацієнтів із РС узгоджуються з даними попередніх досліджень [357,360], однак точного пояснення таких змін наразі не існує. Можна висунути кілька припущень: по-перше, плазміноген із плазми може дифундувати через ушкоджений гематоенцефалічний бар'єр у паренхіму головного мозку; по-друге, плазмовий плазміноген може перетворюватися на активну форму - плазмін - та залучатися до утворення комплексів плазмін-α2-антиплазмін. Друга гіпотеза узгоджується з результатами, що свідчать про підвищену активність α2-антиплазміну у пацієнтів із РС.

Наші результати вказують на існування змін у системі гемостазу у пацієнтів із РС, проте роль окремих компонентів коагуляційного та фібринолітичного каскадів у патофізіології цього захворювання залишається до кінця не з'ясованою. Встановлено, що перенесена інфекція SARS-CoV-2 чинить обмежений вплив на гемостатичний профіль хворих на РС, зумовлюючи статистично значущі зміни лише рівнів протеїну С, тромбомодуліну та активності α_2-антиплазміну. Отримані дані узгоджуються з ранніми повідомленнями про здатність COVID-19 модифікувати параметри системи гемостазу. Водночас виявлені зміни можуть мати патогенетичне значення у контексті імунної активації та прогресування уражень ЦНС, що вимагає подальших досліджень для з'ясування молекулярних механізмів цих процесів та їхньої ролі у формуванні постковідних ускладнень у пацієнтів із РС.

Остеоартрит є найпоширенішим дегенеративним захворюванням суглобів, яке характеризується прогресуючим ураженням хрящової тканини, ремоделюванням субхондральної кістки та хронічним низькорівневим запаленням. Сучасні дослідження свідчать, що системне запалення при ОА не обмежується лише суглобовою тканиною - воно супроводжується змінами у судинній стінці та системі гемостазу [361,362]. У пацієнтів із ОА часто виявляють підвищення рівня фібриногену, D-димеру та маркерів активації тромбоцитів, що може вказувати на хронічний гіперкоагуляційний стан.

Особливої уваги заслуговує оцінка стану гемостазу у пацієнтів з ОА, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2. Відомо, що COVID-19 значною мірою впливає на судинну систему та систему згортання крові, спричиняючи ендотеліальну дисфункцію, тромбоутворення та викликаючи дисбаланс між про- і антикоагуляційними чинниками. Для пацієнтів з ОА поєднання двох чинників - хронічного низькорівневого запалення та постковідних коагуляційних порушень - може мати синергічний ефект, поглиблюючи гіперкоагуляцію та підвищуючи ризик тромботичних ускладнень, включно з венозною тромбоемболією та ішемічними подіями. Запальний компонент ОА сприяє активації ендотелію та тромбоцитів, а наслідки COVID-19 можуть підтримувати цей стан через

персистенцію цитокінів, аутоантитіл та імунних комплексів, що взаємодіють із білками гемостазу.

Таким чином, оцінка рівня/активності ключових факторів системи згортання крові та фібриногенолітичної системи у пацієнтів з остеоартритом, які перенесли COVID-19, є важливою не лише для розширення наукових знань, а й для покращення клінічних алгоритмів ведення таких хворих у постковідному періоді.

У дослідженні взяли участь 36 пацієнтів (24 жінки та 12 чоловіків) віком 39-80 років зі встановленим діагнозом ОА колінного суглоба, які перебували на амбулаторному лікуванні в ортопедичній спеціалізованій клініці «Медичний центр Ортоклініка» м. Тернопіль, Україна. На етапі відбору всім хворим на ОА проведено рентгенологічне дослідження колінних суглобів у стандартній передньо-задній та бічній проекціях, у положенні стоячи без навантаження на досліджуваний суглоб при згинанні коліна на 30°. Стадію ураження суглоба визначали за допомогою класифікації Kellgren-Lawrence. Для оцінки функціонального статусу пацієнтів з ОА колінного суглоба розраховували індекс за опитувальником WOMAC (Western Ontario та McMaster Universities).

Спочатку було оцінено параметри коагуляційної ланки системи гемостазу у хворих на остеоартрит після перенесеної SARS-CoV-2 інфекції. Оцінку прокоагуляційної активності проводили за визначенням вмісту та активності протромбіну, а також за вмістом РФМК. Виявлено, що в плазмі крові хворих на ОА спостерігалося зниження вмісту та пригнічення активності протромбіну: концентрація цього фактору згортання крові знижувалася на 27% порівняно з результатами у групі відносно здорових донорів ($p<0,001$), тоді як активність знижувалася на 54% ($p<0,001$).

Після інфікування SARS-CoV-2 у плазмі крові пацієнтів з патологією суглобів вміст та активність протромбіну підвищувалися на 19% та 91% відповідно, порівняно з особами, які не хворіли на COVID-19, при цьому значення активності досліджуваного показника досягало контрольного рівня,

тоді як його вміст залишався нижчим, ніж у плазмі здорових донорів на 13% (p<0,01) (рис.8.5).

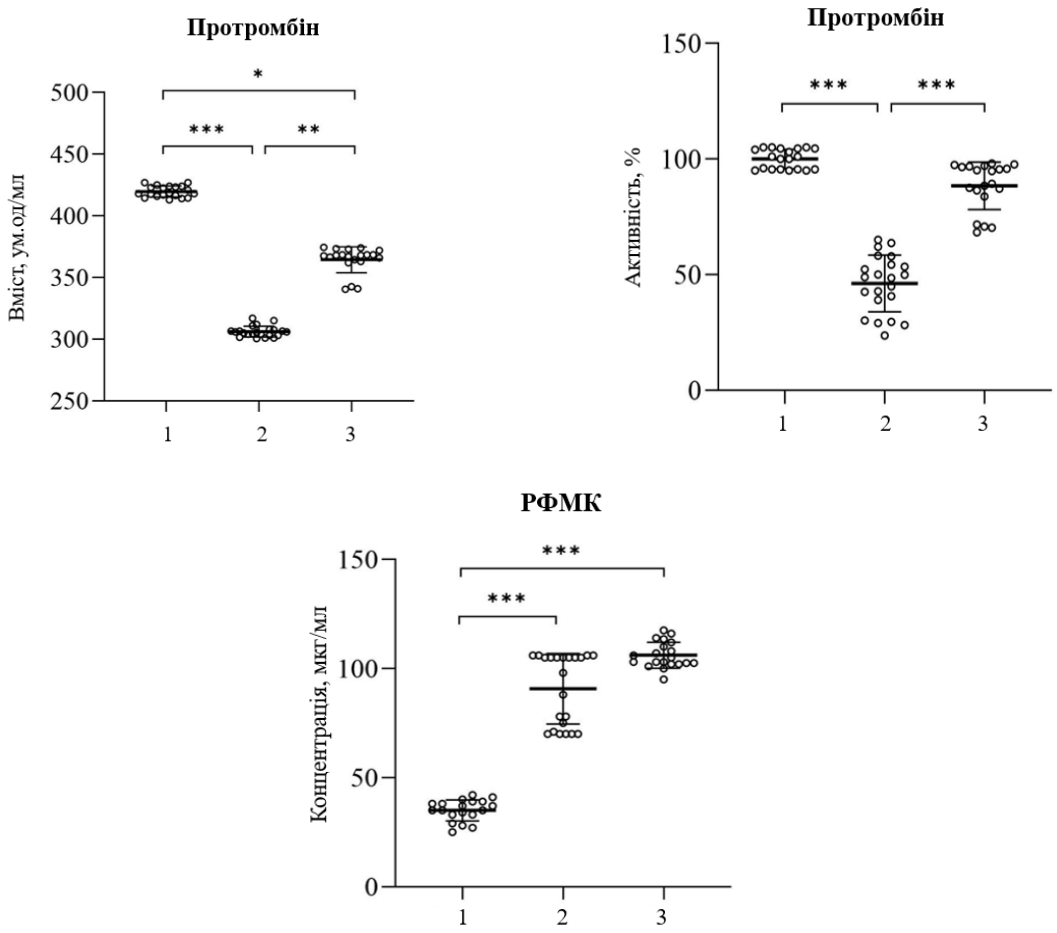


Рис. 8.5. Ключові показники, що характеризують стан коагуляцційної ланки системи гемостазу у пацієнтів з остеоартритом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19 (M ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** p<0,001; ** p≤0,005; * p<0,01

Зниження вмісту протромбіну та пригнічення його активності може бути наслідком порушення функцій печінки, де синтезується більшість білків системи згортання крові, запального процесу, нейрогормональної активності, що призводить до активації системи згортання крові в період гострої фази вірусного захворювання, або розвитку супутнього патологічного стану організму, з подальшим виснаженням факторів згортання крові в пост-інфекційному періоді,

або при хронічному запаленні. Гіпопротромбінемія, яку виявлено в обох експериментальних групах хворих на ОА, може бути вторинним проявом внаслідок зниження продукції або збільшення споживання білкового фактору плазми крові. Більш виражена гіпопротромбінемія у хворих групи ОА може бути обумовлена дефіцитом вітаміну К, який необхідний для синтезу протромбіну в гепатоцитах, і зниженням рівня інших прокоагуляційних факторів (факторів VII, IX і X), та антикоагулянтів (протеїну С та протеїну S), функціонування яких залежить від вітаміну К [363]. Відомо, що вітамін К може впливати на кальцифікацію суглобового хряща через карбоксилювання матриксного білка гамма-карбоксиглутамінової кислоти, який експресується в хондроцитах, і уповільнювати прогресування ОА або запобігати його виникненню [364]. Регуляція експресії гена протромбіну також важлива, оскільки навіть незначні зміни в експресії генів можуть призвести до клінічно значущої тромбофілії [365]. Слід зазначити, що тромбін діє не просто як медіатор коагуляції або антикоагуляції, а скоріше як сигнальна молекула для контролю запалення. Численні хемокіни/цитокіни регулюють утворення тромбіну при ОА. У хрящі або синовіальній оболонці підвищена експресія тромбіну та активованих ним внутрішньоклітинних сигнальних шляхів тісно пов'язані із запаленням та його медіаторами, що також може сприяти прогресуванню ОА [366].

Інформативним тестом для виявлення активації системи згортання крові є визначення вмісту РФМК. У нашому дослідженні виявлено достовірне підвищення концентрації РФМК у обох досліджуваних групах пацієнтів з ОА: на 159% та 227% відповідно, порівняно з відносно здоровими донорами ($p < 0,001$). Варто зазначити, що вміст РФМК у плазмі пацієнтів з ОА, які перенесли COVID-19, мав тенденцію до підвищення відносно групи з ОА без супутньої інфекції, однак ці відмінності не були статистично значущими (рис.8.5).

Надалі було проаналізовано деякі показники антикоагуляційної та фібринолітичної ланок системи гемостазу, оскільки наразі доведено, що ці компоненти відіграють важливу роль не лише в регуляції згортання крові, а й у низці інших біологічних процесів, таких як деградація позаклітинного матриксу,

міграція клітин, ремоделювання тканин, ангіогенез, запалення та імунна відповідь. Стан антикоагуляційної ланки оцінювали за рівнем і активністю протеїну С, активністю антитромбіну АТ ІІІ та вмістом ТМ.

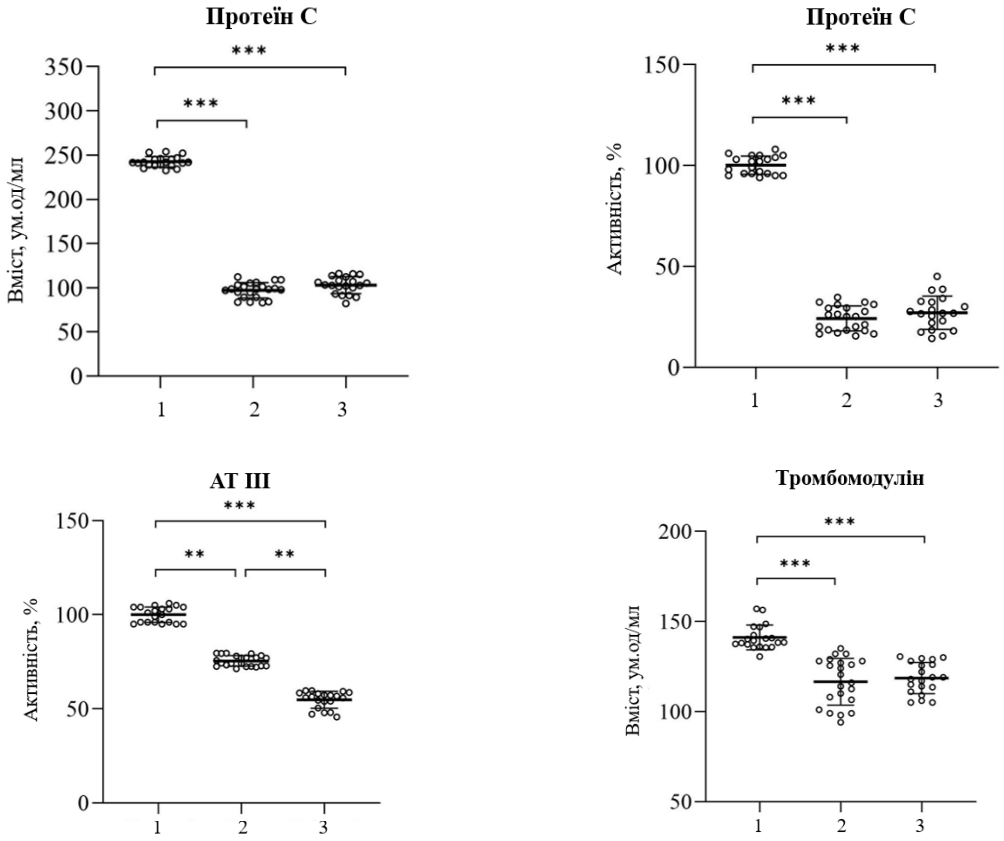


Рис. 8.6. Ключові показники, що характеризують стан антикоагуляційної ланки системи гемостазу у пацієнтів з остеоартритом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19 (M ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** p<0,001; ** p≤0,005; * p<0,01

Отримані результати свідчать про зниження антикоагуляційного потенціалу крові як у пацієнтів з ОА, що перенесли COVID-19, так і в осіб без перенесеної інфекції SARS-CoV-2. Зокрема, виявлено зниження концентрації протеїну С у плазмі крові на 59% та 57% у групах ОА та ОА з COVID-19 відповідно (рис.8.6), а також пригнічення його активності на 75% та 72% відповідно. Активність АТ

III знижувалася на 24% та 44% у відповідних групах ($p \leq 0,005$ та $p < 0,001$), а концентрація ТМ - на 17% та 15% відповідно (рис.8.6; $p < 0,001$). При порівнянні груп ОА та ОА з COVID-19 статистично значущих відмінностей у наведених показниках не виявлено, за винятком більш вираженого зниження активності АТ III у постковідних пацієнтів з ОА - на 26% ($p \leq 0,005$) (рис.8.6).

Зазначимо, що як і у випадку з протеїном С, функція АТ III може бути порушена внаслідок зниження синтезу, збільшення споживання або посиленої деградації протеолітичними ферментами, такими як нейтрофільна еластаза [367]. Більш виражене пригнічення активності АТ III у пацієнтів з ОА, які перенесли COVID-19, може бути результатом вірусного пошкодження гепатоцитів та їх цитолізу, що, за даними Shafiq та співавт. [368], спостерігалося майже у половини пацієнтів з інфекцією SARS-CoV-2. При захворюваннях печінки в плазмі знижується як рівень протромбіну, так і АТ III [369]. Крім того, при запальних і деструктивних захворюваннях білки гострої фази утворюють комплекси з АТ III, і тим самим викликають його вторинну недостатність. Прозапальні цитокіни можуть спричиняти зниження синтезу ендогенних глікозаміногліканів, таких як гепарансульфат, на поверхні ендотелію, викликаючи порушення функцій АТ III [370]. Все більше доказів свідчать про те, що АТ III притаманна протизапальна дія незалежно від антикоагуляційної активності [371].

Наші попередні дослідження [372] показали, що у пацієнтів з ОА, а також у тих, хто переніс інфекцію SARS-CoV-2 6-9 місяців тому, спостерігався дисбаланс у плазмових рівнях прозапальних та протизапальних цитокінів. Системна дерегуляція цитокінового профілю супроводжувалася зниженням плазмових рівнів проангіогенних факторів росту, найбільш виражено у випадках фактору VEGF та PDGF, які виступають важливими регуляторами пошкодження/відновлення тканин, і є ключовими ланками у патофізіології як ОА, так і COVID-19 [373]. Функціональна активність різних компонентів системи гемостазу, ангіогенез і запалення взаємозалежна і чітко регульована, що свідчить про взаємозв’язок між цими ланками [374].

З метою оцінки функціонального потенціалу системи фібринолізу в організмі пацієнтів з ОА та після перенесеної інфекції SARS-CoV-2 було визначено вміст і активність плазміногену, активність α_2-АП, концентрацію та активність ТАП, а також рівень ПАІ-1 у плазмі крові донорів (рис.8.7).

Отримані результати вказують на зниження концентрації плазміногену, його тканинного активатора та ПАІ-1 як у плазмі пацієнтів з ОА, що перенесли COVID-19, так і у пацієнтів без вказаної інфекції в анамнезі. Так, вміст плазміногену в плазмі хворих на ОА, а також у пацієнтів з ОА у постковідному періоді був нижчим порівняно з умовно здоровими донорами на 74% та 69% відповідно ($p<0,001$); при цьому достовірної різниці між групами ОА та ОА з COVID-19 не виявлено (рис.8.7). Зниження концентрації плазміногену в плазмі крові донорів обох груп, що, ймовірно, може бути результатом як зниження синтезу цього глікопротеїну, так і витрат на утворення плазміну при активації фібринолізу, супроводжувалося підвищенням його активності. Відомо, що після перетворення і зв'язування з фібрином відбуваються конформаційні зміни в структурі плазміногену, що підвищує сприйнятливість плазміногену до активації.

У плазмі крові донорів обох досліджуваних груп виявлено зниження вмісту ТАП на 7% та 26% порівняно з групою умовно здорових донорів ($p\leq0,005$ та $p<0,001$ відповідно), а також зниження рівня ПАІ-1 - на 32% та 25% відповідно ($p<0,001$). Слід зазначити, що концентрація ТАП у плазмі пацієнтів із ОА, які перенесли COVID-19, була на 20% нижчою порівняно з пацієнтами без інфекції SARS-CoV-2 ($p\leq0,005$), тоді як у випадку ПАІ-1 достовірних відмінностей між групами ОА та ОА з COVID-19 не виявлено. Отримані експериментальні дані щодо зниженого рівня плазміногену, ТАП та його інгібітору ПАІ-1 у плазмі крові донорів з ОА, а також тих, хто переніс COVID-19, свідчать про зниження фібринолітичного потенціалу крові.

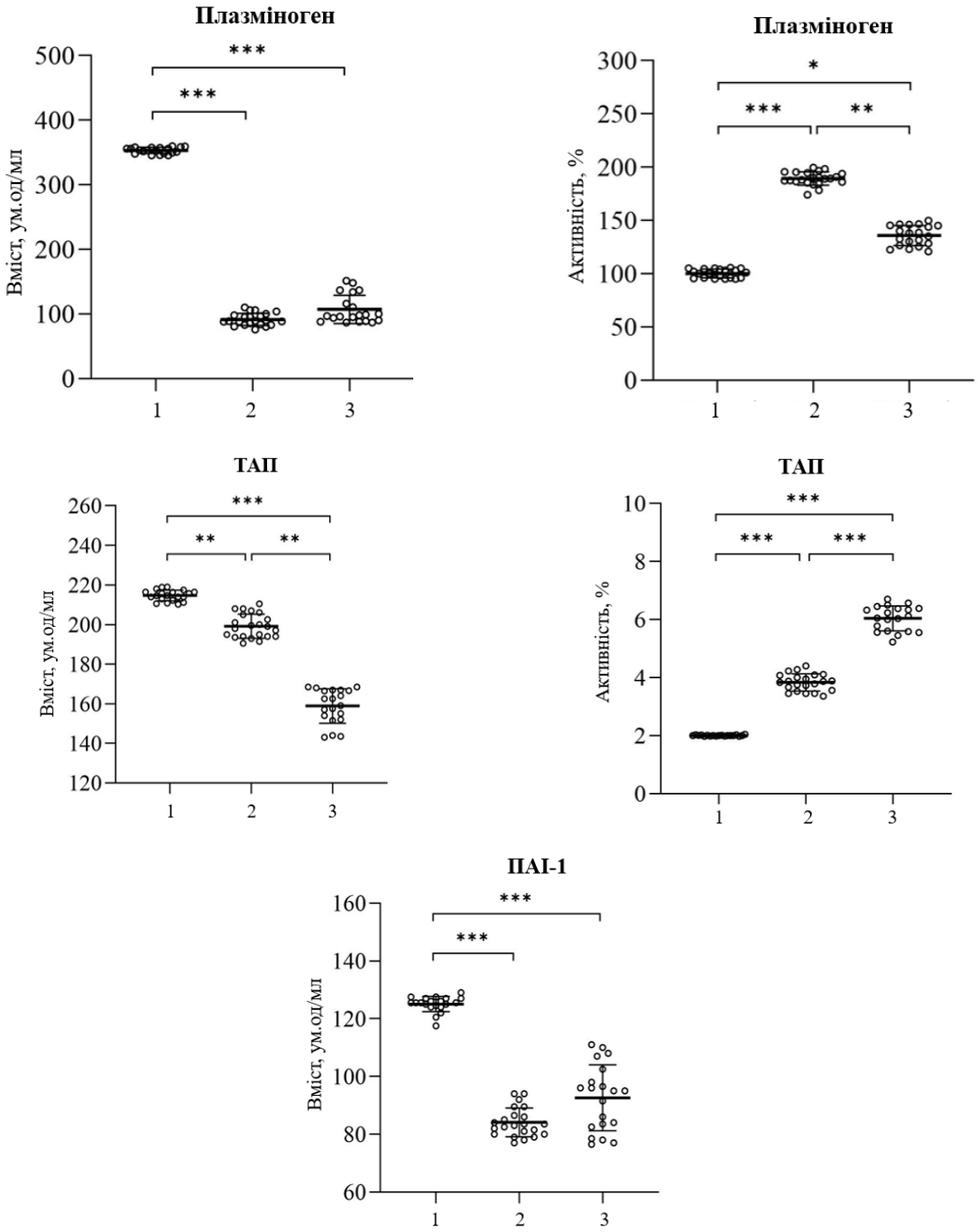


Рис. 8.7. Вміст та активність окремих факторів системи фібринолізу у пацієнтів з остеоартритом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19 (M ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** $p<0,001$; ** $p\leq0,005$; * $p<0,01$

На тлі зниження концентрації плазміногену та його тканинного активатора в плазмі крові донорів обох груп з ОА було виявлено підвищення активності

зазначених показників. Зокрема, активність плазміногену в плазмі пацієнтів групи ОА зросла на 88%, а в групі ОА з COVID-19 - на 35% порівняно з відносно здоровими донорами ($p<0,001$ та $p<0,01$ відповідно); при цьому активність ТАП у хворих на ОА збільшилась на 92%, а у пацієнтів із супутнім постковідним синдромом — на 202% відносно контролю ($p<0,001$). Водночас, у віддалений період після перенесеної COVID-19-інфекції спостерігалося зниження активності плазміногену на 28% порівняно з показниками у пацієнтів з ОА без перенесеної інфекції SARS-CoV-2 ($p\leq0,005$), тоді як активність ТАП за таких умов продовжувала зростати - на 57% ($p<0,001$) (рис.8.7).

При аналізі інгібіторного потенціалу α_1-АТ та α_2-МГ було виявлено протилежно спрямовані зміни. Так, інгібіторний потенціал α_1-АТ у пацієнтів з ОА знизився на 35% порівняно з відносно здоровими донорами ($p\leq0,005$), тоді як у групі пацієнтів з ОА, які перенесли COVID-19 виявлено ще більш виражене пригнічення цього показника - на 66% порівняно з відносно здоровими донорами ($p<0,001$) та на 48% відносно показників групи ОА ($p\leq0,005$) (рис.8.8).

Виявлене зниження інгібіторного потенціалу α_1-АТ у хворих на ОА може бути наслідком підвищення активності протеїназ на тлі хронічного процесу в організмі, пов'язаного із захворюванням суглобів та тривалим системним запаленням, спричиненим перенесеною інфекцією SARS-CoV-2. Відомо, що активність α_1-АТ знижується при наявності хронічного запалення, яке розцінюється як виснаження гальмівного потенціалу плазми крові. При зв'язуванні протеїнази з α_1-АТ в комплекс, α_2-МГ видаляється з кров'яного русла, що призводить до недостатньої інгібуючої активності плазми крові. Також окиснення залишку метіоніну в активному центрі інгібітору призводить до втрати його здатності контролювати активність протеїнази [375].

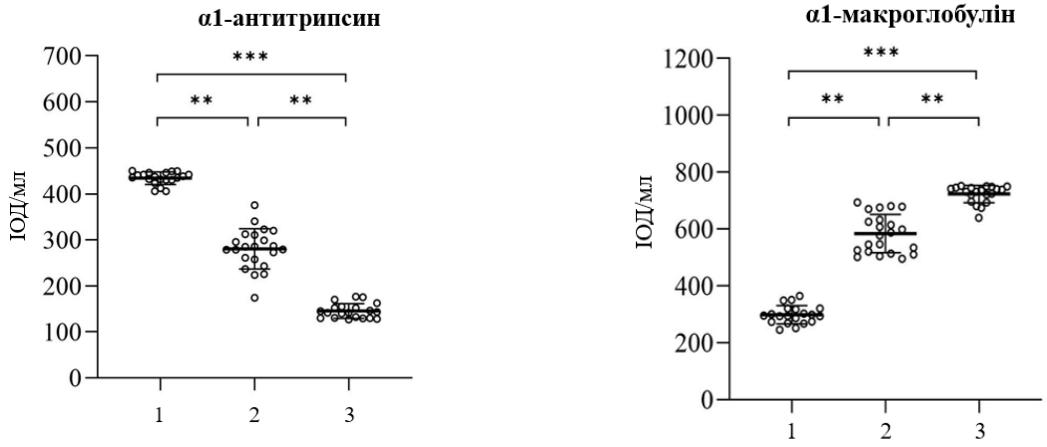


Рис. 8.8. Інгібіторний потенціал α1-антитрипсину та α2-макроглобуліну у пацієнтів з остеоартритом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з остеоартритом; 3 – пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19 (M ± SD)

Примітка: різницю між групами позначено як *** p<0,001; ** p≤0,005; * p<0,01

Показано, що на тлі зниження інгібіторного потенціалу α_1-АТ підвищувався інгібіторний потенціал α_2-MG у плазмі крові хворих на ОА, у більш значній мірі у осіб, які перехворіли на COVID-19. Відомо, що α_2-МГ є одним із ключових глікопротеїнів плазми з широким спектром регуляторних і транспортних функцій. Серед його основних функцій – інгібування протеазної активності, транспорт цитокінів, факторів росту та гормонів, пригнічення ферментних каскадів системи комплементу, участь у згортанні крові та фібринолізі, запальних процесах [376,377]. Більша частина α_2-МГ синтезується в печінці, але інші клітини, такі як макрофаги та фібробласти, також можуть виробляти його. У зв'язку з притаманним α_2-МГ плейотропним ефектом його можна розглядати у якості особливого протеїназного інгібітора, здатного впливати як на антикоагуляційну, так і на прокоагуляційну ланки гемостазу, а також на активацію та пригнічення фібринолізу. α_2-МГ може інгібувати тромбін, фактор Ха, активований протеїн С, плазмін, ТПА та активатор плазміногену урокінази. Крім того, α_2-МГ є потужним інгібітором багатьох катаболічних факторів хряща, який діє не тільки шляхом блокування активності, але й знижує експресію генів

[378]. Цікаво, що плазмовий рівень α_2-МГ має вікову варіабельність: нормальний рівень інгібітору досягається у здорових людей у віці близько двадцяти років, тоді як у зрілому віці концентрація α_2-МГ у плазмі знижується вдвічі. Підвищення концентрації α_2-МГ може бути викликано розвитком в організмі патологічного стану, особливо пов'язаного з хронічним запаленням.

Підсумовуючи результати наших досліджень, зазначимо, що система гемостазу продовжує реагувати на залишкові явища COVID-19 навіть через кілька місяців після гострої фази коронавірусної інфекції. Отримані нами результати можуть вказувати на те, що ризик виникнення тромботичної загрози в організмі хворих на ОА після тривалого постковідного періоду зберігається, що пов'язано з пригніченням антикоагуляційної активності плазми крові та її низьким фібринолітичним потенціалом. На фоні дисбалансу прокоагуляційної ланки гемостазу зафіксовано зниження вмісту протромбіну та пригнічення його активності, підвищення концентрації розчинних мономерних комплексів фібрину, пригнічення функціонування та зниження вмісту природних антикоагулянтів – протеїну С, антитромбіну ІІІ та тромбомодуліну; показано пригнічення системи фібринолізу (зниження концентрації плазміногену, ТАП, інгібітору ПАІ-1); спостерігався аномальний рівень протеїназних інгібіторів α_1-АТ і α_2-МГ. Розуміння патогенетичних механізмів постковідних ускладнень та моніторинг основних маркерів гемостазу важливі для своєчасного виявлення порушень у системі згортання крові, і дозволяє, залежно від клінічної ситуації, своєчасно вживати заходів щодо їх корекції на різних стадіях патології, особливо у пацієнтів з тривалим прокоагуляційним профілем в умовах супутніх патологій.

Підсумовуючи, у пацієнтів із розсіяним склерозом активація коагуляційного каскаду має системний і патогенетично зумовлений характер та супроводжується пригніченням антикоагуляційних і фібринолітичних механізмів, що відображає стійку дисрегуляцію системи гемостазу. Перенесений COVID-19 асоціюється з посиленням цих порушень, зокрема зі зниженням антикоагуляційного потенціалу, пригніченням фібринолізу та прогресуванням ендотеліальної дисфункції.

Натомість у пацієнтів з остеоартритом виявлені зміни мають переважно реактивний характер і проявляються активацією коагуляції на тлі виснаження антикоагуляційної активності та частково збереженого компенсаторного фібринолізу. Водночас після перенесеного COVID-19 в обох групах спостерігається найбільш виражена протромботична дестабілізація гемостатичного балансу.

Оскільки нами було підтверджено наявність у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, ковалентних комплексів між антитілами та молекулами плазміногенового походження, заключний етап дослідження, присвячений оцінці стану системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом, що перехворіли на COVID-19, був спрямований на встановлення присутності ковалентних білкових комплексів у плазмі їх крові.

Для виділення зазначених комплексів застосовано апробований раніше підхід, що поєднував два послідовні етапи афінної хроматографії: спочатку на бензамідин-сефарозі, а надалі - на протеїн А-сефарозі.

Очищені таким чином фракції було проаналізовано на наявність антитіл, плазміногену/плазміну та молекул плазміногенового походження. Згідно з даними, наведеними у табл. 8.3, у плазмі крові пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом виявлено білкові комплекси, що містять молекули плазміногенового походження. Їх рівень у групах осіб, що мали основне захворювання, але не хворіли на COVID-19, був подібним і становив 0,074 ум. од./мг білка для пацієнтів із розсіяним склерозом та 0,065 ум. од./мг білка для пацієнтів з остеоартритом. Водночас, у пацієнтів із зазначеними захворюваннями, які перенесли COVID-19, встановлено суттєве підвищення вмісту молекул плазміногенового походження у складі комплексів: у 3,7 раза - для осіб із розсіяним склерозом та у 4,6 раза - для пацієнтів з остеоартритом порівняно з відповідними групами без перенесеної інфекції.

Аналіз очищених фракцій з використанням антитіл проти людських імуноглобулінів класу G підтвердив, що другою складовою комплексу є саме антитіла.

Таблиця 8.3

Рівень молекул плазміногенового походження та рівень антитіл у складі білкових комплексів, очищених з плазми крові пацієнтів з розсіяним склерозом та остеоартритом, що перенесли COVID-19 (M ± m)

Групи пацієнтів	За використання антитіл проти плазміногену	За використання антитіл проти людських імуноглобулінів класу G
	ум. од/мг білка	
Пацієнти з розсіяним склерозом	0,074±0,0037	0,142±0,0071
Пацієнти з розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19	0,274±0,0130*	1,153±0,0576*
Пацієнти з остеоартритом	0,065±0,0025	0,141±0,0750
Пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19	0,300±0,0100**	1,120±0,0345**

Примітка: * – p <0,05 різниця значуща у порівнянні з групою пацієнтів з розсіяним склерозом; ** – p <0,05 різниця значуща у порівнянні з групою пацієнтів з остеоартритом

Так, виявлено присутність у складі очищених комплексів антитіл на рівні 0,142 ум. од./мг білка для пацієнтів з розсіяним склерозом та 0,146 ум. од./мг білка для пацієнтів з остеоартритом. У осіб, що перенесли COVID-19 рівень антитіл суттєво зростав, причому більш виражена динаміка зростання спостерігалася у пацієнтів із розсіяним склерозом.

Звертає на себе увагу, що у пацієнтів із хронічними захворюваннями, які перенесли COVID-19, рівень антитіл у складі виділених комплексів був суттєво вищим порівняно з рівнем молекул плазміногенового походження. Отримані дані дозволяють припустити, що у плазмі крові зазначених пацієнтів циркулюють комплекси, до складу яких можуть входити не лише молекули плазміногенового походження, але й інші білкові компоненти. Зокрема, такими компонентами можуть бути молекули протромбінового походження, які в умовах сформованого

при COVID-19 патогенетичного середовища могли зазнавати структурно-функціональних модифікацій, зокрема змін, пов'язаних з експонуванням або доступністю активного центру, що дозволило очистити такі комплекси використовуючи бензамідин-сефарозу. Це частково може пояснити певну невідповідність між високим рівнем антитіл і дещо нижчим рівнем молекул плазміногенового походження у складі очищених комплексів.

Для перевірки такого припущення комплекси, очищені з плазми крові пацієнтів всіх дослідних груп, було проаналізовано використовуючи антитіла до протромбіну. Як бачимо з даних, наведених у табл.8.4, серед комплексів антитіл з білками плазми крові були й такі, які як другу складову містили молекули протромбінового походження.

Таблиця 8.4

Рівень молекул протромбінового походження та рівень антитіл у складі білкових комплексів, очищених з плазми крові пацієнтів з розсіяним склерозом та остеоартритом, що перенесли COVID-19 (M ± m)

Групи пацієнтів	За використання антитіл проти протромбіну	За використання антитіл проти людських імуноглобулінів класу G
	ум. од/мг білка	
Пацієнти з розсіяним склерозом	0,031±0,0015	0,142±0,0061
Пацієнти з розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19	0,200±0,0100*	1,153±0,0576*
Пацієнти з остеоартритом	0,096±0,0048	0,141±0,0052
Пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19	0,234±0,0032**	1,120±0,0645**

Примітка: * – p <0,05 різниця значуща у порівнянні з групою пацієнтів з розсіяним склерозом; ** – p <0,05 різниця значуща у порівнянні з групою пацієнтів з остеоартритом

Примітно, що у пацієнтів з РС, які перенесли COVID-19, рівень молекул протромбінового походження зростав суттєвіше якщо порівнювати із зростанням рівня молекул плазміногенового походження – у 6,45 рази; для пацієнтів з ОА, які перенесли COVID-19, рівень молекул протромбінового походження перевищував значення у групі осіб з ОА у 2,4 рази. Такі результати частково можуть пояснити виявлені нами певні відмінності у функціонуванні окремих ланок системи гемостазу у пацієнтів з РС (активація коагуляції на тлі пригнічення антикоагуляційних і фібринолітичних механізмів) та остеоартритом (активація коагуляції на тлі пригнічення антикоагуляційних механізмів та часткового збереження компенсаторного фібринолізу), а також більш виражену дестабілізацію гемостатичного балансу після перенесеного COVID-19.

Таким чином, отримані результати переконливо свідчать про наявність у плазмі крові осіб, які перенесли COVID-19, ковалентних білкових комплексів, до складу яких входять антитіла та молекули плазміногенового походження. Встановлене підвищення їх вмісту у пацієнтів із РС та ОА після перенесеної інфекції дозволяє розглядати циркуляцію таких комплексів як один із можливих механізмів формування виявлених нами порушень та специфічної спрямованості змін у системі гемостазу, притаманної основному захворюванню.

Присутність у плазмі крові пацієнтів із РС та ОА без перенесеного COVID-19 комплексів, нехай і у нижчих концентраціях, може свідчитти про те, що формування ковалентних комплексів між антитілами та білками плазми крові (зокрема, плазміногеном/плазміном та протромбіном/тромбіном) є складовою патогенезу захворювань, асоційованих із хронічними запальними та дегенеративними процесами.

Разом із тим перенесена COVID-19 інфекція може виступати потужним тригерним чинником, що суттєво посилює утворення таких комплексів та їх функціональну залученість у механізми формування патологічного середовища. Таким чином, постковідний період характеризується не лише кількісним зростанням ковалентних комплексів, але й розширенням їх ролі у підтриманні та

поглибленні молекулярно-біохімічних порушень, які лежать в основі патогенетичного підґрунтя постковідного синдрому.

Публікації, що висвітлюють результати автора, наведені у розділі 6:

1. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Tsyryuk, O., Penchuk, Y., Kot, L., Raksha, N., Falalyeyeva, T., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2025). Analysis of key parameters of the hemostatic system in patients with osteoarthritis after COVID 19. Minerva Biotechnology and Biomolecular Research, 37(2), 61–71. https://doi.org/10.23736/S2724-542X.25.03239-0 **(Scopus, Q4)**

2. Halenova, T. I., Raksha, N. H., Vovk, T. B., **Karbovskyy, V. L.,** Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., & Savchuk, O. M. (2024). Cytokine profile in multiple sclerosis patients with and without COVID 19. Wiadomości Lekarskie (Medical Advances), 77(4), 640–645. https://doi.org/10.36740/WLek202404104 **(Scopus Q4)**

3. Halenova, T.I., Raksha, N.G., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L.,** Sholomon, S.M., Melnyk, V.S., & Savchuk, O.M. (2024). Coagulation and anticoagulation parameters in multiple sclerosis patients with and without COVID-19. Клінічна та профілактична медицина, 3(33), 36–45. https://doi.org/10.31612/2616-4868.3.2024.05 **(Scopus, Q4)**

4. Halenova, T.I., Raksha, N.G., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L.,** Sholomon, S.M., Melnyk, V.S., & Savchuk, O.M. (2024). Characteristics of fibrin/fibrinogen degradation products in multiple sclerosis following SARS-CoV-2 infection. International Neurological Journal (Ukraine), 20(2), 104–109. https://doi.org/10.22141/2224-0713.20.2.2024.1060 **(Scopus, Q4)**

5. Галенова, Т., Калашнікова, М., **Карбовський, В.,** Шоломон, С., & Мельник, В. (2023). Біохімічні показники крові у хворих на розсіяний склероз, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(95), 13–19.

РОЗДІЛ 9
ЗАКЛЮЧЕННЯ

Узагальнюючи результати аналізу стану системи гемостазу у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 можемо зробити висновок про формування стану підвищеної схильності до тромбоутворення у постковідний період. Цей стан зумовлений активацією факторів коагуляційного каскаду на тлі пригнічення активності їх природних регуляторів та зниження ефективності фібринолітичної ланки системи гемостазу, що загалом свідчить про зсув гомеостатичної рівноваги у напрямку гіперкоагуляції.

Так, виявлене підвищення рівня фібриногену створює патогенетичне підгрунття для формування тромботичних станів, а високий рівень у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 розчинних фібрин-мономерних комплексів вказує на посилене утворення фібринових структур у кровотоці.

Виявлене зростання потенційної активності молекул протромбінового походження за умов зниження загальної концентрації протромбіну може свідчити про порушення механізмів регуляції коагуляційного каскаду та наявність у кровотоці фрагментів протромбіну, здатних до спонтанної або стимульованої активації. Подібна ситуація може розглядатися як “біохімічна бомба сповільненої дії”, коли накопичення частково активованих або атипових молекул протромбінового походження створює ризик їх неконтрольованої активації у відповідь на дію додаткових тригерних чинників (запалення, оксидативний стрес, механічне пошкодження ендотелію тощо). З огляду на те, що такий пул охоплює як повноцінні молекули протромбіну, так і його фрагменти, канонічні механізми регуляції коагуляційної активності можуть виявитися частково неефективними, що виступає додатковим негативним чинником у підтриманні гіперкоагуляційного стану. Зниження активності антитромбіну ІІІ у поєднанні зі зменшенням рівня експресії тромбомодуліну на ендотеліоцитах свідчить про порушення антикоагуляційної ланки гемостазу, яке

поглиблює дисбаланс між про- та антикоагуляційними механізмами. У цих умовах підвищення рівня D-димеру відображає, скоріше, активацію коагуляційного каскаду, ніж є проявом активності фібринолітичної ланки, що свідчить про тривалу активацію системи згортання крові у реконвалесцентів після COVID-19.

Проведений комплексний аналіз стану системи фібринолізу у донорів із різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG дозволив виявити стійкі порушення, що зберігаються у постковідний період. Встановлено зміни як у концентрації, так і в активності основних компонентів фібринолітичної системи, зокрема плазміногену, тканинного активатора плазміногену (ТАП), інгібітора активатора плазміногену-1 (ПАІ-1) та α_2-антиплазміну. У низці груп донорів відзначено зниження рівня плазміногену при одночасній варіабельності його активності - від зниженої до парадоксально підвищеної, що, ймовірно, пов’язано з молекулярними модифікаціями білка або його залученням до складу стабільних білкових комплексів. Поряд із цим, підвищення рівня ПАІ-1 супроводжується ознаками пригнічення ефективного фібринолізу, тоді як зростання концентрації D-димеру може відображати активацію коагуляційного каскаду на фоні недостатнього фібринолізу. Таке поєднання змін свідчить про дисбаланс у системі «коагуляція–фібриноліз», який може бути наслідком персистуючого запального процесу та залишкового ендотеліального ушкодження.

Таким чином, отримані результати вказують на збереження функціональної нестабільності фібринолітичної системи навіть після клінічного одужання від COVID-19. Цей стан може мати патогенетичне значення у формуванні віддалених ускладнень постковідного синдрому, включаючи підвищений ризик тромботичних подій, розвиток фіброзу та ендотеліальну дисфункцію.

Зазначимо, що спрямованість і вираженість змін концентрації та/або активності окремих компонентів системи гемостазу варіюють залежно від рівня титру антитіл проти SARS-CoV-2, проте загальна тенденція до домінування прокоагуляційних механізмів зберігається у всіх досліджуваних групах. Виходячи з припущення, що виявлені порушення у функціонуванні системи

гемостазу можуть бути опосередковані появою аутоантитіл у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, рівень яких відображає вираженість імунної відповіді, було проведено кореляційний аналіз для виявлення можливих взаємозв'язків між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та показниками системи гемостазу.

Отримані результати дозволили встановити наявність низки статистично достовірних зв'язків, які відображають взаємопов'язані зміни коагуляційної, антикоагуляційної та фібринолітичної ланок у постковідному періоді. Для інтерпретації отриманих коефіцієнтів кореляції між досліджуваними показниками було використано шкалу Чеддока (Chaddock, 1930), яка є загальноприйнятою у біомедичних дослідженнях і дозволяє якісно оцінити силу лінійного зв'язку між змінними. Відповідно до цієї шкали, абсолютне значення коефіцієнта кореляції (r) до 0,3 характеризує слабкий зв'язок, від 0,3 до 0,5 - помірний, від 0,5 до 0,7 - значний (виражений), а понад 0,7 - сильний кореляційний зв'язок. Значення коефіцієнта, близькі до 1 або –1, свідчать про дуже тісну пряму або обернену залежність між показниками відповідно, тоді як значення, близькі до нуля, вказують на відсутність або незначність зв'язку.

Таким чином, при обговоренні результатів враховувався не лише напрямок кореляції (позитивний чи негативний), але й її сила, що дозволяє більш обґрунтовано оцінити взаємозв'язки між біохімічними, імунологічними та клінічними параметрами.

За результатами кореляційного аналізу виявлено сильну позитивну кореляційну залежність ($r = 0,86$; $p < 0,05$) між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та рівнем розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) - зі зростанням титру антитіл спостерігається зростання концентрації РФМК, що є індикатором активації процесів коагуляції та утворення фібрину (табл.9.1). В умовах зростання титру (який може відображати інтенсивність імунної відповіді або наявність запальних процесів) посилюються процеси коагуляції, що призводить до накопичення у плазмі крові розчинних фібрин-мономерних комплексів. Таким чином, високий позитивний коефіцієнт кореляції свідчить про тісний взаємозв'язок між активацією імунної ланки (за рівнем титру) та станом

коагуляційного гомеостазу (за рівнем РФМК). Зростання титру антитіл можна розцінити як провокуючий або супутній фактор гіперкоагуляційних змін, що має важливе значення для оцінки ризику тромбоутворення і загального ступеня системної реакції організму.

Таблиця 9.1

Результати кореляційного аналізу між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та показниками запалення, гемостазу та регенерації у донорів у постковідному періоді

Показник	Коефіцієнт	Кореляційний зв'язок
Концентрація РФМК	0.86	сильний позитивний
Рівень IL-8	0.55	значний (виражений) позитивний
Інгібіторний потенціал α2-макроглобуліну	0.53	значний (виражений) позитивний
Рівень ПАІ-1	0.52	значний (виражений) позитивний
Рівень PDGF	0.51	значний (виражений) позитивний
Інгібіторний потенціал α1-антитрипсину	0.43	помірний позитивний
Рівень HIF-1α	0.41	помірний позитивний
Рівень TIMP-1	0.4	помірний позитивний
Рівень IL-10	0.3	помірний позитивний
Рівень INF-γ	0.29	слабкий позитивний
Рівень MMP-8	-0.27	слабкий негативний
Концентрація фібриногену	-0.32	помірний негативний
Рівень FGF-2	-0.32	помірний негативний
Потенційна активність плазміногену	-0.35	помірний негативний
Рівень молекул протромбінового походження	-0.47	помірний негативний
Рівень nF-kB	-0.5	значний (виражений) негативний
Рівень IL-6	-0.51	значний (виражений) негативний
Рівень протеїну С	-0.64	значний (виражений) негативний

Також встановлено помірну негативну кореляцію між концентрацією фібриногену в плазмі крові та титром антитіл проти SARS-CoV-2 ($r = –0,32$; $p < 0,05$). Незважаючи на те, що рівень фібриногену залишався підвищеним у донорів із різними титрами антитіл, найбільш виражене зростання спостерігалося при нижчих титрах антитіл проти SARS-CoV-2.

Помірну негативну кореляцію ($r = -0,47$; $p < 0,05$) також було виявлено і між титрами антитіл проти SARS-CoV-2 та рівнем молекул протромбінового походження – більш виражені зміни спостерігалися при нижчих титрах антитіл. Такі результати можуть бути обумовлені посиленням використання протромбіну у коагуляційному каскаді, що часто супроводжує запальну або імунну реакцію. Підвищення титру, що певною мірою відображає активацію імунних процесів, стимулює коагуляційно-запальний механізм, унаслідок чого частина молекул протромбіну перетворюється на тромбін. Це закономірно зумовлює зниження рівня молекул протромбінового походження і повністю узгоджується з описаною вище кореляцією між титром антитіл та концентрацією фібриногену.

Отже, виявлені кореляційні зв’язки між концентрацією РФМК, фібриногену та рівнем молекул протромбінового походження вказують на існування певної залежності між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та активацією коагуляційного каскаду.

Ще одним підтвердженням домінування коагуляційних процесів у осіб, які перенесли COVID-19, є помірна негативна кореляція між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та концентрацією протеїну С ($r = –0,64$; $p < 0,05$). Така залежність свідчить про пригнічення антикоагуляційного потенціалу крові та зміщення гомеостатичної рівноваги у напрямку переважання коагуляційних механізмів при зростанні титру антитіл. Протеїн С є ключовим фактором фізіологічного механізму антикоагуляції, який у своїй активній формі інактивує фактори Va та VIIIa, тим самим обмежуючи утворення фактору Xa та тромбіну. Отже, нижча концентрація протеїну С у осіб з вищим титром антитіл проти SARS-CoV-2 може бути наслідком активації коагуляційного каскаду, під час якої протеїн С активно використовується для інактивації вище вказаних факторів. Водночас не можна

виключити й інші механізми, зокрема пригнічення синтетичної функції печінки в умовах системного запалення, що також може зумовлювати зменшення рівня протеїну С у плазмі крові.

Звертає на себе увагу наявність значного негативного кореляційного зв'язку між титром антитіл проти SARS-CoV-2 та концентрацією тромбомодуліну (ТМ) у плазмі крові донорів ($r = –0,65$; $p < 0,05$). Тромбомодулін є ендотеліальним маркером судинної цілісності, а його розчинна форма (sTM) у плазмі розглядається як чутливий показник ушкодження ендотелію, зокрема при вірусних інфекціях. Виявлена зворотна залежність свідчить, що зі зростанням титру антитіл концентрація тромбомодуліну у плазмі крові знижується, що, з одного боку, може відображати меншу інтенсивність ендотеліального ушкодження, з іншого боку, бути результатом зниження експресії цього білка ендотеліоцитами у донорів із більш вираженою імунною відповіддю.

Оскільки ТМ бере участь в активації протеїну С через утворення комплексу з тромбіном, виявлені особливості кореляційних зв'язків між титром антитіл, рівнем ТМ, концентрацією протеїну С та молекул протромбінового походження дають підстави припустити порушення процесу активації протеїну С у постковідному періоді.

При аналізі показників системи фібринолізу було виявлено наявність кореляційних зв'язків між титром антитіл проти SARS-CoV-2, потенційною активністю плазміногену та вмістом інгібітора активатора плазміногену-1 (ПАІ-1). Зокрема, помірна негативна кореляція між потенційною активністю плазміногену та титром антитіл ($r = –0,35$; $p < 0,05$) у поєднанні зі значною позитивною кореляцією між рівнем ПАІ-1 і титром антитіл ($r = 0,52$; $p < 0,05$) свідчить про формування гіпофібринолітичного стану у осіб у віддалений період після перенесеного COVID-19. Отримані дані вказують на зниження здатності плазми до розщеплення фібрину, що може бути наслідком надмірної експресії ПАІ-1 і, відповідно, пригнічення активації плазміногену, тобто одного з ключових механізмів постковідної дисфункції фібринолітичної системи.

За результатами кореляційного аналізу встановлено помірну позитивну кореляцію між відносним інгібіторним потенціалом α_2-антиплазміну (α_2АП) та титром антитіл проти SARS-CoV-2 ($r = 0,43$; $p < 0,05$), що на тлі описаних вище кореляцій для потенційної активності плазміну та вмісту ПАІ-1 сприяє підтриманню низької фібринолітичної активності плазми крові.

За таких умов виявлені позитивні кореляції - значна між інгібіторним потенціалом α_2-макроглобуліну ($r = 0,53$; $p < 0,05$), який є універсальним інгібітором широкого спектра протеїназ, та помірна між рівнем інгібітору матриксних металопротеїназ TIMP-1 ($r = 0,4$; $p < 0,05$) - і титром антитіл проти SARS-CoV-2 можуть відображати активацію компенсаторних механізмів, спрямованих на пригнічення протеолізу, певна активізація якого згідно з нашими результатами, має місце у постковідний період.

Аналіз вмісту та активності протеолітичних ферментів у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 виявив певні зміни, які свідчать про порушення протеолітичного гомеостазу у постковідний період. Частково це обумовлено зростанням вмісту матриксних металопротеїназ - ММП-1, ММП-3, ММП-3/10, ММП-8 та ММП-9 - рівень яких різнився для донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. ММП виконують не лише роль маркерів тканинної активності, але й виступають функціональними регуляторами, здатними впливати на фактори системи гемостазу, унаслідок чого гемостатична рівновага може зміщуватися як у бік гіперкоагуляції з ризиком тромбоутворення, так і в напрямку гіпокоагуляції з підвищеною вірогідністю геморагій.

Незважаючи на те, що зростання концентрації серинових протеїназ було виявлено лише для донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C) та 150 ± 5 Індекс (S/C), усі фракції, очищені з плазми крові донорів, містили ковалентні білкові комплекси. Наявність таких комплексів є нетиповим і недостатньо вивченим явищем, що може бути наслідком посттрансляційних модифікацій або атипових взаємодій між протеїназами та білками плазми крові внаслідок окиснювального стресу чи запального процесу.

Ферменти у складі подібних комплексів можуть проявляти змінені функціональні властивості - як втрату або ослаблення механізмів регуляції активності, так і появу нетипової або надмірної протеолітичної дії. Такі зрушення потенційно здатні порушувати фізіологічний баланс між протеолізом і його інгібуванням, що, у свою чергу, може сприяти розвитку клінічних проявів постковідного синдрому, зокрема персистуючого запалення, ендотеліальної дисфункції, порушень у функціонуванні системи гемостазу та тканинного ремоделювання.

Було виявлено існування кореляції між рівнем деяких цитокінів - IL-6 ($r = -0,51$; $p < 0,05$), IL-8 ($r = -0,55$; $p < 0,05$) та IL-10 ($r = 0,3$; $p < 0,05$) і титром антитіл проти SARS-CoV-2, також вмістом ростових факторів $p < 0,05$), FGF-2 ($r = 0,32$; $p < 0,05$), PDGF($r = 0,51$; $p < 0,05$), і транскрипційних факторів NF-κB ($r = -0,5$; $p < 0,05$) та HIF-1α ($r = 0,41$; $p < 0,05$). Такі результати, у поєднанні зі змінами рівнів цитокінів IL-1β, IL-12β, IL-4, TNF-α свідчать про порушення цитокінового балансу у донорів із певними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, що може сприяти підтриманню стану хронічного низькоінтенсивного запалення та бути одним із патогенетичних чинників постковідного синдрому. Проявом тривалого запального процесу є зростанням у плазмі крові донорів всіх досліджуваних груп концентрації С-реактивного білка, вмісту феритину, а також зміни якісного складу пептидного пулу плазми крові при збереженні його сталої концентрації.

Зазначимо, що отримані нами результати щодо відхилень у функціонуванні системи гемостазу у донорів із різними титрами антитіл до SARS-CoV-2 не демонструють очікуваних кореляцій та причинно-наслідкових зв’язків між ключовими досліджуваними показниками, які функціонально взаємопов’язані в межах інтегрованої реакції організму. Ми припускаємо, що частково це може бути обумовлено наявністю у кровотоці осіб у постковідний період певних ендогенних тригерних або модуляторних молекул, які сприяють персистенції патологічних процесів, зокрема через активацію імунної системи, впливу на коагуляцію та підтримання хронічного запального процесу. Аналіз профілю молекулярної маси білків у складі фракції серинових протеїназ, зокрема, присутність білків з молекулярною масою понад 250 кДа, наштовхнув нас на

думку, що таким провокуючим чинником можуть бути нетипові білкові комплекси, що циркулюють у кров'яному руслі протягом тривалого часу після перенесеної інфекції. За нашим припущенням це можуть бути комплекси антитіл з ферментами плазми крові, у тому числі й плазміногеном чи його деградованими формами. Використовуючи методи хроматогорафії, електрофорезу, вестерн-блоту з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 було очищено такі комплекси, доведено ковалентну природу взаємодій між складовими комплексу та підтверджено, що окрім антитіл класу G до складу комплексів входять молекули плазміногенового походження різного ступеню деградації.

Окремої уваги заслуговує питання можливого патогенетичного значення ковалентних комплексів антитіл з плазміногеном/плазміном та їх деградованими формами. Адже такі комплекси це не просто інертні утворення, навпаки,- вони являють собою динамічно активні структури, які проявляють залишкову або атипову протеолітичну активність, що робить їх потенційними регуляторами (або дестабілізаторами) рівноваги між коагуляційною та фібринолітичною ланками.

Структурна модифікація молекули плазміногену та зміна оточення зумовлюють функціональну непередбачуваність утворених комплексів. З одного боку, ферментативна активність молекул плазміногенового походження у складі комплексів може частково зберігатися, проте при цьому змінюється їхня субстратна специфічність. З іншого - така активність виходить за межі фізіологічного контролю з боку ендогенних інгібіторів (α_2-антиплазміну, α_2-макроглобуліну, α1-антитрипсину тощо). Унаслідок цього ферментативна активність комплексів набуває неконтрольованого характеру, сприяючи неспецифічному протеолізу плазмових компонентів, зокрема білків коагуляційного каскаду, фібриногену, фібрину та рецепторних структур ендотелію.

Нами показано, що очищені комплекси виявляють активність щодо хромогенного субстрату, специфічного для плазміну (S_{2251}), та здатні розщеплювати фібриноген. Їхня активність істотно підвищується після інкубації

зі стрептокіназою, що свідчить про наявність у складі комплексів як активного плазміну або його каталітично активних деградованих форм, так і молекули плазміногену або його деградованих форм, потенційно здатних до активації.

Включення молекул плазміногенового походження до складу комплексів може впливати на загальну концентрацію плазміногену в кровотоці і, відповідно, на фібринолітичний потенціал. Згідно з нашими результатами, найвищий рівень молекул плазміногенового походження у складі очищених комплексів виявлено у донорів із титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), у яких концентрація плазміногену в плазмі була найнижчою.

Крім того, розщеплення фібриногену за участю комплексів може призводити до розвитку гіпофібриногенемії, що, у свою чергу, порушує рівновагу між окремими ланками системи гемостазу, оскільки такий фібриноген втрачає свою функціональну активність і не здатен до полімеризації у фібрин.

Отже, накопичення у кровотоці комплексів антитіл з молекулами плазміногенового походження зі зміненими властивостями може бути однією з причин формування своєрідного «атипового протеолітичного фону», що сприяє розвитку дисбалансу між коагуляційною та фібринолітичною активністю. За таких умов спрямованість змін у системі гемостазу визначатиметься загальним станом організму, наявністю супутніх патологій і характером призначеного лікування.

Зазначимо, що ковалентні білкові комплекси, що включають антитіла та молекули плазміногенового походження, також було виявлено у плазмі крові пацієнтів із розсіяним склерозом та остеоартритом, які перенесли COVID-19. Такі дані дають підстави розглядати утворення комплексів як один із можливих механізмів формування певної спрямованості змін у функціонуванні системи гемостазу, яку ми виявили у рамках проведеного дослідження. Той факт, що подібні комплекси, хоча й у нижчих концентраціях, присутні і в плазмі крові осіб із розсіяним склерозом та остеоартритом, які не хворіли на COVID-19, дозволяє припустити, що процес комплексоутворення може бути залучений до патогенезу

захворювань, асоційованих із хронічними запальними та дегенеративними процесами.

Таким чином, ковалентні комплекси антитіл із молекулами плазміногенового походження можуть розглядатися як потенційний патогенетичний чинник формування постковідного синдрому, який реалізується через збереження у плазміногенової компоненти у складі комплексів протеолітичної активності, а також порушення механізмів контролю активності з боку інгібіторних систем організму. Присутність у кровотоці ковалентних комплексів антитіл з молекулами плазміногенового походження може спричинювати субклінічне ушкодження ендотелію, підтримувати мікротромботичну активність та перешкоджати повному відновленню гемостатичного гомеостазу після перенесеної інфекції. З огляду на вище наведене, можна припустити, що після SARS-CoV-2-інфекції формується стан «ферментативної гібридної активності», коли імунна система, з одного боку, забезпечує тривалу присутність антитіл, а з іншого - мимоволі стабілізує протеолітичні комплекси, що діють поза фізіологічним контролем. Цей механізм може бути одним із ключових патогенетичних детермінант постковідного дисбалансу системи гемостазу, що проявляється гіпофібринолізом, ендотеліальною дисфункцією і збереженням підвищеного протромбіназного потенціалу навіть у клінічно здорових реконвалесцентів.

На підставі результатів, отриманих в рамках виконання дисертаційного дослідження, нами було запропоновано узагальнюючу концепцію, що відображає участь комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження у молекулярно-біохімічних механізмах формування та підтримання гемостатичних і протеолітичних порушень, характерних для постковідного синдрому (рис.9.1).

Запропонована нами модель передбачає існування кількох взаємопов’язаних ланок впливу, які перебувають у стані динамічного взаємозв’язку, формуючи каскад взаємопідсилюючих процесів. Перша ланка охоплює потенційні функціональні властивості плазміногенової компоненти у складі комплексів; друга – відображає дизрегуляцію протеолітичних і рецепторно-сигнальних

ланок; третя – результує системні патобіохімічні наслідки впливу ковалентних комплексів на організм.

Молекули плазміногену/плазміну та молекули плазміногенового походження у складі комплексів через змінені структурно-функціональні характеристики впливають на протеолітичні та рецепторно-опосередковані сигнальні мережі, що призводить до їх дизрегуляції і у кінцевому результаті трансформується у системні порушення регуляції гемостазу, протеолітичного балансу та клітинної відповіді.

У підсумку це зумовлює формування та підтримання стійкого комплексу молекулярно-біохімічних реакцій, які визначають розвиток постковідного синдрому та клінічну симптоматику, притаманну даному патологічному стану.

Утворення ковалентних комплексів між антитілами та плазміногеном/плазміном та/або їх деградованими формами, як результат перенесеної ковідної інфекції, призводить до певних конформаційних модифікацій молекул плазміногенового походження у складі комплексів та, як наслідок, зміни чи порушення канонічних функцій плазміногену.

Це обумовлює зміну рецепторної специфічності, сприяє зв’язуванню комплексів з неканонічними клітинними рецепторами й ініціює аберантні сигнальні каскади, що супроводжуються дизрегуляцією внутрішньоклітинного сигналінгу, зміною експресії цитокінів, протеаз і факторів росту, а також порушенням міграційної та репаративної активності клітин. Сукупність цих процесів зумовлює міжклітинну комунікаційну дисфункцію та формування патологічно зміненого тканинного мікрооточення з про-запальним, про-тромботичним і про-фібротичним фенотипом.

Комплекси антитіл з плазміногеном/плазміном та/або їх деградованими формами можуть зберігати неконтрольовану протеолітичну активність та частково уникати регуляції з боку як специфічних, так і неспецифічних інгібіторів.



Рис.9.1. Схема залучення ковалентних комплексів антитіл з плазміногеном/плазміном (Пг/Пм) та їх деградованими формами (дПг/дПм) у формування патогенезу постковідного синдрому

Це створює передумови для формування протеазо-інгібіторного дисбалансу, що супроводжується патологічним ремоделюванням позаклітинного матриксу та порушенням процесів регенерації тканин. За таких умов ускладнюється або суттєво обмежується здатність плазміногену у складі комплексів до зв'язування з фібрином, а також порушується його взаємодія з основним активатором - тканинним активатором плазміногену (ТПА). Крім того, через утворення комплексів з антитілами частина молекул плазміногену може механічно вилучатися з механізмів реалізації фібринолізу, що додатково сприяє зміщенню гемостатичного балансу у бік протромботичного стану.

Такий комплекс взаємопов'язаних процесів призводить до зниження ефективності фібринолізу, яке на тлі посилення коагуляційної активності зумовлює зміщення гемостатичного балансу у бік протромботичного стану та підвищує ризик розвитку тромботичних ускладнень.

Важливо підкреслити, що описані процеси не є статичними та однонаправленими. Формування ковалентних комплексів антитіл з молекулами плазміногенового походження запускає каскад протеолітичних, рецепторно-сигнальних та системних патобіохімічних змін, які, у свою чергу, створюють умови для подальшої модифікації білкових компонентів плазми та ініціюють нові нетипові білок-білкові взаємодії. Таким чином, наслідки циркуляції комплексів із зміненими структурно-функціональними властивостями самі стають чинниками, що індукують утворення нових ковалентних комплексів.

У результаті формується своєрідне патологічне коло, в межах якого порушення протеолітичного балансу, дизрегуляція клітинного сигналінгу та зміни тканинного мікрооточення забезпечують постійне «фонове» підтримання умов для подальшого комплексоутворення. Такий механізм може пояснювати тривале збереження молекулярно-біохімічних зрушень і хронізацію патологічного процесу в постковідний період. Розуміння зазначених механізмів є принципово важливим для розробки науково обґрунтованих стратегій профілактики постковідного синдрому, а також для формування нових підходів його терапії.

ВИСНОВКИ

Результати дисертаційної роботи поглиблюють існуючі уявлення щодо біохімічних механізмів порушень у функціонуванні системи гемостазу у постковідний період та демонструють їх залежність від титру антитіл проти SARS-CoV-2. Показано, що постковідний стан характеризується комплексною перебудовою коагуляційної, антикоагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу, активацією протеолітичних процесів та збереженням низькоінтенсивного системного запалення Встановлено наявність у кровотоці аномальних ковалентних білкових комплексів, що здатні перепрограмувати біохімічні процеси і механізми. Отримані дані обґрунтовують перспективність подальших досліджень, спрямованих на поглиблене дослідження таких білкових комплексів як потенційних діагностичних і прогностичних маркерів перебігу патологічних процесів, асоційованих з постковідним синдромом, а також як можливих мішеней для корекції порушень гемостатичного гомеостазу.

1. Встановлено порушення функціонального стану системи зсідання крові у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, що проявляється зростанням концентрації фібриногену, підвищенням потенційної активності молекул протромбінового походження на тлі зниження інгібіторного потенціалу антитромбіну III та накопиченням у кровотоці донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C) і 125 ± 5 Індекс (S/C) розчинних фібрин-мономерних комплексів. Сукупність цих змін свідчить про активацію процесів коагуляції та формування стану підвищеної схильності до тромбоутворення у реконвалесцентів після COVID-19.

2. Виявлено дисбаланс у функціонуванні фібринолітичної ланки системи гемостазу у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Зокрема зростання потенційної активності плазміногену та потенційної активності тканинного активатора плазміногену у донорів з титрами антитіл проти SARS-CoV-2 55 ± 5 Індекс (S/C), 75 ± 5 Індекс (S/C) і 125 ± 5 Індекс (S/C) при

одночасному зростанні інгібіторного потенціалу α_2-антиплазміну, α_1-антитрипсину, α_2-макроглобуліну та рівня інгібітора активатора плазміногену-1, що призводить до зниження фібринолітичного потенціалу плазми крові у постковідний період.

3. Виявлено, що постковідний період відзначається посиленням протеолітичних процесів, опосередкованих матриксними металопротеїназами, із варіабельністю внеску окремих ферментів залежно від титру антитіл проти SARS-CoV-2. Для всіх досліджуваних груп донорів характерним є підвищення вмісту та активності ММП-9, а також зростання рівня і активності ММП-2, за винятком донорів із титром антитіл проти SARS-CoV-2 125 ± 5 Індекс (S/C).

4. Встановлено зростання концентрації серинових протеїназ у плазмі крові донорів із титрами антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 Індекс (S/C), 55 ± 5 Індекс (S/C), 150 ± 5 Індекс (S/C), а також виявлено наявність у складі фракції серинових протеїназ, очищених з плазми крові донорів всіх досліджуваних груп донорів, високомолекулярних білкових комплексів.

5. Виявлено, що постковідний період супроводжується збереженням низькоінтенсивного системного запального процесу, який проявляється підвищенням концентрації С-реактивного білка та феритину у плазмі крові донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, а також зростанням рівнів прозапальних цитокінів IL-6 (за винятком донорів із титром 125 ± 5 S/C) та IL-1β (за винятком донорів із титром 55 ± 5 S/C).

6. Виявлені зміни у вмісті ростових і транскрипційних факторів - VEGF, FGF-2, PDGF, NF-κB та HIF-1α - мають різноспрямований характер залежно від титру антитіл проти SARS-CoV-2 та свідчать про порушення механізмів регуляції й реалізації регенераційного потенціалу організму у постковідний період.

7. У результаті поєднання методів афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі та протеїн А-сефарозі з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 було очищено фракції, що містять комплекси антитіл з білками, які мають спорідненість до бензамідин-сефарози. Аналіз очищених комплексів методом електрофорезу за відновлювальних і невідновлювальних

умов довів ковалентну природу взаємодій між складовими комплексу, а використання антитіл проти плазміногену підтвердило, що до складу комплексів входять молекули плазміногенового походження різного ступеню деградації.

8. Встановлено, що молекули плазміногенового походження у складі очищених комплексів виявляють здатність до спонтанного гідролізу хромогенного субстрату, специфічного для плазміну, інтенсивність якого суттєво підвищується після інкубації зі стрептокіназою. Крім того, продемонстровано залежну від титру антитіл проти SARS-CoV-2 здатність цих комплексів розщеплювати фібриноген.

9. Встановлено, що у пацієнтів із розсіяним склерозом порушення у системі гемостазу мають системний характер та проявляються активацією коагуляційного каскаду у поєднанні з пригніченням антикоагуляційних і фібринолітичних механізмів, тоді як при остеоартриті зміни у функціонуванні системи гемостазу мають переважно реактивний характер і характеризуються активацією коагуляції на тлі виснаження антикоагуляційної активності та збереження компенсаторного фібринолізу. Водночас після перенесеного COVID-19 в обох групах пацієнтів спостерігається більш виражена дестабілізація гемостатичного балансу, яка виявляється посиленням коагуляції.

10. Виявлено, що плазма крові пацієнтів з розсіяним склерозом та остеоартритом містить ковалентні білкові комплекси між антитілами та молекулами плазміногенового і протромбінового походження, рівень яких був суттєво вищим у осіб, що перенесли COVID-19.

11. На основі результатів кореляційного аналізу виокремлено групу показників, що демонструють найвищий ступінь взаємозв’язку з титром антитіл проти SARS-CoV-2 і можуть розглядатися як ключові параметри для оцінки змін у функціонуванні коагуляційної та фібринолітичної ланок системи гемостазу, а також для визначення ступеня активації протеолізу та збереження запального процесу у постковідний період.

12. Запропоновано концепцію участі комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження у формуванні та підтриманні

дисбалансу між коагуляційною й фібринолітичною ланками системи гемостазу, що сприяє персистенції гіперкоагуляційного стану у постковідний період.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Wang, R. and Naeem, M.A. (2025). COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Meta-Review of Global Impacts, Responses, and Future Preparedness. Clinical Respiratory Journal, 19(11), e70134. https://doi.org/10.1111/crj.70134

2. Chung, Y.-S., Lam, C.-Y., Tan, P.-H., Tsang, H.-F. and Wong, S.-C.C. (2024). Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. International Journal of Molecular Sciences, 25(15), 8155. https://doi.org/10.3390/ijms25158155

3. Davis, H.E., McCorkell, L., Moore Vogel, J. and Topol, E.J. (2023). Long COVID: Major Findings, Mechanisms and Recommendations. Nature Reviews Microbiology, 21(3), pp.133–146. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2

4. Gheorghita, R., Soldanescu, I., Lobiuc, A., Caliman Sturdza, O.A., Filip, R., Constantinescu-Bercu, A., Dimian, M., Mangul, S. and Covasa, M. (2024). The Knowns and Unknowns of Long COVID-19: From Mechanisms to Therapeutical Approaches. Frontiers in Immunology, 15, 1344086. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1344086

5. Bohmwald, K., Diethelm-Varela, B., Rodríguez-Guilarte, L., Rivera, T., Riedel, C.A., González, P.A. and Kalergis, A.M. (2024). Pathophysiological, Immunological, and Inflammatory Features of Long COVID. Frontiers in Immunology, 15, 1341600. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1341600

6. Greenhalgh, T., Sivan, M., Perlowski, A. and Nikolich, J.Ž. (2024). Long COVID: A Clinical Update. The Lancet, 404(10453), pp.707–724. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01136-X

7. Galipeau, Y., Cooper, C. and Langlois, M.-A. (2025). Autoantibodies in COVID-19: Implications for Disease Severity and Clinical Outcomes. Frontiers in Immunology, 15, 1509289. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1509289

8. Wilhelm, F., Cadamuro, J. and Mink, S. (2025). Autoantibodies in Long COVID: A Systematic Review. The Lancet Infectious Diseases, (Online ahead of print). https://doi.org/10.1016/S1473-3099(25)00411-6

9. Wong, T.L. and Weitzer, D.J. (2021). Long COVID and Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS) – A Systematic Review and Comparison of Clinical Presentation and Symptomatology. Medicina (Kaunas), 57(5), 418. https://doi.org/10.3390/medicina57050418

10. Fujinami, R.S., von Herrath, M.G., Christen, U. and Whitton, J.L. (2006). Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. Clinical Microbiology Reviews, 19(1), pp.80–94. https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.80-94.2006

11. Shen, Z., Xiao, Y., Kang, L., Ma, W., Shi, L., Zhang, L., Zhou, Z., Yang, J., Zhong, J., Yang, D., Guo, L., Zhang, G., Li, H., Xu, Y., Chen, M., Gao, Z., Wang, J., Ren, L., and Li, M. (2020). Genomic Diversity of Severe Acute Respiratory Syndrome–Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019. Clinical Infectious Diseases, 71(15), pp.713–720. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa203

12. Post COVID-19 condition (Long COVID). Available online at: https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition (Accessed Jul. 29, 2023).

13. Nittas, V., Gao, M., West, E., Ballouz, T., Menges, D., Hanson, S.W. et al. (2022). Long COVID through a Public Health Lens: An Umbrella Review. Public Health Reviews, 43, 1–10. https://doi.org/10.3389/phrs.2022.1604501

14. Venkatesan, P. (2021). NICE Guideline on Long COVID. The Lancet Respiratory Medicine, 9, p.129. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00031-X

15. Mantovani, A., Morrone, M.C., Patrono, C., Santoro, M.G., Schiaffino, S., Remuzzi, G. et al. (2022). Long COVID: Where We Stand and Challenges Ahead. Cell Death & Differentiation, 29, pp.1891–1900. https://doi.org/10.1038/s41418-022-01052-6

16. Davis, H.E., McCorkell, L., Vogel, J.M. and Topol, E.J. (2023). Long COVID: Major Findings, Mechanisms and Recommendations. Nature Reviews Microbiology, 21, pp.133–146. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2

17. Rando, H.M., Bennett, T.D., Byrd, J.B., Bramante, C., Callahan, T.J., Chute, C.G. et al. (2021). Challenges in Defining Long COVID: Striking Differences Across Literature, Electronic Health Records, and Patient-Reported Information. medRxiv. https://doi.org/10.1101/2021.03.20.21253896

18. Cil B., Kabak M. (2022). Persistent Post-COVID Symptoms and the Related Factors. Turkish Thoracic Journal, 23(1): 1–8. DOI: 10.5152/TurkThoracJ.2022.21112

19. Mantovani, A., Morrone, M.C., Patrono, C., Santoro, M.G., Schiaffino, S., Remuzzi, G. et al. (2022). Long COVID: Where We Stand and Challenges Ahead. Cell Death & Differentiation, 29, pp.1891–1900. https://doi.org/10.1038/s41418-022-01052-6

20. Nguyen N.N., Hoang V.T., Dao T.L. et al. (2022). Clinical patterns of somatic symptoms in patients suffering from post-acute long COVID: a systematic review. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 41(3): 431–444. DOI: 10.1007/s10096-022-04417-4

21. Kelly J.D. et al. (2023). SARS-CoV-2 post-acute sequelae in previously hospitalised patients: systematic literature review and meta-analysis. European Respiratory Review, 32(168): 220254. DOI: 10.1183/16000617.0254-2022

22. Khazaal, S., Harb, J., Rima, M., Annweiler, C., Wu, Y., Cao, Z. et al. (2022). The Pathophysiology of Long COVID Throughout the Renin–Angiotensin System. Molecules, 27(9), 2903. https://doi.org/10.3390/molecules27092903

23. Arish, M., Qian, W., Narasimhan, H. and Siu, J. (2023). COVID-19 Immunopathology: From Acute Disease to Chronic Sequelae. Journal of Medical Virology, 95, e28122. https://doi.org/10.1002/jmv.28122

24. Gheorghita, R., Soldanescu, I., Lobiuc, A., Caliman Sturdza, O.A., Filip, R., Constantinescu–Bercu, A., Dimian, M., Mangul, S. and Covasa, M. (2024). The Knowns and Unknowns of Long COVID-19: From Mechanisms to Therapeutical

Approaches. Frontiers in Immunology, 15, 1344086. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1344086

25. Dobrowolska, K., Zarębska-Michaluk, D., Poniedziałek, B., Jaroszewicz, J., Flisiak, R. and Rzymski, P. (2023). Overview of Autoantibodies in COVID-19 Convalescents. Journal of Medical Virology, 95(6), e28864. https://doi.org/10.1002/jmv.28864

26. O'Mahoney, L., Routen, A., Gillies, C., Ekezie, W., Welford, A., Zhang, A., Karamchandani, U., Simms-Williams, N., Cassambai, S., Ardavani, A., Horsley, A., Sheridan, E.A., Buch, M., Thomas, R.H., Greenhaff, P., Goodacre, S., & Hodgson, L.E. (2022). The Prevalence and Long-Term Health Effects of Long COVID Among Hospitalised and Non-Hospitalised Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. EClinicalMedicine, 54, 101762. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101762

27. Parthasarathy, H., Gupta, D., Ap, S., Tandel, D. and Harshan, K.H. (2021). Suppression of Global Protein Translation in SARS-CoV-2 Infection. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2021.05.08.443207

28. Xu, G., Qi, F., Li, H., Yang, Q., Wang, H., Wang, X., Liu, X., Zhao, J., Liao, X., Liu, Y., Liu, L., Zhang, S., Zhang, C., Tien, P., and Zhang, Y. (2020). The Differential Immune Responses to COVID-19 in Peripheral and Lung Revealed by Single-Cell RNA Sequencing. Cell Discovery, 6(1), 73. https://doi.org/10.1038/s41421-020-00225-2

29. Li, S., Jiang, L., Li, X., Lin, F., Wang, Y., Li, B., Jiang, T., An, W., Liu, S., Liu, H., Xu, P., Zhao, L., Zhang, Q., Du, H., Zhang, H., Peng, C., Shen, T., Dong, M., Chen, H., Liu, J., and Zhang, J. (2021). Epigenetic Landscapes of Single-Cell Chromatin Accessibility and Transcriptomic Immune Profiles of T Cells in COVID-19 Patients. Frontiers in Immunology, 12, 625881. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625881

30. Wen, W., Su, W., Tang, H., Le, W., Zhang, X., Zheng, Y., Liu, X., Xie, L., Li, J., Ye, J., Cui, X., McClain, M.T., Xu, Y., Petri, M.A., Zhou, X., Liu, X., and Liu, Y. (2020). Immune Cell Profiling of COVID-19 Patients in the Recovery Stage

by Single-Cell Sequencing. Cell Discovery, 6(1), 31. https://doi.org/10.1038/s41421-020-0168-9

31. Zhao, Z.-S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P.A. and Cantor, H. (1998). Molecular Mimicry by Herpes Simplex Virus Type 1: Autoimmune Disease After Viral Infection. Science, 279, pp.1344–1347. https://doi.org/10.1126/science.279.5355.1344

32. Murphy, W.J. and Longo, D.L. (2021). A Possible Role for Anti-Idiotype Antibodies in SARS-CoV-2 Infection and Vaccination. The New England Journal of Medicine, 386, pp.394–396. https://doi.org/10.1056/NEJMcibr2113694

33. Shukla, A.K. and Misra, S. (2022). Clinical Implications of Anti-Idiotype Antibodies in COVID-19. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 33, pp.727–733. https://doi.org/10.1515/jbcpp-2022-0123

34. Didona, D. and Di Zenzo, G. (2018). Humoral Epitope Spreading in Autoimmune Bullous Diseases. Frontiers in Immunology, 9, 779. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00779

35. Miller, S.D., Katz-Levy, Y., Neville, K.L. and Vanderlugt, C.L. (2001). Virus-Induced Autoimmunity: Epitope Spreading to Myelin Autoepitopes in Theiler's Virus Infection of the Central Nervous System. In: Advances in Virus Research, 56, pp.199–217. Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(01)56008-X

36. Sauter, J.L., Baine, M.K., Butnor, K.J., Buonocore, D.J., Chang, J.C., Jungbluth, A.A. et al. (2020). Insights into Pathogenesis of Fatal COVID-19 Pneumonia from Histopathology with Immunohistochemical and Viral RNA Studies. Histopathology, 77, pp.915–925. https://doi.org/10.1111/his.14201

37. Su, Q., Lau, R.I., Liu, Q., Chan, F.K.L. and Ng, S.C. (2023). Post-Acute COVID-19 Syndrome and Gut Dysbiosis Linger Beyond 1 Year After SARS-CoV-2 Clearance. Gut, 72, pp.1230–1232. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328319

38. Ruíz-Argüelles, G.J., Ruíz-Argüelles, A., Alarcón-Segovia, D., Drenkard, C., Villa, A., Cabiedes, J., Presno-Bernal, M., Delezé, M., Ortiz-López, R. and Vázquez-Prado, J. (1991). Natural Anticoagulants in Systemic Lupus Erythematosus: Deficiency of Protein S Bound to C4bp Associates with Recent History of Venous

Thromboses, Antiphospholipid Antibodies, and the Antiphospholipid Syndrome. The Journal of Rheumatology, 18(4), pp.552–558.

39. Mei, Z.W., van Wijk, X.M.R., Pham, H.P. and Marin, M.J. (2021). Role of von Willebrand Factor in COVID-19-Associated Coagulopathy. The Journal of Applied Laboratory Medicine, 6(5), pp.1305–1315. https://doi.org/10.1093/jalm/jfab042

40. Evans, C.E. (2019). Hypoxia and HIF Activation as a Possible Link Between Sepsis and Thrombosis. Thrombosis Journal, 17, 16. https://doi.org/10.1186/s12959-019-0205-9

41. Deng, F., Wang, S., Xu, R., Yu, W., Wang, X. and Zhang, L. (2018). Endothelial Microvesicles in Hypoxic Hypoxia Diseases. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 22(7), pp.3708–3718. https://doi.org/10.1111/jcmm.13671

42. Fernández-Lázaro, D., Sánchez-Serrano, N., Mielgo-Ayuso, J., García-Hernández, J.L., González-Bernal, J.J. and Seco-Calvo, J. (2021). Long COVID: A New Derivative in the Chaos of SARS-CoV-2 Infection? The Emergent Pandemic? Journal of Clinical Medicine, 10(24), 5799. https://doi.org/10.3390/jcm10245799

43. Stark, K. and Massberg, S. (2021). Interplay Between Inflammation and Thrombosis in Cardiovascular Pathology. Nature Reviews Cardiology, 18(9), pp.666–682. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00552-1

44. Su, Q., Lau, R.I., Liu, Q., Chan, F.K.L. and Ng, S.C. (2023). Post-Acute COVID-19 Syndrome and Gut Dysbiosis Linger Beyond 1 Year After SARS-CoV-2 Clearance. Gut, 72, pp.1230–1232. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-328319

45. Liu, Q., Su, Q., Zhang, F. et al. (2022). Multi-Kingdom Gut Microbiota Analyses Define COVID-19 Severity and Post-Acute COVID-19 Syndrome. Nature Communications, 13, 6806. https://doi.org/10.1038/s41467-022-34535-8

46. Argañaraz, G.A., da Fonseca Palmeira, J. and Argañaraz, E.R. (2020). Phosphatidylserine Inside Out: A Possible Underlying Mechanism in the Inflammation and Coagulation Abnormalities of COVID-19. Cell Communication and Signaling, 18(1), 190. https://doi.org/10.1186/s12964-020-00687-7

47. Althaus, K., Marini, I., Zlamal, J., Pelzl, L., Singh, A., Häberle, H., Mehrländer, M., Hammer, S., Schulze, H., Bitzer, M. et al. (2021). Antibody-Induced Procoagulant Platelets in Severe COVID-19 Infection. Blood, 137(8), pp.1061–1071. https://doi.org/10.1182/blood.2020008762

48. Dobrowolska, K., Włodarczyk, A., Ratajczak, A., Rola, R. and Ziętek, Z. (2023). Autoantibodies Induced by SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review. Journal of Medical Virology, 95(8), e28970. https://doi.org/10.1002/jmv.28970

49. Sacchi, M.C., Tamiazzo, S., Stobbione, P., Agatea, L., Riso, P.L., Fortini, J., et al. (2021). SARS-CoV-2 infection as a trigger of autoimmune response. Clinical and Translational Science, 14(3), pp.898–907. https://doi.org/10.1111/cts.12953

50. Chang, S.E., Feng, A., Meng, W., Apostolidis, S.A., Mack, E., Artandi, M., Barman, L., et al. (2021). New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. Nature Communications, 12(1), p.5417. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25509-3

51. Frumholtz, L., Bouaziz, J.-D., Battistella, M., Hadjadj, J., Chocron, R., Bengoufa, D., et al. (2021). Type I interferon response and vascular alteration in chilblain-like lesions during the COVID-19 outbreak. British Journal of Dermatology, 185(6), pp.1176–1185. https://doi.org/10.1111/bjd.20707

52. Zhang, Y., Xiao, M., Zhang, S., Xia, P., Cao, W., Jiang, W., et al. (2020). Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with COVID 19. The New England Journal of Medicine, 382(17), p.e38. https://doi.org/10.1056/NEJMc2007575

53. Wang, E.Y., Mao, T., Klein, J., Dai, Y., Huck, J.D., Jaycox, J.R., A. et al. (2021). Diverse functional autoantibodies in patients with COVID 19. Nature, 595(7866), pp.283–288. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03631-y

54. Chen, D., Zhao, Y.G. and Zhang, L. (2022). Endomembrane Remodeling in SARS-CoV-2 Infection. Cell Insight, 1, 100031. https://doi.org/10.1016/j.cellin.2022.100031

55. Upadhyay, M. and Gupta, S. (2022). Endoplasmic Reticulum Secretory Pathway: Potential Target Against SARS-CoV-2. Virus Research, 316, 198897. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198897

56. Lamers, M.M., Beumer, J., van der Vaart, J., Knoops, K., Puschhof, J., Breugem, T.I., et al. (2020). SARS-CoV-2 Productively Infects Human Gut Enterocytes. Science, 369(6499), pp.50–54. https://doi.org/10.1126/science.abc1669

57. Petrillo, M., Querci, M., Brogna, C., Bogo, G., Cattonaro, F., Cattoli, G., Cipollini, M., Di Caro, A., et al. (2022). Evidence of SARS-CoV-2 Bacteriophage Potential in Human Gut Microbiota. F1000Research, 11, 279. https://doi.org/10.12688/f1000research.109236.1

58. Zuo, T., Zhang, F., Lui, G.C.Y., Yeoh, Y.K., Li, A.Y.L., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A.C., Cheung, C.P., Chen, N., et al. (2020). Alterations in Gut Microbiota of Patients with COVID-19 During Time of Hospitalization. Gastroenterology, 159(3), pp.944–955.e8. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.05.048

59. Proal, A.D., Lindseth, I.A. and Marshall, T.G. (2017). Microbe–Microbe and Host–Microbe Interactions Drive Microbiome Dysbiosis and Inflammatory Processes. Discovery Medicine, 23(124), pp.51–60. https://doi.org/10.1016/2-s2.0-85014094341

60. Shin, W., Kim, H.J. and the Gut Inflammation on a Chip Research Team (2018). Intestinal Barrier Dysfunction Orchestrates the Onset of Inflammatory Host–Microbiome Crosstalk in a Human Gut Inflammation-on-a-Chip. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115(45), E10539–E10547. https://doi.org/10.1073/pnas.1810819115

61. Whitehurst, C.B. (2023). Incidence of Epstein–Barr Virus Reactivation Is Elevated in COVID-19 Patients. Virus Research, 331, 199157. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199157

62. Maguire, C., Hunter, M., Shah, M., Yang, H.S., Forde, T., Hernandez, M., Clausen, T.M., Verma, A., Sahoo, D., Mendez, A., Wells, J., Gaebler, C., Schwartz, R.E., Natarajan, K., and Ho, D.D. (2024). Chronic Viral Reactivation and Associated Host Immune Response and Clinical Outcomes in Acute COVID-19 and Post-Acute Sequelae of COVID-19. bioRxiv (preprint). https://doi.org/10.1101/2024.11.14.622799

63. Pedersen, S.F. and Ho, Y.-C. (2020). SARS-CoV-2: A Storm Is Raging. Journal of Clinical Investigation, 130(5), pp.2202–2205. https://doi.org/10.1172/JCI137647

64. Kuppalli, K. and Rasmussen, A.L. (2020). A Glimpse into the Eye of the COVID-19 Cytokine Storm. EBioMedicine, 57, 102789. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102789

65. Narayanan, S. (2000). Molecular Mimicry: Basis for Autoimmunity. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 15(2), pp.72–78. https://doi.org/10.1007/BF02867547

66. Carré, A., Vecchio, F., Flodström-Tullberg, M., You, S. and Mallone, R. (2023). Coxsackievirus and Type 1 Diabetes: Diabetogenic Mechanisms and Implications for Prevention. Endocrine Reviews, 44(2), bnad007. https://doi.org/10.1210/endrev/bnad007

67. Sane, F., Moumna, I. and Hober, D. (2011). Group B Coxsackieviruses and Autoimmunity: Focus on Type 1 Diabetes. Expert Review of Clinical Immunology, 7(3), pp.357–367. https://doi.org/10.1586/ECI.11.11

68. Perlemuter, G., Cacoub, P., Sbai, A., et al. (2003). Hepatitis C Virus Infection in Systemic Lupus Erythematosus: A Case-Control Study. The Journal of Rheumatology, 30(7), pp.1473–1477.

69. Ebringer, A. and Rashid, T. (2006). Rheumatoid Arthritis Is an Autoimmune Disease Triggered by Proteus Urinary Tract Infection. Clinical and Developmental Immunology, 13(1), pp.41–48. https://doi.org/10.1080/17402520600576586

70. Sjöwall, C., Ernerudh, J., Bengtsson, A.A., Sturfelt, G. and Skogh, T. (2004). Reduced Anti-TNFα Autoantibody Levels Coincide with Flare in Systemic Lupus Erythematosus. Journal of Autoimmunity, 22(4), pp.315–323. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.02.003

71. Avrameas S. Natural autoantibodies: from ‘horror autotoxicus’ to ‘gnothi seauton’. Immunol Today. (1991) 12:154–9. doi: 10.1016/S0167-5699(05)80045-3

72. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. Curr Opin Immunol. (1995) 7:812–8. doi: 10.1016/0952-7915(95)80053-0

73. Avrameas S, Alexopoulos H, Moutsopoulos HM. Natural autoantibodies: an undersugn hero of the immune system and autoimmune disorders-A point of view. Front Immunol. (2018) 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01320

74. Smatti MK, Cyprian FS, Nasrallah GK, Al Thani AA, Almishal RO, Yassine HM. Viruses and autoimmunity: A review on the potential interaction and molecular mechanisms. Viruses. (2019) 11. doi: 10.3390/v11080762

75. Kanduc D, Stufano A, Lucchese G, Kusalik A. Massive peptide sharing between viral and human proteomes. Peptides. (2008) 29:1755–66. doi: 10.1016/j.peptides.2008.05.022

76. Wang, E.Y., Mao, T., Klein, J., Dai, Y., Huck, J.D., Jaycox, J.R., Zhou, T. et al. (2021). Diverse Functional Autoantibodies in Patients with COVID-19. Nature, 595(7866), pp.283–288. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03631-y

77. Chang, S.E., Feng, A., Meng, W., Apostolidis, S.A., Mack, E., Artandi, M., Barman, L., Bennett, K. et al. (2021). New-Onset IgG Autoantibodies in Hospitalized Patients with COVID-19. Nature Communications, 12(1), 5417. https://doi.org/10.1038/s41467-021-25509-3

78. Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon JS, Jude KM, Fernandez D, et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. Nature. (2022) 603:321–7. doi: 10.1038/s41586-022-04432-7

79. Pacheco, Y., Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D.M., Chang, C., Gershwin, M.E. and Anaya, J.-M. (2019). Bystander Activation and Autoimmunity. Journal of Autoimmunity, 103, 102301. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.06.012

80. Lee, H., Jeong, S. and Shin, E.-C. (2022). Significance of Bystander T Cell Activation in Microbial Infection. Nature Immunology, 23, pp.13–22. https://doi.org/10.1038/s41590-021-00985-334

81. Fonseca, D.L.M., Filgueiras, I.S., Marques, A.H.C., Vojdani, E., Halpert, G., Ostrinski, Y. et al. (2023). Severe COVID-19 Patients Exhibit Elevated Levels of

Autoantibodies Targeting Cardiolipin and Platelet Glycoprotein with Age: A Systems Biology Approach. NPJ Aging, 9, 21. https://doi.org/10.1038/s41514-023-00118-0

82. Woodruff, M.C., Ramonell, R.P., Haddad, N.S., Anam, F.A., Rudolph, M.E., Walker, T.A. et al. (2022). Dysregulated Naive B Cells and De Novo Autoreactivity in Severe COVID-19. Nature, 611, pp.139–147. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05273-0

83. Sjöwall, C., Ernerudh, J., Bengtsson, A.A., Sturfelt, G. and Skogh, T. (2004). Reduced Anti-TNFα Autoantibody Levels Coincide with Flare in Systemic Lupus Erythematosus. Journal of Autoimmunity, 22(4), pp.315–323. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.02.003

84. Dennis, A., Wamil, M., Alberts, J., Oben, J., Cuthbertson, D.J., Wootton, D., Crooks, M., Gabbay, M., Brady, M., Hishmeh, L., Attree, E., Heightman, M., Banerjee, R. and Banerjee, A. (2021). Multiorgan Impairment in Low-Risk Individuals with Post-COVID-19 Syndrome: A Prospective, Community-Based Study. BMJ Open, 11(3), e048391. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-048391

85. Dennis, A., Cuthbertson, D.J., Wootton, D., Crooks, M., Gabbay, M.E., Eichert, N., Mouchti, S., Pansini, M., Roca-Fernandez, A., Thomaides-Brears, H., Kelly, M., Robson, M., Hishmeh, L., Attree, E., Heightman, M., Banerjee, R. and Banerjee, A. (2022). Multi-Organ Impairment and Long COVID: A One-Year Prospective, Longitudinal Cohort Study. medRxiv (preprint). https://doi.org/10.1101/2022.03.18.22272607

86. Xie, Y., Xu, E., Bowe, B. and Al-Aly, Z. (2022). Long-Term Cardiovascular Outcomes of COVID-19. Nature Medicine, 28, pp.583–590. https://doi.org/10.1038/s41591-022-01689-3

87. Puntmann, V.O. et al. (2020). Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). JAMA Cardiology, 5, pp.1265–1273. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.3557

88. Roca-Fernández, A. (2022). Cardiac Impairment in Long COVID One Year Post-SARS-CoV-2 Infection. European Heart Journal, 43, ehac544.219. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac544.219

89. Charnley, M., Islam, S., Bindra, G.K., Engwirda, J., Ratcliffe, J., Zhou, J., Mezzenga, R., Hulett, M.D., Han, K., Berryman, J.T. and Reynolds, N.P. (2022). Neurotoxic Amyloidogenic Peptides in the Proteome of SARS-CoV-2: Potential Implications for Neurological Symptoms in COVID-19. Nature Communications, 13(1), 3387. https://doi.org/10.1038/s41467-022-30932-1

90. Visser, D., Golla, S.S.V., Verfaillie, S.C.J., Coomans, E.M., Rikken, R.M., van de Giessen, E.M., den Hollander, M.E., Verveen, A., Yaqub, M. et al. (2022). Long COVID Is Associated with Extensive In Vivo Neuroinflammation on [18F]DPA-714 PET. medRxiv (preprint). https://doi.org/10.1101/2022.06.02.22275916

91. Cahill, P. A. and Redmond, E. M. (2016). Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis, 248, pp. 97-109. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007

92. Tarnawski, A. S. and Ahluwalia, A. (2022). Endothelial cells and blood vessels are major targets for COVID-19-induced tissue injury and spreading to various organs. World journal of gastroenterology, 28(3), pp. 275-289. https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i3.275

93. Vassiliou, A. G., Vrettou, C. S., Keskinidou, C., Dimopoulou, I., Kotanidou, A. and Orfanos, S. E. (2023). Endotheliopathy in Acute COVID-19 and Long COVID. International journal of molecular sciences, 24(9), pp. 82-97. https://doi.org/10.3390/ijms24098237

94. Ackermann, M., Verleden, S. E., Kuehnel, M., Haverich, A., Welte, T., Laenger, F., Vanstapel, A., Werlein, C., Stark, H., Tzankov, A., Li, W. W., Li, V. W., Mentzer, S. J. and Jonigk, D. (2020). Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. The New England journal of medicine, 383(2), pp. 120-128. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432

95. Haffke, M., Freitag, H., Rudolf, G., Seifert, M., Doehner, W., Scherbakov, N., Hanitsch, L., Wittke, K., Bauer, S., Konietschke, F., Paul, F., Bellmann-Strobl, J., Kedor, C., Scheibenbogen, C. and Sotzny, F. (2022). Endothelial Dysfunction and Altered Endothelial Biomarkers in Patients with Post-COVID-19 Syndrome and Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS). Journal of Translational Medicine, 20(1), 138. https://doi.org/10.1186/s12967-022-03346-2

96. Charfeddine, S., Ibn Hadj Amor, H., Jdidi, J., Torjmen, S., Kraiem, S., Hammami, R., Bahloul, A., Kallel, N., Moussa, N., Touil, I., Ghrab, A., Elghoul, J. et al. (2021). Long COVID-19 Syndrome: Is It Related to Microcirculation and Endothelial Dysfunction? Insights from TUN-EndCOV Study. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 8, 745758. https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.745758

97. Ahamed, J. and Laurence, J. (2022). Long COVID Endotheliopathy: Hypothesized Mechanisms and Potential Therapeutic Approaches. Journal of Clinical Investigation, 132(15), e161167. https://doi.org/10.1172/JCI161167

98. Pisareva, E., Badiou, S., Mihalovičová, L., Mirandola, A., Pastor, B., Kudriavtsev, A., Berger, M., Roubille, C. and Fesler, P. et al. (2023). Persistence of Neutrophil Extracellular Traps and Anticardiolipin Autoantibodies in Post-Acute Phase COVID-19 Patients. Journal of Medical Virology, 95(1), e28209. https://doi.org/10.1002/jmv.28209

99. Freire, M., Andrade, A., Sopeña, B., Lopez-Rodriguez, M., Varela, P., Cacabelos, P., Esteban, H. and González-Quintela, A. (2021). Guillain Barré syndrome associated with COVID-19- lessons learned about its pathogenesis during the first year of the pandemic, a systematic review. Autoimmunity reviews, 20(8), pp. 102-115. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102875

100. Tawakul, A. A., Al-Doboke, A. W., Altayyar, S. A., Alsulami, S. A., Alfahmi, A. M. and Nooh, R. T. (2021). Guillain-Barré Syndrome in the COVID-19 Pandemic. Neurology international, 14(1), pp. 34–48. https://doi.org/10.3390/neurolint14010003

101. Carnevale, S., Giovanetti, M., Benvenuto, D., Ciccozzi, M. and Broccolo, F. (2023). Is Molecular Mimicry between hPF4 and SARS-CoV-2 Spike Protein a

Potential Basis for Autoimmune Responses in Vaccinated and Naturally Infected Patients?. Seminars in thrombosis and hemostasis, 49(1), pp. 103-104. https://doi.org/10.1055/s-0041-1742092

102. Knight, J.S., Caricchio, R., Casanova, J.-L., Combes, A.J., Diamond, B., Fox, S.E., Hanauer, D.A. et al. (2021). The Intersection of COVID-19 and Autoimmunity. Journal of Clinical Investigation, 131(24), e154886. https://doi.org/10.1172/JCI154886

103. Tung, M. L., Tan, B., Cherian, R. and Chandra, B. (2021). Anti-phospholipid syndrome and COVID-19 thrombosis: connecting the dots. Rheumatology advances in practice, 5(1), pp. 65-81. https://doi.org/10.1093/rap/rkaa081

104. Raber, M.N. (1990). Coagulation Tests. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 157.

105. Tollefsen, D.M., and Blank, M.K. (1981). Selective Affinity Chromatography of Antithrombin on Heparin–Sepharose. The Journal of Biological Chemistry, 256(12), pp. 7035–7041.

106. Hougie, C., and Twining, S.S. (1966). Purification of Prothrombin and Other Vitamin K–Dependent Plasma Proteins by Barium Sulfate Adsorption. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 68(2), pp. 344–355.

107. Мариненко, М., Галенова, Т. та Савчук, О. (2021). Пептидна фракція сироватки крові пацієнтів з інфарктом міокарда та різними формами стенокардії. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка Біологія, 2(85). сс. 23-27.

108. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Amersham Pharmacia Biotech AB. 2011;156.

109. Deutsch, D.G., and Mertz, E.T. (1970). Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography on Lysine–Sepharose. Science, 170(3962), pp. 1095–1096. https://doi.org/10.1126/science.170.3962.1095

110. Варецька ТВ. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген. Український біохімічний журнал. 1960;32(2):13 - 24

111. Токар, А.В., Макогоненко, Е.М. та Платонова, Т.М. (1994). Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньовенного мікрозсідання крові (методичні рекомендації). Київ: Макком.

112. Інструкція до MAGLUMI D-димер (ІХЛА), Snibe Diagnostic.

113. Kravchenko, O., Melnyk, V., Tsarenko, T., Kostiuk, O., Halenova, T., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O. and Ostapchenko, L. (2018). The blood coagulation tests from ischemic stroke patients with or withouttype 2 diabetes mellitus. Biomedical Research, 29 (14), pp. 2938-2943. https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-332

114. Kravchenko, O., Raksha, N., Halenova, T., Ishchuk, T., Vovk, T. and Savchuk, O. (2018). Fibrinolytic parameters under ischemic stroke with diabetes mellitus combination. Periodicum Biologorum, 120(2-3), pp. 111-117. Eriksson, E., Ranby, M., Gyzander, E. and Risberg, B. (1988). Determination of plasminogen activator inhibitor in plasma using t-PA and a chromogenic single-point poly-D-lysine stimulated assay. Thrombosis Research, 50(1), pp. 91-101.

115. Crowther, J.R. (2000). The ELISA guidebook. Methods in Molecular Biology

116. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини: Підручник. Тернопіль: Укрмедкнига, 2002, 744 с.

117. Laemmli, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(1), pp. 680-685.

118. Ostapchenko L, Savchuk O, Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. Adv Biosci Biotech. 2011;2:20-26.

119. Варецька ТВ. Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген. Український біохімічний журнал. 1960;32(2):13 – 24.

120. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;2:248-254.

121. Mahmood, T. and Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. North American Journal of Medical Sciences, 4(9), pp.429–434. https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998

122. Canzano, P., Brambilla, M., Porro, B., Cosentino, N., Tortorici, E., Vicini, S., Di Minno, A., Poggio, P., Corti, A., et al. (2021). Platelet and endothelial activation as potential mechanisms behind the thrombotic complications of COVID 19 patients. JACC: Basic to Translational Science, 6(2), pp.202–218. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.12.009

123. Wang, L., He, W.B., Yu, X.M., Hu, D.L. and Jiang, H. (2020). Prolonged prothrombin time at admission predicts poor clinical outcome in COVID-19 patients. World Journal of Clinical Cases, 8(19), pp. 4370-4379.

124. Bull, B. and Hay, K. (2021). Untangling COVID-19 Pathophysiology Part I: Oligomeric (Soluble) Fibrin Forming Transient Microclots Enhances the Lethality of COVID-19. The Korean Journal of Internal Medicine (preprint).

125. Hardy, M., Lecompte, T., Douxfils, J., Lessire, S., Dogne, J. M., Chatelain, B., Testa, S., Gouin-Thibault, I., Gruel, Y., Medcalf, R. L., Ten Cate, H., Lippi, G., and Mullier, F. (2020). Management of the thrombotic risk associated with COVID-19: guidance for the hemostasis laboratory. Thrombosis Journal, 18(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/s12959-020-00230-z

126. von Meijenfeldt, F. A., Havervall, S., Adelmeijer, J., Lundström, A., Magnusson, M., Mackman, N., Thalin, C., and Ten Cate, H. (2021). Sustained prothrombotic changes in COVID-19 patients 4 months after hospital discharge. Blood Advances, 5(3), 756–759. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003968

127. Rostami, M. and Mansouritorghabeh, H. (2020). D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. Expert Review of Hematology, 13(11), pp. 1265-1275.

128. He, X., Yao, F. and Chen, J. (2021). The poor prognosis and influencing factors of high D-dimer levels for COVID-19 patients. Scientific Reports, 11, p. 1830.

129. Taeschler, P., Cervia, C., Zurbuchen, Y., Hasler, S., Pou, C., Tan, Z., Adamo, S., Raeber, M. E., Bächli, E., Rudiger, A., Stüssi-Helbling, M., Huber, L. C.,

Brodin, P., Nilsson, J., Probst-Müller, E., and Boyman, O. (2022). Autoantibodies in COVID-19 correlate with antiviral humoral responses and distinct immune signatures. Allergy. https://doi.org/10.1111/all.15302

130. Santos Guedes de Sa, K., Silva, J., Bayarri-Olmos, R., Brinda, R., Constable, R. A. R., Colom Diaz, P. A., Kwon, D., Rodrigues, G., Wenxue, L., Baker, C., Bhattacharjee, B., Wood, J., Tabacof, L., Liu, Y., Putrino, D., Horvath, T. L., and Iwasaki, A. (2024). A causal link between autoantibodies and neurological symptoms in long COVID. medRxiv [Preprint], 2024.06.18.24309100. https://doi.org/10.1101/2024.06.18.24309100

131. Fonseca, D. L. M., Filgueiras, I. S., Marques, A. H. C., Vojdani, E., Halpert, G., Ostrinski, Y., Baiocchi, G. C., Plaça, D. R., Freire, P. P., et al. (2023). Severe COVID-19 patients exhibit elevated levels of autoantibodies targeting cardiolipin and platelet glycoprotein with age: a systems biology approach. npj Aging, 9, 21. https://doi.org/10.1038/s41514-023-00114-2

132. Favaloro, E.J., Henry, B.M. and Lippi, G. (2022). COVID-19 and antiphospholipid antibodies: time for a reality check? Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 48(1), pp.72–92. https://doi.org/10.1055/S-0041-1728832

133. Bitterman, L., Solhjoo, M., Shah, V., Kwon, S.M., Torralba, K. and Kazbour, H. (2023). Catastrophic Antiphospholipid Syndrome as a Complication of COVID-19 Infection. Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports, 11, article 23247096231165736. https://doi.org/10.1177/23247096231165736

134. Carpio, C., Qasem, A.-L., Buño, A., Borobia, A. M., Arnalich, F., Rey, V., Lázaro, T., Mariscal, P., Laorden, D., Salgueiro, G., Moreno, A., Peiró, C., Lorenzo, Ó., Álvarez-Sala, R., on behalf of Covid HULP Working Group, and on behalf of Postcovid HULP Working Group. (2023). Krebs von den Lungen-6 (KL-6) levels in post-COVID follow-up: Differences according to the severity of COVID-19. Journal of Clinical Medicine, 12, 6299. https://doi.org/10.3390/jcm12196299

135. Korolova, D., Shevchuk, O., Kostiuchenko, O., Chernyshenko, T., Klymenko, K., Platonova, T., Ivankiv, Y., Palii, S., Pak, A., Chernyshenko, V., Korda, M., Komisarenko, S., and Vari, S. G. (2022). Hematological findings in post-COVID-

19 recovery period: three-month follow-up study. SSRN Electronic Journal. https://ssrn.com/abstract=4234239

136. Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., & Topol, E. J. (2023). Long COVID: complications, underlying mechanisms, and clinical management. Viruses, 15(5), 1053–1069. https://doi.org/10.3390/v15051053

137. Passos, F.R.S., Heimfarth, L., Monteiro, B.S., Corrêa, C.B., de Moura, T.R., de Souza Araújo, A.A., Martins-Filho, P.R., Quintans-Júnior, L.J. and de Souza Siqueira Quintans, J. (2022). Oxidative stress and inflammatory markers in patients with COVID-19: Potential role of RAGE, HMGB1, GFAP and COX-2 in disease severity. International Immunopharmacology, 104, pp.108502–108502. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108502

138. Gudipati, S., Gao, H., Chen, M., Li, Z., Shen, J., Xu, Y., Lin, Y., and Zhao, J. (2025). Clinical outcomes of hospitalized immunocompromised patients with COVID-19 and the impact of hyperinflammation: a retrospective cohort study. Journal of Inflammation Research. https://doi.org/10.2147/JIR.S482940

139. Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H.-H., Beckmann, N. D., Nirenberg, S., Wang, B., et al. (2020). An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. Nature Medicine, 26(10), 1636–1643. https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9

140. Ackermann, M., Verleden, S. E., Kuehnel, M., Haverich, A., Welte, T., Laenger, F., et al. (2020). Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. New England Journal of Medicine, 383(2), 120–128. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432

141. RECOVERY Collaborative Group. (2021). Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. New England Journal of Medicine, 384(8), 693–704. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436

142. Gupta, S., Wang, W., Hayek, S. S., Chan, L., Mathews, K. S., Melamed, M. L., et al. (2021). Association between early treatment with tocilizumab and mortality among critically ill patients with COVID-19. JAMA Internal Medicine, 181(1), 41–51. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.6252

143. Nalbandian, A., Sehgal, K., Gupta, A., Madhavan, M. V., McGroder, C., Stevens, J. S., et al. (2021). Post-acute COVID-19 syndrome. Nature Medicine, 27(4), 601–615. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z.

144. Dennis, A., Wamil, M., Alberts, J., Oben, J., Cuthbertson, D. J., Wootton, D., et al. (2021). Multiorgan impairment in low-risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. BMJ Open, 11(3), e048391. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-048

145. Blomberg, B., Mohn, K. G. I., Brokstad, K. A., Zhou, F., Linchausen, D. W., Hansen, B. A., et al. (2021). Long COVID in a prospective cohort of home-isolated patients. Nature Medicine, 27(9), 1607–1613. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01433-3

146. Carfi, A., Bernabei, R., & Landi, F. (2020). Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. JAMA, 324(6), 603-605.

147. Phetsouphanh, C., Darley, D. R., Wilson, D. B., Howe, A., Munier, C. M., Patel, S. K., et al. (2022). Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. Nature Immunology, 23(2), 210–216. https://doi.org/10.1038/s41590-021-01113-x.

148. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & Карбовський, В. (2021). Показники згортання крові у вагітних жінок, хворих на COVID-19. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(86), 34–39. (здобувачем визначено час згортання крові у тестах АЧТЧ та ПЧ)

149. Kell, D.B., Laubscher, G.J. and Pretorius, E. (2022). A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC: origins and therapeutic implications. Biochemical Journal, 479(4), pp.537–559. https://doi.org/10.1042/BCJ20220016

150. Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. Science 181, 223–230 10.1126/science.181.4096.223

151. Blancas-Mejía, L.M. and Ramirez-Alvarado, M. (2013) Systemic amyloidoses. Annu. Rev. Biochem. 82, 745–774 10.1146/annurev-biochem-072611-130030

152. de Waal, G.M., Engelbrecht, L., Davis, T., de Villiers, W.J.S., Kell, D.B. and Pretorius, E. (2018) Correlative light-electron microscopy detects lipopolysaccharide and its association with fibrin fibres in Parkinson's disease, Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. Sci. Rep. 8, 16798 10.1038/s41598-018-35009-y

153. Pretorius, E., Page, M.J., Engelbrecht, L., Ellis, G.C. and Kell, D.B. (2017) Substantial fibrin amyloidogenesis in type 2 diabetes assessed using amyloid-selective fluorescent stains. Cardiovasc. Diabetol. 16, 141 10.1186/s12933-017-0624-5

154. Cilia La Corte, A.L., Philippou, H. and and Ariëns, R.A.S. (2011) Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease. Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 83, 75–127 10.1016/B978-0-12-381262-9.00003-3

155. Wang, F., Wang, X., Abskharon, R. and Ma, J. (2018) Prion infectivity is encoded exclusively within the structure of proteinase K-resistant fragments of synthetically generated recombinant PrP(Sc). Acta Neuropathol. Commun. 6, 30 10.1186/s40478-018-0534-0

156. Grobbelaar, L. M., Venter, C., Vlok, M., Ngoepe, M., Laubscher, G. J., Lourens, P. J., et al. (2021). SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis: implications for microclot formation in COVID-19. Bioscience Reports, 41, BSR20210611. https://doi.org/10.1042/BSR20210611

157. Kell, D. B., Laubscher, G. J., and Pretorius, E. (2022). A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC: origins and therapeutic implications. Biochemical Journal, 479(4), 537–559. https://doi.org/10.1042/BCJ20220016

158. Chernyshenko, V., Chernyshenko, T. M., Korolova, D., Volynets, G., Kolesnikova, I. N., Platonova, T. M., et al. (2015). Non-enzymatic activation of prothrombin induced by interaction with fibrin β26-42 region. Acta Biochimica Polonica, 62(3). https://doi.org/10.18388/abp.2014_896.

159. Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., and Topol, E. J. (2023). Long COVID: complications, underlying mechanisms, and clinical management. Viruses, 15(5), 1053–1069. https://doi.org/10.3390/v15051053

160. Raveendran, A. V., Jayadevan, R., and Sashidharan, S. (2021). Long COVID (PASC): an overview. Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 15(3), 869–875. https://doi.org/10.1016/j.dsx.2021.04.007

161. Crook, H., Raza, S., Nowell, J., Young, M., and Edison, P. (2021). Long COVID-mechanisms, risk factors, and management. BMJ, 374, n1648. https://doi.org/10.1136/bmj.n1648

162. Креницька, Д., Рачковська, А., Павлівський, Ю., Чижик, Ю., та Карбовський, В. (2022). Біохімічні параметри печінки за наявності у кровотоці анти-SARS-CoV-2 IgG. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 1(88), 33–41.

163. Foley, J. H., and Conway, E. M. (2016). Cross talk pathways between coagulation and inflammation. Circulation Research, 118(9), 1392–1408. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306853

164. Dasgupta, S. K., and Thiagarajan, P. (2007). Inhibition of thrombin activity by prothrombin activation fragment 1.2. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 24(2), 157–162. https://doi.org/10.1007/s11239-007-0018-8

165. Standeven, K.F., Carter, A.M., Grant, P.J., Weisel, J.W., Chernysh, I., Masova, L., Lord, S.T. and Ariëns, R.A.S. (2007). Functional analysis of fibrin γ-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. Blood, 110(3), pp.902–907. https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-066837

166. Sugi, T., and McIntyre, J. A. (1995). Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex. Blood, 86(8), 3083–3089. https://doi.org/10.1182/blood.V86.8.3083

167. 63. Oosting, J. D., Derksen, R. H., Bobbink, I. W., Hackeng, T. M., Bouma, B. N., and de Groot, P. G. (1993). Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? Blood, 81(10), 2618–2625. https://doi.org/10.1182/blood.V81.10.2618

168. 64. Galli, M., and Barbui, T. (1999). Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. Blood, 93(7), 2149–2157. https://doi.org/10.1182/blood.V93.7.2149

169. McNeil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N., and Krilis, S. A. (1990). Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(11), 4120–4124. https://doi.org/10.1073/pnas.87.11.4120

170. Oosting, J. D., Derksen, R. H., Bobbink, I. W., Hackeng, T. M., Bouma, B. N., and de Groot, P. G. (1993). Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? Blood, **81**(10), 2618–2625. https://doi.org/10.1182/blood.V81.10.2618

171. McNeil, H. P., Simpson, R. J., Chesterman, C. N., and Krilis, S. A. (1990). Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(11), 4120–4124. https://doi.org/10.1073/pnas.87.11.4120

172. Tsutsumi, A., Hayashi, T., Chino, Y., Mamura, M., Goto, D., Matsumoto, I., Ito, S., and Sumida, T. (2006). Significance of antiprothrombin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: clinical evaluation of the antiprothrombin assay and the antiphosphatidylserine/prothrombin assay, and comparison with other antiphospholipid antibody assays. Modern Rheumatology, 16(3), 158–164. https://doi.org/10.1007/s10165-006-0481-7

173. Galli, M., and Barbui, T. (1999). Antiprothrombin antibodies: detection and clinical significance in the antiphospholipid syndrome. Blood, 93(7), 2149–2157. https://doi.org/10.1182/blood.V93.7.2149

174. Dofferhoff, A. S. M., Piscaer, I., Schurgers, L. J., Visser, M. P. J., van den Ouweland, J. M. W., de Jong, P. A., Gosens, R., Hackeng, T. M., van Daal, H., Lux, P., Maassen, C., Karssemeijer, E. G. A., Vermeer, C., Wouters, E. F. M., Kistemaker,

L. E. M., Walk, J., and Janssen, R. (2021). Reduced vitamin K status as a potentially modifiable risk factor of severe coronavirus disease 2019. Clinical Infectious Diseases, 73(11), e4039–e4046. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1258

175. Janssen, R., Visser, M. P. J., Dofferhoff, A. S. M., Vermeer, C., Janssens, W., and Walk, J. (2020). Vitamin K metabolism as the potential missing link between lung damage and thromboembolism in Coronavirus disease 2019. British Journal of Nutrition, 124(12), 1–8. https://doi.org/10.1017/S0007114520003979

176. Weisel, J.W., Francis, C.W., Nagaswami, C. and Marder, V.J. (1993). Determination of the topology of factor XIIIa-induced fibrin γ-chain cross-links by electron microscopy of ligated fragments. Journal of Biological Chemistry, 268(35), pp.26618–26624.

177. Folkman, R., Kamal, H., Ahl, M., Szum, A., Magnusson, M.K., Aleman, S. and et al. (2022). Postacute elevation of D-dimer levels in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-positive nonhospitalized patients with mild symptoms. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 33(5), pp.285–287. https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001111

178. 130 Meisinger, C., Kirchberger, I., Warm, T.D., Hyhlik-Dürr, A., Goßlau, Y. and Linseisen, J. (2022). Elevated Plasma D-Dimer Concentrations in Adults after an Outpatient-Treated COVID-19 Infection. Viruses, 14(11), p.2441. https://doi.org/10.3390/v14112441

179. Liu, Y., Gu, X., Li, H., Zhang, H. and Xu, J. (2023). Mechanisms of long COVID: An updated review. Chin Med J Pulm Crit Care Med, 1(4), pp.231–240. https://doi.org/10.1016/j.pccm.2023.10.003

180. Low, R.N., Low, R.J. and Akrami, A. (2023). A review of cytokine-based pathophysiology of Long COVID symptoms. Frontiers in Medicine, 10, Article 1011936. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1011936

181. Lai, Y.-J., Liu, S.-H., Manachevakul, S., Lee, T.-A., Kuo, C.-T. and Bello, D. (2023). Biomarkers in long COVID-19: A systematic review. Frontiers in Medicine (Lausanne), 10, Article 1085988. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1085988

182. Cruz, T., Albacar, N., Ruiz, E., Lledo, G.M., Perea, L., Puebla, A., Torvisco, A., Mendoza, N., Marrades, P., Sellares, J., Agustí, A., Viñas, O., Sibila, O. and Faner, R. (2025). Persistence of dysfunctional immune response 12 months after SARS-CoV-2 infection and their relationship with pulmonary sequelae and long COVID. Respiratory Research, 26, Article 152. https://doi.org/10.1186/s12931-025-02758-x

183. Okazaki, E., Barion, B.G. and da Rocha, T.R.F. (2024). Persistent hypofibrinolysis in severe COVID-19 associated with elevated fibrinolysis inhibitors activity. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 57(4), pp.1–9. https://doi.org/10.1007/s11239-024-02961-8

184. Ranucci, M., Ballotta, A., Di Dedda, U., Baryshnikova, E., Dei Poli, M., Resta, M., Falco, M., Albano, G. and Menicanti, L. (2020). The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. Journal of thrombosis and haemostasis, 18(7), pp. 1747-1751. https://doi.org/10.1111/jth.14854

185. Talasaz, A. H., Sadeghipour, P., Kakavand, H., Aghakouchakzadeh, M., Kordzadeh-Kermani, E., Van Tassell, B. W., Gheymati, A., Ariannejad, H., Hosseini, S. H., Jamalkhani, S., Sholzberg, M., Monreal, M., Jimenez, D., Piazza, G., Parikh, S. A., Kirtane, A. J., Eikelboom, J. W., Connors, J. M., Hunt, B. J. and Konstantinides, S. V. (2021). Recent Randomized Trials of Antithrombotic Therapy for Patients With COVID-19: JACC State-of-the-Art Review. Journal of the American College of Cardiology, 77(15), pp. 1903-1921. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2021.02.035

186. Gazzaruso, C., Paolozzi, E., Valenti, C., Brocchetta, M., Naldani, D., Grignani, C., Salvucci, F., Marino, F., Coppola, A. and Gallotti, P. (2020). Association between antithrombin and mortality in patients with COVID-19. A possible link with obesity. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases. NMCD, 30(11), pp. 1914-1919. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.07.040

187. Joshi, D., Manohar, S., Goel, G., Saigal, S., Pakhare, A. P. and Goyal, A. (2021). Adequate Antithrombin III Level Predicts Survival in Severe COVID-19 Pneumonia. Cureus, 13(10), pp. 18-38. https://doi.org/10.7759/cureus.18538

188. Gazzaruso, C., Paolozzi, E., Valenti, C., Broccolo, F., Gallotti, P., De Amici, M., Fratino, P., Coppola, A., Di Sabatino, A., Maffioli, P., and Gallieni, M. (2020). Association between antithrombin and mortality in patients with COVID-19: a possible link with obesity. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 30(11), 1914–1919. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.07.034

189. Shi, Y., Wang, M., Wu, L., Li, X. and Liao, Z. (2023). COVID-19 associated liver injury: An updated review on the mechanisms and management of risk groups. Liver Research, 7(3), pp.207–215. https://doi.org/10.1016/j.livres.2023.05.001

190. Lebbe, A., Aboulwafa, A., Bayraktar, N., Mushannen, B., Ayoub, S., Sarker, S., Abdalla, M.N., Mohammed, I., Mushannen, M., Yagan, L. and Zakaria, D. (2024). New onset of acute and chronic hepatic diseases post-COVID-19 infection: A systematic review. Biomedicines, 12(9), p.2065. https://doi.org/10.3390/biomedicines12092065

191. Dos Santos Silva, B.R., Sidarta-Oliveira, D., Morari, J., Bombassaro, B., Poblete Jara, C., Simeoni, C.L., Parise, P.L., Proenca-Modena, J.L., Velloso, L.A., Velander, W.H. and Araújo, E.P. (2024). Protein C pretreatment protects endothelial cells from SARS-CoV-2-induced activation. Viruses, 16(7), Article 1049. https://doi.org/10.3390/v16071049

192. Riewald, M. and Schuepbach, R.A. (2008). Protective signaling pathways of activated protein C in endothelial cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 28(1), pp.1–3. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.157321

193. De Cristofaro, R. and Landolfi, R. (2000). Oxidation of human alpha-thrombin by the myeloperoxidase-H_2O_2-chloride system: structural and functional effects. Thrombosis and Haemostasis, 83(2), pp.253–261.

194. Patchett, S., Lv, Z., Rut, W., Békés, M., Drag, M. and Huang, T.T. (2021). A molecular sensor determines the ubiquitin substrate specificity of SARS-CoV-2 papain-like protease. Cell Reports, 37(1), p.109754. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109754

195. Satała, J., Wozniak, A., Fabiś, M., Gorzelak-Pabiś, P., Pawlos, A., Fabis, J., Broncel, M. and Woźniak, E. (2023). Severe COVID-19 classified by simple

COVID risk Індекс is associated with higher levels of advanced oxidation protein products and 8-hydroxy 2-deoxyguanosine. Epidemiology and Infection, 151. https://doi.org/10.1017/S0950268823001280

196. Suzuki, K. (2025). Thrombomodulin: A key regulator of intravascular blood coagulation, fibrinolysis, and inflammation, and a treatment for disseminated intravascular coagulation. Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences, 101(2), pp.75–97. https://doi.org/10.2183/pjab.101.006

197. Koskinen, M., Englund, E., Korkut, G.G., Schwarz, A. and Jeansson, M. (2024). COVID-19-associated acute renal failure in critically ill patients correlates with microthrombosis and renal loss of thrombomodulin. bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2024.03.18.24304157

198. Yamazaki, A., Nukui, Y., Kameda, T., Saito, R., Koda, Y., Ichimura, N., Tohda, S. and Ohkawa, R. (2023). Variation in presepsin and thrombomodulin levels for predicting COVID-19 mortality. Dental Science Reports, 13. https://doi.org/10.1038/s41598-023-48633-0

199. Giri, H. and Biswas, I. (2024). Thrombomodulin: A multifunctional receptor modulating the endothelial quiescence. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 22(4). https://doi.org/10.1016/j.jtha.2024.01.006

200. Nemec, H. M., Ferenczy, A., Christie, B. D., Ashley, D. W., and Montgomery, A. (2022). Correlation of D-dimer and outcomes in COVID-19 patients. The American Surgeon, 88(9), 2115–2118. https://doi.org/10.1177/00031348221091940

201. Baltan, E., Serin, E., Avci, B. Y., Akilli, I. K., and Çinar, A. S. (2022). The relationship between plasminogen activator inhibitor-1 levels and the course of disease in COVID-19 patients. Turkish Journal of Biochemistry, 47(5), 672–679. https://doi.org/10.1515/tjb-2022-0044

202. Fu, Y., Xue, H., Wang, T., Ding, Y., Cui, Y., and Nie, H. (2023). Fibrinolytic system and COVID-19: From an innovative view of epithelial ion transport. Biomedicine & Pharmacotherapy, 163, 114863. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114863

203. Kell, D. B., Laubscher, G. J., and Pretorius, E. (2022). A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC: origins and therapeutic implications. Biochemical Journal, 479(4), 537–559. https://doi.org/10.1042/BCJ20220016

204. Kruger, A., Vlok, M., Turner, S., Venter, C., Laubscher, G. J., Kell, D. B., and Pretorius, E. (2022). Proteomics of fibrin amyloid microclots in long COVID/post-acute sequelae of COVID-19 (PASC) shows many entrapped pro-inflammatory molecules that may also contribute to a failed fibrinolytic system. Cardiovascular Diabetology, 21, Article 190. https://doi.org/10.1186/s12933-022-01647-5

205. Du, S., Jin, J., Tang, C., Su, Z., Wang, L., Chen, X., et al. (2025). Airway Basal Stem Cells Inflammatory Alterations in COVID-19 and Mitigation by Mesenchymal Stem Cells. Cell Proliferation, 58(6), e13812. https://doi.org/10.1111/cpr.13812

206. Hardy, M., Michaux, I., Dive, A., Lecompte, T. and Mullier, F. (2021). Could Daily Monitoring of Fibrin Related Markers Help Suspect a Thrombotic Event in COVID-19 Patients? A Prospective Pilot Study. TH Open, 5(2), pp. 152-154.

207. Vedula, P., Tang, H. Y., Speicher, D. W., Kashina, A., and The UPenn COVID Processing Unit. (2022). Protein posttranslational signatures identified in COVID-19 patient plasma. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10, Article 807149. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.807149

208. Bu, C., Zhang, C., Li, Z., Gao, L., Xie, Z., and Cai, G. (2007). Autoantibodies to plasminogen and tissue plasminogen activator in women with recurrent pregnancy loss. Clinical and Experimental Immunology, 149(1), 31–39. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03382.x

209. Яценко, Т. А. Молекулярні механізми регуляції фібринолізу за участі фрагментів фібриногену/фібрину: автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.04 / Т. А. Яценко; НАН України, Ін-т біохімії ім. О. В. Палладіна. - К., 2018. - 22 с. - Бібліогр.: с. 19–22.

210. Rijken, D. C., and Lijnen, H. R. (2009). New insights into the role of fibrin fragment E in plasminogen activation. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 7(10), 1600–1602. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03526.x

211. Pretorius, E., Kell, D. B., Laubscher, G. J., Mbotwe, S., Bester, J., and Robinson, C., et al. (2022). A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC. Biochemical Journal, 479(4), 537–554. https://doi.org/10.1042/BCJ20220003

212. Kell, D. B., and Pretorius, E. (2018). To what extent are the terminal stages of sepsis, septic shock, SIRS, and multiple organ dysfunction syndrome actually driven by a toxic prion/amyloid form of fibrin? Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 44(3), 224–238. https://doi.org/10.1055/s-0037-1607473

213. Калашнікова, М., Савчук, О., та Карбовський, В. (2023). Оптимізація методу ензим-електрофорезу з використанням колагену як субстрат. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(94), 41–45. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.41-45

214. Zuo, Y., Warnock, M., Harbaugh, A., Yalavarthi, S., Gockman, K., Zuo, M., et al. (2021). Plasma tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in hospitalized COVID 19 patients. Blood Advances, 5(3), 761–770. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003471

215. Волков, Г. Л., Платонова, Т. М., Савчук, А. М., Горницька, О. В., Чернишенко, Т. М., Краснобріжа, Є. М. Сучасні уявлення про систему гемостазу / Г. Л. Волков та ін. - Київ: Наукова думка, 2005. - 295 с.

216. Baltan, E., Serin, E., Avci, B., Akilli, I., and Çinar, A. (2022). The relationship between plasminogen activator inhibitor 1 levels and the course of disease in COVID 19 patients. Turkish Journal of Biochemistry, 47(5), 672–679. https://doi.org/10.1515/tjb-2022-0044

217. Heissig, B., Hattori, K., Yatsenko, T., Fujii, S., Nishida, M., andTakahashi, S. (2024). Study highlights the role of genetic factors in COVID 19 thrombosis and inflammation. Frontiers in Immunology. https://www.news-medical.net/news/20241003/Study-highlights-the-role-of-genetic-factors-in-COVID-19-thrombosis-and-inflammation.aspx

218. Gupta, K. K., Xu, Z., Castellino, F. J., and Ploplis, V. A. (2016). Plasminogen activator inhibitor-1 stimulates macrophage activation through Toll-like

receptor 4. Biochemical and Biophysical Research Communications, 477(3), 503–508. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.065

219. Matsuyama, T., Kubli, S. P., Yoshinaga, S. K., Pfeffer, K., and Mak, T. W. (2020). An aberrant STAT pathway is central to COVID-19. Cell Death & Differentiation, 27(12), 3209–3225. https://doi.org/10.1038/s41418-020-00633-7

220. Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. Biochemical Journal, 265(3), 621–636. https://doi.org/10.1042/bj2650621

221. Okazaki, E., Barion, B. G., da Rocha, T. R. F., Di Giacomo, G., Ho, Y. L., Rothschild, C., et al. (2024). Persistent hypofibrinolysis in severe COVID-19 associated with elevated fibrinolysis inhibitors activity. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 57(4), 721–729. https://doi.org/10.1007/s11239-024-02961-8

222. Bigalke, A., Neu, C., Treml, R. E., Coldewey, S. M., and Kiehntopf, M. (2022). Fragments of alpha-1 antitrypsin in patients with severe COVID-19 and bacterial pulmonary sepsis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 60(8), e187–e189. https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0361

223. Rehman, A. A., Ahsan, H., and Khan, F. H. (2013). α2-Macroglobulin: a physiological guardian. Journal of Cellular Physiology, 228(8), 1665–1675. https://doi.org/10.1002/jcp.24266

224. Tomihari, A., Matsuura, A., and Itakura, E. (2023). Alpha-2-macroglobulin acts as a clearance factor in the lysosomal degradation of extracellular misfolded proteins. Scientific Reports, 13(1), Article 4452. https://doi.org/10.1038/s41598-023-31104-x

225. Malemud, C. J. (2006). Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. Frontiers in Bioscience, 11, 1696–1701. https://doi.org/10.2741/1915

226. Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Coban, M., Mahajan, S., Hockla, A., Sankaran, B., Downey, G. P., Radisky, D. C., and Radisky, E. S. (2022). Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 for fine discrimination between

closely related stromelysins MMP-3 and MMP-10. Journal of Biological Chemistry, 298(3), 101654. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101654

227. Ding, L., Guo, H., Zhang, C., Jin, H., Guo, X., and Li, T. (2023). Elevated matrix metalloproteinase-9 expression is associated with COVID-19 severity: a meta-analysis. Experimental and Therapeutic Medicine, 26(6), 545. https://doi.org/10.3892/etm.2023.12244

228. Cavalcante, G. L., Bonifacio, L. P., Sanches Lopes, J. M., Guioti Puga, F., Santos de Carvalho, F., and Bellissimo Rodrigues, F. (2024). Matrix metalloproteinases are associated with severity of disease among COVID-19 patients: a possible pharmacological target. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 134(5), 727–736. https://doi.org/10.1111/bcpt.13954

229. da Silva-Neto, P. V., do Valle, V. B., Fuzo, C. A., Fernandes, T. M., Toro, D. M., Fraga-Silva, T. F. C., Basile, P. A., de Carvalho, J. C. S., Pimentel, V. E., Pérez, M. M., Oliveira, C. N. S., Rodrigues, L. C., Bastos, V. A. F., Tella, S. O. C., Martins, R. B., Degiovani, A. M., et al. (2022). Matrix metalloproteinases on severe COVID-19 lung disease pathogenesis: cooperative actions of the MMP-8/MMP-2 axis on immune response through HLA-G shedding and oxidative stress. Biomolecules, 12(5), 604. https://doi.org/10.3390/biom12050604

230. Cavalcante, G. L., Bonifacio, L. P., Sanches-Lopes, J. M., Puga, F. G., Santos de Carvalho, F., Bellissimo-Rodrigues, F., and Tanus-Santos, J. E. (2024). Matrix metalloproteinases are associated with severity of disease among COVID-19 patients: a possible pharmacological target. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 134(5), 727–736. https://doi.org/10.1111/bcpt.14001

231. Cabral Pacheco, G. A., Garza Veloz, I., Castruita De la Rosa, C., Ramirez Acuña, J. M., Perez Romero, B. A., Guerrero Rodriguez, J. F., Martínez Avila, N., Martínez Flores, M., and Ortiz Lopez, R. (2020). The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. International Journal of Molecular Sciences, 21(24), 9739. https://doi.org/10.3390/ijms21249739

232. Cui, N., Hu, M., and Khalil, R. A. (2017). Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 147, 1–73. https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005

233. Klein, T., and Bischoff, R. (2010). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. Amino Acids, 41(2), 271–290. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0689-x

234. Shimokawa, K., Katayama, M., Matsuda, Y., Takahashi, H., Hara, I., and Sato, H. (2002). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. Molecular Human Reproduction, 8(1), 32–36. https://doi.org/10.1093/molehr/8.1.32

235. Dufour, A., Zucker, S., Sampson, N. S., Kuscu, C., and Cao, J. (2010). Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration: design of inhibitory peptides. Journal of Biological Chemistry, 285(46), 35944–35956. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091769

236. Inanc, S., Keles, D. and Oktay, G. (2017). An improved collagen zymography approach for evaluating the collagenases MMP-1, MMP-8, and MMP-13. BioTechniques, 63, pp.174–180. https://doi.org/10.2144/000114600

237. Ghezzi, P. (2006). Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. Biochemical Society Transactions, 33(Pt 6), 1378–1381. https://doi.org/10.1042/BST20051378

238. Jacob, C., Battaglia, E., Burkholz, T., Peng, D., Bagrel, D., and Montenarh, M. (2012). Control of oxidative posttranslational cysteine modifications: from intricate chemistry to widespread biological and medical applications. Chemical Research in Toxicology, 25(3), 588–604. https://doi.org/10.1021/tx200342b

239. Hotary, K. B., Yana, I., Sabeh, F., Li, X.-Y., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Allen, E. D., Hiraoka, N., and Weiss, S. J. (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP–dependent and –independent processes. Journal of Experimental Medicine, 195(3), 295–308. https://doi.org/10.1084/jem.20010815

240. Belaaouaj, A., Li, A., Wun, T.-C., Welgus, H. G., and Shapiro, S. D. (2000). Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor: effects on coagulation. Journal of Biological Chemistry, 275(35), 27123–27128. https://doi.org/10.1074/jbc.M004800200

241. Belaaouaj, A., Li, A., Wun, T.-C., Welgus, H.G. and Shapiro, S.D. (2000). Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor: effects on coagulation. Journal of Biological Chemistry, 275(35), pp.27123–27128. https://doi.org/10.1074/jbc.M004800200

242. Kaneider, N.C., Mosheimer, B.A., Günther, A., Feistritzer, C. and Wiedermann, C.J. (2010). Enhancement of fibrinogen-triggered pro-coagulant activation of monocytes in vitro by matrix metalloproteinase-9. Thrombosis Journal, 8(1), p.2. https://doi.org/10.1186/1477-9560-8-2

243. Austin, K.M., Covic, L. and Kuliopulos, A. (2013). Matrix metalloproteases and PAR1 activation. Blood, 121(3), pp.431–439. https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-09-355958

244. Trivedi, V., Boire, A., Tchernychev, B., Kaneider, N.C., Leger, A.J., O'Callaghan, K., Covic, L. and Kuliopulos, A. (2009). Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. Cell, 137(2), pp.332–343. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.018

245. Bini, A., Itoh, Y., Kudryk, B. J., and Nagase, H. (1996). Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1): hydrolysis of the γ Gly 404–Ala 405 peptide bond. Biochemistry, 35(40), 13056–13063. https://doi.org/10.1021/bi960730c

246. Bini, A., Itoh, Y., Kudryk, B.J. and Nagase, H. (1996). Degradation of cross-linked fibrin by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1): hydrolysis of the gamma Gly404–Ala405 peptide bond. Biochemistry, 35(40), pp.13056–13063. https://doi.org/10.1021/bi960730c

247. Lijnen, H.R. (2000). Molecular interactions between the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems. Fibrinolysis and Proteolysis, 14(2–3), pp.175–181. https://doi.org/10.1054/fibr.2000.0098

248. Kumar, L., Planas-Iglesias, J., Harms, C., Kamboj, S., Klein-Seetharaman, J. and Sarkar, S.K. (2020). Fibrinolytic activity of matrix metalloprotease-1. Scientific Reports, 10, Article number: 20331. https://doi.org/10.1038/s41598-020-77699-3

249. Hotary, K.B., Yana, I., Sabeh, F., Li, X.-Y., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Allen, E.D., Hiraoka, N. and Weiss, S.J. (2002). Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes. Journal of Experimental Medicine, 195(3), pp.295–308. https://doi.org/10.1084/jem.20010815

250. Hardy, E., and Fernandez-Patron, C. (2021). Targeting MMP regulation of inflammation to increase metabolic tolerance to COVID-19 pathologies: a hypothesis. Biomolecules, 11(3), 390. https://doi.org/10.3390/biom11030390

251. Singh, B., Singh, S., Bhatia, J. K., Kapoor, R., and Bhatia, K. (2022). Role of matrix degradation, oxidative stress, inflammation and trace elements in COVID-19 patients: a multivariate study from India. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 38(2), 193–203. https://doi.org/10.1007/s12291-022-01059-3

252. Charabati, M., Wheeler, M. A., Weiner, H. L., and Quintana, F. J. (2023). Multiple sclerosis: neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting. Cell, 186(7), 1309–1327. https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.008

253. Gerwien, H., Hermann, S., Zhang, X., Korpos, E., Song, J., Kopka, K., Faust, A., Wenning, C., Gross, C. C., Honold, L., Melzer, N., Opdenakker, G., Wiendl, H., Schäfers, M., and Sorokin, L. (2016). Imaging matrix metalloproteinase activity in multiple sclerosis as a specific marker of leukocyte penetration of the blood–brain barrier. Science Translational Medicine, 8(364), 364ra152. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8020

254. Avolio, C., Ruggieri, M., Giuliani, F., Liuzzi, G. M., Leante, R., Riccio, P., Livrea, P., and Trojano, M. (2003). Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. Journal of Neuroimmunology, **136**(1-2), 46–53. https://doi.org/10.1016/s0165-5728(03)00006-7

255. Amini, R., Karampoor, S., Zahednasab, H., Keyvani, H., Gheiasian, M., and Azizi Jalilian, F. (2020). Serum levels of matrix metalloproteinase-2, -9, and

vitamin D in patients with multiple sclerosis with or without herpesvirus-6 seropositivity. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 24(2), 144–149. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.02.001

256. Safont, B., Tarraso, J., Rodriguez Borja, E., Fernández Fabrellas, E., Sancho Chust, J. N., Molina, V., et al. (2022). Lung function, radiological findings and biomarkers of fibrogenesis in a cohort of COVID 19 patients six months after hospital discharge. Archivos de Bronconeumología, 58(2), 142–149. https://doi.org/10.1016/j.arbres.2021.08.014

257. Remsik, J., Wilcox, J. A., Babady, N. E., McMillen, T. A., Vachha, B. A., Halpern, N. A., et al. (2020). Inflammatory leptomeningeal cytokines mediate delayed COVID 19 encephalopathy [Preprint]. medRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.09.15.20195511

258. Frankowski, H., Gu, Y. H., Heo, J. H., Milner, R., and del Zoppo, G. J. (2012). Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. Methods in Molecular Biology, 814, 221–233.

259. Галенова, Т., Калашнікова, М., Карбовський, В., Шоломон, С., і Мельник, В. (2023). Біохімічні показники крові у хворих на розсіяний склероз, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(95), 13–19.

260. Van Lint, P., and Libert, C. (2007). Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. Journal of Leukocyte Biology, 82(6), 1375–1381. https://doi.org/10.1189/jlb.0607338

261. Tetlow, L. C., Adlam, D. J., and Woolley, D. E. (2001). Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. Arthritis & Rheumatism, 44(3), 585–594. https://doi.org/10.1002/1529-0131(200103)44:3

262. Hiller, O., Lichte, A., Oberpichler, A., Kocourek, A. and Tschesche, H. (2000). Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of

fibrinogen and factor XII. Journal of Biological Chemistry, 275(42), pp.33008–33013. https://doi.org/10.1074/jbc.M001836200

263. 31 Leavell, K.J., Peterson, M.W. and Gross, T.J. (1996). The role of fibrin degradation products in neutrophil recruitment to the lung. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 14(1), pp.53–60. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.14.1.8534486

264. Креницька, Д., Рачковська, А., Павлівський, Ю., Чижик, Ю., та Карбовський, В. (2022). Біохімічні параметри печінки за наявності у кровотоці анти-SARS-CoV-2 IgG. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 1(88), 33–41.

265. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., та Карбовський, В. (2022). Характеристика залізозалежних параметрів донорів за наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(91), 10–15.

266. Aziz, M., Fatima, R., Lee-Smith, W., and Assaly, R. (2020). The association of low serum albumin level with severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis [Research Letter]. Critical Care, 24(1), Article 255. https://doi.org/10.1186/s13054-020-02995-3

267. Lai, Z. W., Petrera, A., and Schilling, O. (2015). The emerging role of the peptidome in biomarker discovery and degradome profiling. Biological Chemistry, 396(3), 185–192. https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0207

268. Kragh-Hansen, U. (2018). Possible mechanisms by which enzymatic degradation of human serum albumin can lead to bioactive peptides and biomarkers. Frontiers in Molecular Biosciences, 5, Article 63. https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00063

269. Bowe, B., Xie, Y., Xu, E. and Al-Aly, Z. (2021). Kidney outcomes in long COVID. Journal of the American Society of Nephrology (JASN), 32(11), pp.2851–2862. https://doi.org/10.1681/ASN.2021060734

270. 26 Bowe, B., Cai, M., Xie, Y., Gibson, A.K., Maddukuri, G. and Al-Aly, Z. (2021). Acute kidney injury in a national cohort of hospitalized US veterans with

COVID-19. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 16, pp.14–25. https://doi.org/10.2215/CJN.09610620

271. 27 Lu, J.Y., Lu, J.Y., Wang, S., Duong, K.S., Henry, S., Fisher, M.C. and Duong, T.Q. (2025). Long term outcomes of patients with chronic kidney disease after COVID-19 in an urban population in the Bronx. Scientific Reports, 15, Article number: 6119. https://doi.org/10.1038/s41598-025-13120-9

272. Rojas, M., Rodríguez, Y., Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Ramírez-Santana, C., Yuascarán, Y., et al. (2022). Autoimmunity is a hallmark of post-COVID syndrome. Journal of Translational Medicine, 20, 129. https://doi.org/10.1186/s12967-022-03318-6

273. Piccin, A., Mullin, B., Brown, A., and Benson, G. (2023). The lack of anti-PF4 antibodies in convalescent plasma from COVID-19 infected blood donors. Transfusion Medicine, 33(4), 272–273. https://doi.org/10.1111/tme.12947

274. Tomimura, S., Ogawa, F., Iwata, Y., Komura, K., Muroi, E., Takenaka, M., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Sato, S., and Takehara, K. (2008). Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with localized scleroderma. Journal of Dermatological Science, 52, 47–54. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.05.005

275. Zhou, J. H., Zhang, B., Kernstine, K. H., and Zhong, L. (2011). Autoantibodies against MMP-7 as a novel diagnostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. World Journal of Gastroenterology, 17, 1373–1378. https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i10.1373

276. Nishijima, C., Hayakawa, I., Matsushita, T., Goto, D., Horita, T., Kuwana, M., Tsuboi, H., Sugiyama, T., and Sumida, T. (2004). Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. Clinical and Experimental Immunology, 138, 357–363. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02623.x

277. Iwaki-Egawa, S., Matsuno, H., Ogawa, Y., and Watanabe, Y. (2005). Production of anti-CCP antibodies and matrix metalloproteinase-3 by human rheumatoid arthritis synovial tissues using SCID mice. Annals of the Rheumatic Diseases, 64, 1094–1095. https://doi.org/10.1136/ard.2004.028175

278. Hanson, A. L., Mulè, M. P., Ruffieux, H., Mescia, F., Bergamaschi, L., Pelly, V. S., Turner, L., Kotagiri, P., CITIID–NIHR COVID BioResource Collaboration, Göttgens, B., Hess, C., Gleadall, N., Bradley, J. R., Nathan, J. A., Lyons, P. A., Drakesmith, H., and Smith, K. G. C. (2024). Iron dysregulation and inflammatory stress erythropoiesis associates with long-term outcome of COVID-19. Nature Immunology, 25, 471–482. https://doi.org/10.1038/s41590-024-01770-2

279. Peter, R.S., Nieters, A., Goepel, S., Merle, U., Steinacker, J.M., Deibert, P., Friedmann-Bette, B., Nieß, A.M., Müller, B., Schilling, et al. (2025). Persistent symptoms and clinical findings in adults with post-acute sequelae of COVID-19/post-COVID-19 syndrome in the second year after acute infection: A population-based, nested case-control study. PLOS Medicine, 22(1), pp.e1004511–e1004511. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1004511

280. 5 Almeida, G.G., Alkan, S., Hoepner, R., Euler, A., Diem, L. and Wagner, F. (2025). Chronic fatigue and headache in post-COVID-19 syndrome: a radiological and clinical evaluation. Frontiers in Neurology, 15, Article 1526130. https://doi.org/10.3389/fneur.2024.1526130

281. Tang, X.-L., Jiang, Z.-Y., Dong, J., Liu, X.-C., Cai, S.-Y., Xiao, R. and Lu, Y.-R. (2006). Expression of tissue factor induced by IL-6 in HUVEC. Journal of Sichuan University. Medical Science Edition, March 2006.

282. Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., David, M., Fabra, R., Trullenque, R. and Heinrich, P.C. (1990). Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. Hepatology, 12(5), pp.1179–1186. https://doi.org/10.1002/hep.1840120517

283. 7 Tanaka, K., Harada, H., Kamuro, H., Sakai, H., Yamamoto, A., Tomimatsu, M., Ikeda, A., Chosokabe, R., Tanaka, S., Okada, Y., Fujio, Y. and Obana, M. (2023). Arid5a/IL-6/PAI-1 signaling is involved in the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced kidney injury. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 46(12), pp.1753–1760. https://doi.org/10.1248/bpb.b23-00482

284. Shinozawa, Y., Xie, X.Q., Endo, T., Takuma, K. and Koike, K. (2004). Correlation between intravascular coagulation/fibrinolysis system and cytokines. Nihon Rinsho (Japanese Journal of Clinical Medicine), 62(12), p.2.

285. 10 Mitola, S., Strasly, M., Prato, M., Ghia, P. and Bussolino, F. (2003). IL-12 regulates an endothelial cell-lymphocyte network: effect on metalloproteinase-9 production. Journal of Immunology, 171(7), pp.3725–3733. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3725

286. Halenova, T. I., Raksha, N. H., Vovk, T. B., Karbovskyy, V. L., Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., & Savchuk, O. M. (2024). Cytokine profile in multiple sclerosis patients with and without COVID 19. Wiadomości Lekarskie (Medical Advances), 77(4), 640–645. https://doi.org/10.36740/WLek202404104

287. Kooshkaki, O., Chamani, S. and Naghizadeh, A. (2023). The role of inflammatory cytokines (interleukin-1 and interleukin-6) as a potential biomarker in the different stages of COVID-19 (mild, severe, and critical). Journal of Interferon and Cytokine Research, 43(4), pp.147–163. https://doi.org/10.1089/jir.2022.0185

288. Fay, W. P. (2010). Linking inflammation and thrombosis: Role of C-reactive protein. World Journal of Cardiology, 2(11), 365–369. https://doi.org/10.4330/wjc.v2.i11.365

289. Kreutz, R. P., Owens, J., Breall, J. A., Lu, D., von der Lohe, E., Bolad, I. A., Sinha, A., and Flockhart, D. A. (2013). C-reactive protein and fibrin clot strength measured by thrombelastography after coronary stenting. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 24(3), 278–283. https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32835cc193

290. Ridker, P. M. (2003). High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention. American Journal of Cardiology, 92, 17K–22K. https://doi.org/10.1016/S0002-9149(03)00749-7

291. Ridker, P. M. (2004). High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. American Heart Journal, 148, S19–S26. https://doi.org/10.1016/j.ahj.2004.04.028

292. Peng, D., Gao, Y., Zhang, L., Liu, Z., Wang, H., & Liu, Y.-X. (2022). The relationship between hepcidin-mediated iron dysmetabolism and COVID-19 severity:

A meta-analysis. Frontiers in Public Health, 10, 881412. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.881412

293. 29 Gaiatto, A. C. M., Bibo, T. A., Moreira, N. G., Raimundo, J. R. S., Alves, B. C. A., Gascón, T. M., Carvalho, S. E. S., Pereira, E. C., Fonseca, F. L. A., & da Veiga, G. L. (2022). COVID-19 compromises iron homeostasis: Transferrin as a target of investigation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 76, 127109. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127109

294. Zhang, H., Wu, D., Wang, Y., Shi, Y., Shao, Y., Zeng, F., Spencer, C. B., Ortoga, L., Wu, D., & Miao, C. (2024). Ferritin-mediated neutrophil extracellular traps formation and cytokine storm via macrophage scavenger receptor in sepsis-associated lung injury. Cell Communication and Signaling, 22, 19. https://doi.org/10.1186/s12964-023-01440-6

295. Mahroum, N. (2022). Ferritin – from iron, through inflammation and autoimmunity, to COVID-19. Journal of Autoimmunity, 126, 102778. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102778

296. Rosario, C., and Shoenfeld, Y. (2014). The hyperferritinemic syndrome. Israel Medical Association Journal, 16(10), 664–665.

297. Carmi, O., Berla, M., Shoenfeld, Y., and Levy, Y. (2017). Diagnosis and management of catastrophic antiphospholipid syndrome. Expert Review of Hematology, 10(5), 457–464. https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1300522

298. Chakurkar, V., Rajapurkar, M., Lele, S. S., Mukhopadhyay, B., Lobo, V., Injarapu, R., Sheikh, M., Dholu, B., Ghosh, A., and Jha, V. (2021). Increased serum catalytic iron may mediate tissue injury and death in patients with COVID-19. Scientific Reports, 11(1), 19618. https://doi.org/10.1038/s41598-021-99142-x

299. Girelli, D., Marchi, G., Busti, F., and Vianello, A. (2021). Iron metabolism in infections: Focus on COVID-19. Seminars in Hematology, 58(3), 182–187. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2021.07.001

300. Fuehner, T., Renger, I., Welte, T., Freundt, T., and Gottlieb, J. (2022). Silent hypoxia in COVID-19: A case series. Respiration, 101(4), 376–380. https://doi.org/10.1159/000520083

301. Shao, X., Chen, S., Yang, D., Cao, M., Yao, Y., Wu, Z., Li, N., Shen, N., Li, X., Song, X., and Qian, Y. (2017). FGF2 cooperates with IL-17 to promote autoimmune inflammation. Scientific Reports, 7(1), 7024. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07597-8

302. Andrés, G., Leali, D., Mitola, S., Coltrini, D., Camozzi, M., Corsini, M., Belleri, M., Hirsch, E., Schwendener, R. A., Christofori, G., Alcami, A., and Presta, M. (2009). A pro-inflammatory signature mediates FGF2-induced angiogenesis. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 13, 2083–2108. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00415.x

303. Cojocaru, E., Cojocaru, T., Pînzariu, G. M., Vasiliu, I., Armașu, I., and Cojocaru, C. (2023). Perspectives on post-COVID-19 pulmonary fibrosis treatment. Journal of Personalized Medicine, 14(1), 51. https://doi.org/10.3390/jpm14010051

304. Lazăr, M., Săndulescu, M., Barbu, E.-C., Chiţu-Tișu, C.-E., Andreescu, D. I., Anton, A. N., Erculescu, T. M., Petre, A. M., et al. (2024). The role of cytokines and molecular pathways in lung fibrosis following SARS-CoV-2 infection: A physiopathologic (re)view. Biomedicines, 12(3), 639. https://doi.org/10.3390/biomedicines12030639

305. Sheller-Miller, S., Radnaa, E., Yoo, J.-K., Kim, E. S., Choi, K., Kim, Y. E., Kim, Y.-N., Richardson, L., Choi, C., and Menon, R. (2021). Exosomal delivery of NF-κB inhibitor delays LPS-induced preterm birth and modulates fetal immune cell profile in mouse models. Science Advances, 7(4), eabd3865. https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3865

306. Huber, D., Hofmann, L., Lotfi, R., Schuler, P. J., Laban, S., Brunner, C. T., and Theodoraki, M.-N. (2023). Evaluation of exosome-dependent NF-κB activation in head and neck carcinoma. Laryngo-Rhino-Otologie, Advance online publication. https://doi.org/10.1055/s-0043-1767157

307. Zangeneh, Z., and Khamisipour, G. (2023). Elevated HSP70 and HSP90 as predictive markers of immune activation and lung injury in SARS-CoV-2 disease. Iranian Journal of Immunology, 20(3). https://doi.org/10.22034/iji.2023.97202.2488

308. Shao, X., Chen, S., Yang, D., Cao, M., Yao, Y., Wu, Z., Li, N., Shen, N., Li, X., Song, X., and Qian, Y. (2017). FGF2 cooperates with IL-17 to promote autoimmune inflammation. Scientific Reports, 7(1), 7024. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07597-8

309. Gauntt, C.J., Arizpe, H.M., Higdon, A.L., Wood, H.J., Bowers, D.F., Rozek, M.M. and Crawley, R. (1995). Molecular mimicry, anti-coxsackievirus B3 neutralizing monoclonal antibodies, and myocarditis. Journal of Immunology, 154, pp.2983–2995.

310. 17 Zhao, Z.S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P.A. and Cantor, H. (1998). Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. Science, 279, pp.1344–1347.

311. Song, E., Bartley, C.M., Chow, R.D., Ngo, T.T., Jiang, R., Zamecnik, C.R., Dandekar, R., Loudermilk, R.P., Dai, Y., Liu, F. et al. (2021). Divergent and self-reactive immune responses in the CNS of COVID-19 patients with neurological symptoms. Cell Reports Medicine, 2, p.100288. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100288

312. 19 Wang, E.Y., Mao, T., Klein, J., Dai, Y., Huck, J.D., Jaycox, J.R., Liu, F., Zhou, T., Israelow, B., Wong, P. et al. (2021). Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. Nature, 595, pp.283–288. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03631-y

313. Franke, C., Boesl, F., Goereci, Y., Gerhard, A., Schweitzer, F., Schroeder, M., Foverskov-Rasmussen, H., Heine, J., Quitschau, A., Kandil, F.I., Schild, A.-K., Finke, C., Audebert, H.J., Endres, M., Warnke, C. and Prüss, H. (2023). Association of cerebrospinal fluid brain-binding autoantibodies with cognitive impairment in post-COVID-19 syndrome. Brain, Behavior, and Immunity, 109, pp.139–143. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.01.006

314. 21 Ceccarini, M.R., Bonetti, G., Medori, M.C., Dhuli, K., Tezzele, S., Micheletti, C., Maltese, P.E., Cecchin, S., Donato, K., Fioretti, F., Calzoni, A., Praderio, A., De Angelis, M.G., Nodari, S., Arabia, G., Lorusso, L., Beccari, T. and Bertelli, M. (2023). Autoantibodies in patients with post-COVID syndrome: a possible

link with severity? European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 27(6 Suppl), pp.48–56. https://doi.org/10.26355/eurrev_202312_34689

315. 22 Hoheisel, F., Fleischer, K., Rubarth, K., Sepúlveda, N., Bauer, S., Konietschke, F., Kedor, C., Stein, A., Wittke, K., Seifert, M., Bellmann–Strobl, J., Mautner, J., Behrends, U., Scheibenbogen, C. and Sotzny, F. (2024). Autoantibodies to Arginine-rich Sequences Mimicking Epstein-Barr Virus in Post-COVID and Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. medRxiv. https://doi.org/10.1101/2024.12.30.24319800

316. Chang, R., Chen, T.Y.-T., Wang, S.I., Hung, Y.M., Chen, H.Y. and Wei, C.J. (2023). Risk of autoimmune diseases in patients with COVID-19: A retrospective cohort study. EClinicalMedicine, 56, 101783. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101783

317. Syed, U., Subramanian, A., Wraith, D.C., Lord, J.M., McGee, K., Ghokale, K., Nirantharakumar, K. and Haroon, S. (2023). Incidence of immune-mediated inflammatory diseases following COVID-19: a matched cohort study in UK primary care. BMC Medicine, 21, 363. https://doi.org/10.1186/s12916-023-03049-5

318. Baig, A.M., Rosko, S., Jaeger, B.R. and Gerlach, J. (2025). Strategic Inhibition of CHRM Autoantibodies: Molecular Insights and Therapeutic Potentials in Long COVID. Journal of Medicinal Chemistry. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00691

319. Hackel, A., Sotzny, F., Mennenga, E., Heidecke, H., Schulze-Foster, K., Fourlakis, K., Lueders, S., Graßhoff, H., Rubarth, K., Konietschke, F., Lange, T., Scheibenbogen, C., Akbarzadeh, R. and Riemekasten, G. (2025). Autoantibody-Driven Monocyte Dysfunction in Post-COVID Syndrome with Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome. medRxiv. https://doi.org/10.1101/2025.01.09.25320264

320. Mantovani, M., Bellavite, P., Fazio, S., Di Fede, G., Tomasi, M., Belli, D.C. and Zanolin, E. (2024). Autoantibodies Targeting G-Protein-Coupled Receptors and RAS-Related Molecules in Post-Acute COVID Vaccination Syndrome: A

Retrospective Case Series Study. Biomedicines, 12(12), 2852. https://doi.org/10.3390/biomedicines12122852

321. Baig, A.M., Rosko, S., Jaeger, B.R. and Gerlach, J. (2025). Strategic Inhibition of CHRM Autoantibodies: Molecular Insights and Therapeutic Potentials in Long COVID. Journal of Medicinal Chemistry. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c00691

322. Verevka, S.V., Kudinov, S.A. and Grinenko, T.V. (1986). Arginyl-binding sites of human plasminogen. Thrombosis Research, 41(5), pp.689–698. https://doi.org/10.1016/0049-3848(86)90366-x

323. Fuentes-Lemus, E., Hägglund, P., López-Alarcón, C. and Davies, M. (2021). Oxidative crosslinking of peptides and proteins: Mechanisms of formation, detection, characterization and quantification. Molecules, 27(1), pp.15–15. https://doi.org/10.3390/molecules27010015

324. Mamu, G. (2022). Dityrosine cross-links are present in Alzheimer's disease-derived tau oligomers and paired helical filaments (PHF) which promotes the stability of the PHF-core tau (297–391) in vitro. Journal of Molecular Biology, 434(19), 167785–167785. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167785

325. Curry, A.M., Fernández, R.D., Pagani, T.D., Abeyawardhane, D.L., Trahan, M.L. and Lucas, H.R. (2020). Mapping of photochemically-derived dityrosine across Fe-bound N-acetylated α-synuclein. Life, 10(8), pp.124–124. https://doi.org/10.3390/life10080124

326. Liu, X., Chen, R., Li, B., Zhang, J., Liu, P., Li, B., Li, F., Zhang, W., Lyu, X. and Hu, M. (2024). Oxidative stress Індексes as biomarkers of the severity in COVID-19 patients. International Journal of Medical Sciences, 11 Nov 2024. https://doi.org/10.7150/ijms.102879

327. Pawlik, M., Rinneberg, G., Koch, A., Meyringer, H., Loew, T.H. and Kjellberg, A. (2024). Is there a rationale for hyperbaric oxygen therapy in patients with post-COVID syndrome? European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience, published 15 November 2024. https://doi.org/10.1007/s00406-024-01911-y

328. Sanduzzi Zamparelli, S., Sanduzzi, A. and Bocchino, M. (2025). Immune-boosting and antiviral effects of antioxidants in COVID-19 pneumonia: A therapeutic perspective. Life, 15(1), p.113. https://doi.org/10.3390/life15010113

329. Yoo E. M., Wims L. A., Chan L. A. and Morrison S. L. (2003). Human IgG2 can form covalent dimers. Journal of Immunology, 170(6), 3134–3138. DOI: 10.4049/jimmunol.170.6.3134

330. Yang, J., Goetze, A.M. and Flynn, G.C. (2014). Assessment of naturally occurring covalent and total dimer levels in human IgG1 and IgG2. Molecular Immunology, 58(1), pp.108–115. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.010

331. Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. British Journal of Haematology, 129(3), pp.307–321. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x

332. Verevka, S.V. and Miroshnichenko, O.S. (2001). 1-X-3 Motif in inter-protein recognition: structures, widespreading and possible practical application. Journal of Molecular Recognition, 14(5), pp.315–318. https://doi.org/10.1002/jmr.546

333. Краснобрижа, Є. М. Вплив стрептокінази на активаційну ланку системи фібринолізу: автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.04 / Є.М. Краснобрижа ; НАН України. Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна. - К., 2004. - 22 с. - Бібліогр.: с.18-19.

334. Ben, N.A., Wistedt, A., Ringdahl, U. and Sjobring, U. (1994). Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M-like proteins. European Journal of Biochemistry, 222, pp.267–276.

335. Yusova, E.I. (2014). Activation of plasminogen by low-molecular-weight streptokinase and the effect of fibrin. Biotechnologia Acta, 7(3), pp.33–42.

336. Гриненко, Т. В. Регуляція фібринолізу некаталітичними ділянками молекул плазміногену/плазміну: автореф. дис... д-ра біол. наук: 03.00.04 / Т.В. Гриненко ; НАН України. Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна. — К., 2007. — 42 с. — Бібліогр.: с. 38–41.

337. Grinenko, T.V., Makogonenko, E.M., Jusova, O.I. and Sederholm-Viljams, S.A. (2002). Degradation of streptokinase and catalytic properties of plasmin–

streptokinase complex. Ukrainian Biochemical Journal, 74(5), pp. 80–86. https://ubj.biochemistry.org.ua

338. Сломінський, О. Ю. Індукція каталітичної активності плазміногену моноклональним антитілом IV-1C: автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.04 / О.Ю. Сломінський ; НАН України. Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна. - К., 2003. - 22 с. - Бібліогр.: с. 18–20.

339. Song, Y., Myers, R., Mehl, F., Murphy, L., Brooks, B., Wilson, J.M., Kadl, A., Woodfolk, J. and Zeichner, S.L. (2024). ACE-2-like enzymatic activity is associated with immunoglobulin in COVID-19 patients. mBio, 15(4), e00541-24. https://doi.org/10.1128/mbio.00541-24

340. Kanduc D. From anti-SARS-CoV-2 immune responses to COVID-19 via molecular mimicry Antibodies (Basel). (2020) 9. doi: 10.3390/antib9030033

341. Khavinson V, Terekhov A, Kormilets D, Maryanovich A. Homology between SARS CoV-2 and human proteins. Sci Rep. (2021) 11:17199. doi: 10.1038/s41598-021-96233-7

342. Nunez-Castilla J, Stebliankin V, Baral P, Balbin CA, Sobhan M, Cickovski T, et al. Potential autoimmunity resulting from molecular mimicry between SARS-coV-2 spike and human proteins. Viruses. (2022) 14. doi: 10.3390/v14071415

343. Verevka SV. The main parametabolic complex. In: Berhardt LV, editor. Advances in medicine and biology. NY: Nova Science Publishers; 2017. Vol. 126. p. 181-200.

344. Verevka, S.V., Raksha, N.G. and Savchuk, O.M. (2014). Activation action of sorbed plasmin. In vitro modeling. Naukovyi Visnyk Chernivetskogo Universytetu. Biologichni Systemy, 6(1), pp.16–19.

345. George, S. and Brundin, P. (2017). Solving the conundrum of insoluble protein aggregates. The Lancet Neurology, 16(4), pp.258–259. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30045-5

346. Miyazaki, T. and Miyazaki, A. (2017). Defective protein catabolism in atherosclerotic vascular inflammation. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 4, 79. https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00079

347. Oh, J., Vidal-Jordana, A., and Montalban, X. (2018). Multiple sclerosis: clinical aspects. Current Opinion in Neurology, 31(6), 752–759. https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000622

348. Zhornitsky, S., McKay, K. A., Metz, L. M., Teunissen, C. E., and Rangachari, M. (2016). Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes. Multiple Sclerosis and Related Disorders, 5, 53–65. https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.10.005

349. Безсмертний, Ю. О., Безсмертна, Г. В., Гриневич, Ю. Ф., і Веремій, Л.Г. (2017). Медико-соціальна характеристика інвалідності внаслідок розсіяного склерозу в Україні. Буковинський медичний вісник, 21(4 (84)), 178–187. https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXI.4.84.2017.140

350. Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., De Courten, M., Matsoukas, J., and Apostolopoulos, V. (2017). Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update. Brain Sciences, 7(7), 78. https://doi.org/10.3390/brainsci7070078

351. Рачковська, А., Кунцова, М., Креницька, Д., Савчук, О., і Карбовський, В. (2023). Параметри ліпідного профілю у донорів, які перехворіли на COVID-19 та мають різні титри анти-SARS-CoV-2 IgG у плазмі крові. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 1(92), 22–26.

352. Prasad, H., Ghetla, S. R., Butala, U., Kesarkar, A., and Parab, S. (2023). COVID-19 and serum amylase and lipase levels. Indian Journal of Surgery, 85(2), 337–340. https://doi.org/10.1007/s12262-022-03434-z

353. Ziliotto, N., Bernardi, F., Jakimovski, D., and Zivadinov, R. (2019). Coagulation Pathways in Neurological Diseases: Multiple Sclerosis. Front Neurol, 10, 409. doi: 10.3389/fneur.2019.00409.

354. Yates, R.L., Esiri, M.M., Palace, J., Jacobs, B., Perera, R., and DeLuca, G.C. (2017). Fibrin(ogen) and neurodegeneration in the progressive multiple sclerosis cortex. Ann Neurol, 82(2), 259-270. doi: 10.1002/ana.24997.

355. Davalos, D., Mahajan, K.R., and Trapp, B.D. (2019). Brain fibrinogen deposition plays a key role in MS pathophysiology – Yes. Mult Scler, 25(11), 1434-1435. doi: 10.1177/1352458519852723.

356. de Andrade, S.A., de Souza, D.A., Torres, A.L., de Lima, C.F.G., Ebram, M.C., Celano, R.M.G., Schattner, M., and Chudzinski- Tavassi, A.M. (2022). Pathophysiology of COVID-19: Critical Role of Hemostasis. Front Cell Infect Microbiol, 12, 896972. doi: 10.3389/fcimb.2022.896972.

357. Hernández-Parra, H., Reyes-Hernández, O.D., Figueroa-González, G., González-Del Carmen, M., González-Torres, M., Peña-Corona, S.I., Florán, B., Cortés, H., and Leyva-Gómez, G. (2023). Alteration of the blood-brain barrier by COVID-19 and its implication in the permeation of drugs into the brain. Front Cell Neurosci, 17, 1125109. doi: 10.3389/fncel.2023.1125109.

358. Dahlbäck, B., and Villoutreix, B.O. (2005). Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 25(7), 1311–1320. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168421.13467.82

359. Elshafie, A., Foda, E., Yousef, M.M.G., and El-Naby, K.A.A. (2023). Evaluation of protein C and S levels in patients with COVID-19 infection and their relation to disease severity. The Egyptian Journal of Internal Medicine, 35(1), 14. https://doi.org/10.1186/s43162-023-00195-3

360. Akenami, F.O.T., Koskiniemi, M., and Vaheri, A. (2000). Plasminogen activation in multiple sclerosis and other neurological disorders. Fibrinolysis and Proteolysis, 14(1), 1–14. https://doi.org/10.1054/fipr.2000.0056

361. Korotkyi, O.H., Vovk, A.A., Galenova, T.I., Vovk, T.B., Dvorschenko, K.O., Falalyeyeva, T.M., and Ostapchenko, L.I. (2020). Cytokines profile in knee cartilage of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis and administration of probiotic. Biopolymers and Cell, 36(1), 23–35. https://doi.org/10.7124/bc.000A1E

362. Olansen, J., and Aaron, R.K. (2024). Similar pathophysiological mechanisms between osteoarthritis and vascular disease. Frontiers in Bioscience (Landmark Edition), 29(9), 320. https://doi.org/10.31083/j.fbl2909320

363. Girolami, A., Ferrari, S., Cosi, E., Santarossa, C., and Randi, M.L. (2018). Vitamin K-dependent coagulation factors that may be responsible for both bleeding and thrombosis (FII, FVII, and FIX). Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis, 24(9_suppl), 42S–47S. https://doi.org/10.1177/1076029618811109

364. Chin, K.Y. (2020). The relationship between vitamin K and osteoarthritis: A review of current evidence. Nutrients, 12(5), 1208. https://doi.org/10.3390/nu12051208

365. Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Krętowski, A.J., and Posmyk, R. (2020). Frequency of thrombophilia-associated gene variants: A population-based study. BMC Medical Genetics, 21, Article 198. https://doi.org/10.1186/s12881-020-01136-5

366. Chou, P.-Y., Su, C.-M., Huang, C.-Y., & Tang, C.-H. (2014). The characteristics of thrombin in osteoarthritic pathogenesis and treatment. BioMed Research International, 2014, Article 407518. https://doi.org/10.1155/2014/407518

367. Shi, Y., Gauer, J.S., Baker, S.R., Philippou, H., Connell, S.D., and Ariëns, R.A.S. (2021). Neutrophils can promote clotting via FXI and impact clot structure via neutrophil extracellular traps in a distinctive manner in vitro. Scientific Reports, 11, Article 1718. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81268-7

368. Shafiq, A.J., Kurmanova, G.M., Sadykova, A.D., Tazhibayeva, K.N., Bosatbekov, E.N., and Muratbekova, R.A. (2021). Liver manifestation associated with COVID-19: Literature review. Revista Latinoamericana de Hipertensión, 16(10). https://doi.org/10.5281/zenodo.5110307

369. Suda, T., Takatori, H., Hayashi, T., Kaji, K., Nio, K., Terashima, T., Shimakami, T., Arai, K., Yamashita, T., Mizukoshi, E., et al. (2023). Plasma antithrombin III levels can be a prognostic factor in liver cirrhosis patients with portal vein thrombosis. International Journal of Molecular Sciences, 24(9), 7732. https://doi.org/10.3390/ijms24097732

370. Schlömmer, C., Brandtner, A., and Bachler, M. (2021). Antithrombin and its role in host defense and inflammation. International Journal of Molecular Sciences, 22(8), 4283. https://doi.org/10.3390/ijms22084283

371. Rezaie, A.R., and Giri, H. (2020). Antithrombin: an anticoagulant, anti-inflammatory and antibacterial serpin. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 18(3), 528–533. https://doi.org/10.1111/jth.14724

372. Krenytska, D., Kot, L., Halenova, T., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Pellicano, R., Abenavoli, L., Falalyeyeva, T., and Ostapchenko, L. (2022). Cytokine profile in patients with osteoarthritis after SARS-CoV-2 infection. Minerva Biotechnology and Biomolecular Research, 34, 196–203. https://doi.org/10.23736/S2724-542X.22.02943-1

373. Krenytska, D., Strubchevska, K., Kozyk, M., Vovk, T., Halenova, T., Kot, L., Raksha, N., Savchuk, O., Falalyeyeva, T., Tsyryuk, O., and Ostapchenko, L. (2023). Circulating levels of inflammatory cytokines and angiogenesis related growth factors in patients with osteoarthritis after COVID-19. Frontiers in Medicine, 10, 1168487. https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1168487

374. Norooznezhad, A.H., and Mansouri, K. (2021). Endothelial cell dysfunction, coagulation, and angiogenesis in coronavirus disease 2019 (COVID-19). Microvascular Research, 137, 104188. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2021.104188

375. Taggart, C., Cervantes-Laurean, D., Kim, G., McElvaney, N.G., Wehr, N., Moss, J., and Levine, R.L. (2000). Oxidation of either Methionine 351 or Methionine 358 in α1-Antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. Journal of Biological Chemistry, 275(35), 27258–27265. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61505-X

376. Lagrange, J., Lecompte, T., Knopp, T., Lacolley, P., and Regnault, V. (2022). Alpha-2-macroglobulin in hemostasis and thrombosis: An underestimated old double-edged sword. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 20(4), 806–815. https://doi.org/10.1111/jth.15647

377. Vandooren, J., and Itoh, Y. (2021). Alpha-2-Macroglobulin in inflammation, immunity and infections. Frontiers in Immunology, 12, 803244. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803244

378. Wang, S., Wei, X., Zhou, J., Zhang, J., Li, K., Chen, Q., Terek, R., Fleming, B.C., Goldring, M.B., Ehrlich, M.G., et al. (2014). Identification of α2-macroglobulin as a master inhibitor of cartilage-degrading factors that attenuates the progression of posttraumatic osteoarthritis. Arthritis & Rheumatology, 66(7), 1843–1853. https://doi.org/10.1002/art.38576

Додаток А

Наукові праці,
в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Krenytska, D.I**., Karbovskyy, V.L.,** Abenavoli, L., Falalyeyeva, T.M., Scarlata, G.G.M., Raksha, N.G., Vovk, T.B., Kot, L.I., Savchuk, O.M., Gambardella, M.L., Kovalchuk, O.I., Pankiv, V.I., & Ostapchenko, L.I. (2025). The levels of inflammatory, angiogenic, and stress biomarkers in plasma of donors depending on anti-SARS-CoV-2 IgG titers. Mìžnarodnij Endokrinologìčnij Žurnal, 21(2), 112–120. https://doi.org/10.22141/2224-0721.21.2.2025.1507 **(Scopus, Q4)** (здобувачем самостійно виконано визначення рівнів білків теплового шоку HSP60 та HSP70 у плазмі донорів, проведено комплексний аналіз отриманих експериментальних даних та їх статистичне опрацювання, а також здійснено підготовку рукопису публікації)

2. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Tsyryuk, O., Penchuk, Y., Kot, L., Raksha, N., Falalyeyeva, T., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2025). Analysis of key parameters of the hemostatic system in patients with osteoarthritis after COVID-19. *Minerva Biotechnology and Biomolecular Research, 37*(2), 61–71. https://doi.org/10.23736/S2724-542X.25.03239-0 **(Scopus, Q4)** (здобувачем виконано аналіз параметрів системи фібринолізу, зокрема визначено концентрацію плазміногену та оцінено його відносну активність, досліджено рівні тканинного активатора плазміногену (tPA) та інгібітора активатора плазміногену-1 (PAI-1), а також встановлено інгібіторний потенціал α2-макроглобуліну та α1-антитрипсину. Проведено узагальнення та інтерпретацію отриманих результатів, а також взято участь у підготовці та написанні рукопису публікації.)

3. Halenova, T., Rachkovska, A., Krenytska, D., Kostiuk, O., **Karbovskyy, V.,** Vovk, T., Raksha, N., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2024). Abnormal proteolytic activity profile in blood plasma of healthy volunteers depending on titers of

anti-SARS-CoV-2 IgG. Journal of Biological Research, 97, Article 12567. https://doi.org/10.4081/jbr.2024.12567 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-3, ММП-3/10, ММП-8, ММП-9) та їх інгібітора ТІМП-1 у плазмі крові, очищено та проаналізовано пептидні пули з плазми крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

4. Halenova, T.I., Raksha, N.H., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L**., Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., Tomchuk, V. A., & Savchuk, O. M. (2024). Proteolytic imbalance in plasma of patients with multiple sclerosis following COVID-19. *International Neurological Journal (Ukraine), 20*(5), 221–227 https://doi.org/10.22141/2224-0713.20.5.2024.1089 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-3, ММП-3/10, ММП-8, ММП-9) та їх інгібітора ТІМП-1 у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

5. Halenova, T.I., Raksha, N.G., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L.,** Sholomon, S.M., Melnyk, V.S., & Savchuk, O.M. (2024). Characteristics of fibrin/fibrinogen degradation products in multiple sclerosis following SARS-CoV-2 infection. *International Neurological Journal (Ukraine)*, 20(2), 104–109. https://doi.org/10.22141/2224-0713.20.2.2024.1060 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення концентрації фібриногену, розчинних фібрин-мономерних комплексів та вмісту D-димеру, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

6. Halenova, T. I., Raksha, N. H., Vovk, T. B., **Karbovskyy, V. L.,** Sholomon, S. M., Melnyk, V. S., & Savchuk, O. M. (2024). Cytokine profile in multiple sclerosis patients with and without COVID-19. *Wiadomości Lekarskie (Medical Advances), 77*(4), 640–645. https://doi.org/10.36740/WLek202404104 **(Scopus Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів про- та протизапальних цитокінів у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

7. Halenova, T.I., Raksha, N.G., Vovk, T.B., **Karbovskyy, V.L.,** Sholomon, S.M., Melnyk, V.S., & Savchuk, O.M. (2024). Coagulation and anticoagulation parameters in multiple sclerosis patients with and without COVID-19. *Клінічна та профілактична медицина*, **3(33)**, 36–45. https://doi.org/10.31612/2616-4868.3.2024.05 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів протромбіну, плазміногену, тканинного активатора плазміногену, інгібітора активатора плазміногену-1 та протеїну С, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

8. Rachkovska, A., Strubchevska, K., Kozyk, M., Goldstein, B., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Falalyeyeva, T., Kovalchuk, O., & Ostapchenko, L. (2024). Prothrombin changes and suggested correlation with the titers of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in recently recovered from SARS-CoV-2 infection healthy volunteers. Minerva Biotechnology and Biomolecular Research, 36(1), 13–20. https://doi.org/10.23736/S2724-542X.24.03051-7 **(Scopus, Q4)** (здобувачем проведено визначення часу зсідання плазми крові у хронометричних тестах, а також визначено вміст молекул протромбінового походження та потенційну активність протромбіну, здійснено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів)

9. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Halenova, T., Vovk, T., Savchuk, O., & Ostapchenko, L. (2023). A study of fibrinolytic system components in donor groups depending on various titers of circulating anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 34(7), 439–445. https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001248 **(Scopus, Q3)** (здобувачем особисто здійснено визначення інгібіторного потенціалу α2-антиплазміну, α1-антитрипсину та α2-макроглобуліну, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

10. Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Halenova, T., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Liubenko, D., Falalyeyeva, T., & Ostapchenko, L. (2023). Characteristics of products of fibrinogen origin in the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. Reviews on Recent Clinical Trials, 18, 69–75.

https://doi.org/10.2174/1574887118666221219115856 **(Scopus, Q3)** (здобувачем особисто здійснено визначення концентрації фібриногену та розчинних фібрин-мономерних комплексів, досліджено вміст D-димеру, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

11. Strubchevska, K., Rachkovska, A., Krenytska, D., **Karbovskyy, V.,** Kozyk, M., Secor, B., Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Falalyeyeva, T., Kaminsky, R., & Ostapchenko, L. (2023). Coagulation parameters in post-COVID-19 condition in relation to various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. *International Journal of General Medicine, 16*, 6127–6135. https://doi.org/10.2147/IJGM.S425496 **(Scopus, Q2)** (здобувачем особисто здійснено визначення концентрацій тромбомодуліну, протеїну С та антитромбіну III, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

12. Галенова, Т., Калашнікова, М., **Карбовський, В.,** Шоломон, С., & Мельник, В. (2023). Біохімічні показники крові у хворих на розсіяний склероз, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія»*, 4(95), 13–19. DOI: 10.17721/1728.2748.2023.95.13-19 (здобувачем проведено визначення активності сироваткових ферментів аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, гамма-глутаматтрансферази, лужної фосфатази, лактатдегідрогенази та амілази, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

13. Калашнікова, М., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2023). Optimization of an enzyme electrophoresis method for using collagen as a substrate. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(94), 41–45. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.94.41-45 (здобувачем запропоновано підходи до оптимізації умов проведення ензим-електрофорезу з використанням колагену як субстрату, а також здійснено порівняльний аналіз ефективності різних варіантів методу)

14. Krenytska, D., Rachkovska, A., Savchuk, O., & **Karbovskyi, V.** (2023). Amylase concentration in donor groups depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG

in blood plasma. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 2(93), 18–21. DOI 10.17721/1728.2748.2023.93.18-21 (здобувачем особисто здійснено визначення концентрації амілази у сироватці крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

15. Krenytska, D., Rachkovska, A., **Karbovskyy, V.,** Raksha, N., Vovk, T., Savchuk, O., Ostapchenko, L., & Halenova, T. (2023). Cytokine profile depending on titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in the blood plasma of healthy volunteers. Journal of Biological Research, 96(2), Article 11256. https://doi.org/10.4081/jbr.2023.11256 **(Scopus, Q4)** (здобувачем особисто здійснено визначення рівнів про- та протизапальних цитокінів, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

16. Рачковська, А., Кунцова, М., Креницька, Д., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2023). Параметри ліпідного профілю у донорів, які перехворіли на COVID-19 та мають різні титри анти-SARS-CoV-2 IgG у плазмі крові. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 1(92), 22–26. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2023.92.22-26 (здобувачем особисто проаналізовано ліпідний профіль у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

17. Креницька, Д., Рачковська, А., Павлівський, Ю., Чижик, Ю., & **Карбовський, В.** (2022). Біохімічні параметри печінки за наявності у кровотоці анти-SARS-CoV-2 IgG. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 1(88), 33–41. DOI 10.17721/1728.2748.2022.88.33-40 (здобувачем проведено визначення концентрації загального, прямого та непрямого білірубіну, а також досліджено кореляцію між активністю аланінамінотрансферази та С-реактивним білком у плазмі крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

18. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2022). Характеристика залізозалежних параметрів донорів за наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(91), 10–15. DOI 10.17721/1728.2748.2022.91.10-14 (здобувачем проведено визначення концентрації феритину та трансферину у плазмі крові донорів, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

19. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В.** (2022). Біохімічні параметри функціонування нирок у донорів за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(90), 45–52. DOI 10.17721/1728.2748.2022.90.20-25 (здобувачем узагальнено результати щодо змін показників функціонування нирок у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 IgG, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

20. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & **Карбовський, В**. (2021). Показники згортання крові у вагітних жінок, хворих на COVID-19. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 3(86), 34–39. DOI 10.17721/1728.2748.2021.86.34-39 (здобувачем визначено час згортання крові у хронометричних тестах АЧТЧ та ПЧ, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

21. Креницька, Д., Рачковська, А., Савчук, О., & Карбовський, В. (2021). Біохімічні параметри функціонального стану печінки у хворих на гепатит В за умови коінфекції SARS-CoV-2. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія», 4(87), 12–18. https://doi.org/10.17721/1728.2748.2021.87.12-17 (здобувачем визначено активність АЛС, АСТ, лужної фосфатази, ГГТ, концентрацію загального та прямого білірубіну у сироватці крові, проведено аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, підготовлено публікацію до друку)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Kalashnikova M., Popovych K. and **Karbovskiy V.** (2024). Analysis of changes in proteolytic activity in adipose tissue during obesity induction and its prevention with corrective peptides. In: 1st International scientific and practical online conference «Modern achievements of experimental, clinical, environmental biochemistry and molecular biology». Kharkiv, Ukraine, 7 March 2024, pp. 555-557.

2. Kalashnikova M., Yefimenko T. and **Karbovskiy V.** (2024). Serine protease content in blood plasma of donors with different titers of IgG anti-SARS-CoV-2. In: XXI International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: Advancements in Life Sciences». Kyiv, Ukraine, 24-26 April 2024, pp. 188-191.

3. Raksha N., Krenytska D. and **Karbovskyy V.** (2024). Dysfunction of fibrinolytic system in post-COVID-19 period. In: 7th International Scientific Conference «Current Problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology». Dnipro, Ukraine, 3–4 October 2024, pp. 109–110.

4. Savchuk O.O., Halenova T.I. and **Karbovskyy V.L.** (2024). Proteolytic balance alterations in blood plasma of donors depending on anti-SARS-CoV-2 IgG titer. Науково-практична конференція за участю молодих вчених «Організаційно-прикладні аспекти клінічної та профілактичної медицини в умовах сучасних викликів і загроз: Проблеми та перспективи інноваційного розвитку», 30–31 October 2024, / Клінічна та профілактична медицина, №7(37), p.180.

5. Rachkovska A., Krenytska D. and **Karbovskiy V.** (2023). Concentrations of fibrinogen and D-dimer in blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. In: The 66th International Conference for students of Physics and Natural Sciences «Open Readings 2023». Vilnius, Lithuania, 18–21 April 2023, p.406.

6. Рачковська А.М., Креницька Д.І., **Карбовський В.Л.** Зміни параметрів протеїну С у плазмі крові людей з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG.

«Актуальні питання біології та медицини», Лубни, Україна, 2 червня 2023 року, стр.36-40.

7. Rachkovska A., Savchuk O. and **Karbovskyy V.** (2023). Plasminogen as a key component of the fibrinolytic system in the blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. In: 20th Horizons in Molecular Biology Conference. Göttingen, Germany, 11–14 September 2023, p.32.

Додаток Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

Ганна ТОЛСТАНОВА

2022 р.

ВИТЯГ
з протоколу №4 засідання комісії з питань біоетики
Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету імені Тараса Шевченка

від «25» травня 2022 року

Присутні: головуючий на засіданні, заст. голови комісії, д.б.н., проф. Макарчук М.Ю.; секретар комісії, к.б.н. Юет А.С.; члени комісії: д.б.н., проф. Фалалеєва Т.М., д.м.н., проф. Маєвський О.Є., д.в.н., проф. Малюк М.О., Левків М.Ю.

СЛУХАЛИ:

Про дотримання біоетичних вимог у науковій роботі Карбовського В.Л., що виконується у рамках науково-дослідної теми «Тромбози як фактор ризику виникнення ускладнень у пацієнтів, що хворіли на COVID-19» (№д/р 0121U109854, 2021-2023 рр.).

Мета та завдання дослідження: метою роботи було оцінити стан системи гемостазу у осіб, які перенесли COVID-19, та з'ясувати механізми, які лежать в основі виникнення і збереження порушень у системі гемостазу пацієнтів у постковідний період. Особливу увагу буде приділено дослідженню показників системи гемостазу та чинників, які потенційно можуть сприяти збереженню порушень, у залежності від рівня антитіл до SARS-CoV-2. Для досягнення запланованої мети передбачається вирішити наступні завдання: 1). Дослідити функціональний стан основних ланок системи гемостазу (системи зсідання та фібринолізу) у постковідний період у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. 2). З'ясувати внесок потенційних тригерів системи гемостазу (цитокіни, компоненти системи протеолізу) у розвиток порушень системи гемостазу у пацієнтів, що перенесли COVID-19. 3). Проаналізувати вміст деяких транскрипційних факторів HIF-1α, NF-κB факторів та ростових факторів VEGF, FGF-2, PDGF. 4). Дослідити появу в організмі пацієнтів, що хворіли на COVID-19, білкових молекул, у тому числі й комплексів антитіл з білками системи гемостазу, які потенційно можуть впливати на функціонування системи гемостазу. Очистити та охарактеризувати ці молекули з використанням модельних систем різного рівня.

Об'єкт дослідження: система гемостазу у пацієнтів, що хворіли на COVID-19.

Предмет дослідження: фактори системи гемостазу, чинники протеолітичного дисбалансу, цитокіни, ростові та транскрипційні фактори, ковалентні білкові комплекси.

Методи дослідження: хроматографічні методи (очищення комплексів антитіл з білками, одержання фракції серинових протеїназ, аналіз білково-пептидного складу фракцій); електрофоретичні методи (визначення молекулярної маси білків, виявлення протеїназ різної субстратної специфічності, контроль на етапах очищення цільових білків); спектрофотометричні методи (визначення активності ферментів, вмісту окремих сполук); метод імуноферментного аналізу (визначення вмісту цитокінів, матриксних металопротеїназ, факторів клітинної відповіді); тести для характеристики стану системи гемостазу, зокрема хронометричні тести, а також статистичні та математичні методи аналізу.

Результати дослідження: буде проаналізовано вміст та активність окремих параметрів коагуляційного каскаду (фібриноген, протромбін, протеїн С, фактор Х та ін.) та системи фібринолізу (плазміноген, тканинний активатор плазміногену, його інгібітор першого типу, антиплазмін). Буде досліджено цитокіновий профіль та оцінено вміст ключових транскрипційних та ростових факторів у донорів, що перенесли COVID-19 і характеризуються різним титром антитіл проти SARS-CoV-2. Також буде оцінено стан системи протеолізу за вмістом у плазмі крові донорів матриксних металопротеїназ та активністю серинових протеїназ, передбачається очистити фракцію серинових протеїназ і проаналізувати склад фракції за молекулярною масою та здатністю ферментів, присутніх у фракції, розщеплювати різні білкові субстрати (фібриноген, колаген, желатин). Особливу увагу буде приділено аналізу зразків плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 на присутність нетипових білкових молекул, у тому числі й комплексів антитіл з білками системи гемостазу, деградованих форм плазміногену/плазміну, а також пептидного та протробінового пулів, що можуть впливати на функціонування гемостазу. Їх очистка та характеристика дозволить отримати інформацію щодо характеру та механізмів дисфункціонування системи гемостазу у пацієнтів, які хворіли на COVID-19. Аналіз потенційної появи в кровотоці нехарактерних для фізіологічного стану протеолітичних ферментів дозволить розробити концепцію, що інтегрує появу в кровотоці деградованих та аномальних білкових молекул з метаболічними порушеннями за розвитку патологічного процесу. Аналіз отриманих результатів стосовно функціонування системи гемостазу за даного патологічного стану дозволить запропонувати концепцію причин появи патологічних змін в системі гемостазу, що призводять до гіперкоагуляції, та як наслідок – тромбозів різного генезу. Дослідження окремих параметрів системи гемостазу та потенційного впливу на функціонування цих параметрів білкових молекул, що з'являються в кровотоці за розвитку даного патологічного стану, дозволить виявити можливі шляхи виникнення дисбалансу в системі гемостазу та, як наслідок, тромботичних ускладнень.

Дотримання біоетики при виконанні експериментальних досліджень: наукова робота буде виконана із дотриманням основних положень Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації "Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження", Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (Ов'єдська конвенція), Міжнародних етичних рекомендацій CIOMS, а також чинного законодавства України щодо проведення біомедичних досліджень. У дослідженні візьмуть участь добровольці, які перенесли COVID-19, і після одужання згодилися бути донорами плазми крові для біотехнологічного використання на підприємстві ТОВ «БІОФАРМА-ПЛАЗМА» (Україна). Віковий діапазон донорів складатиме 25-45 років. Забір плазми здійснюватиметься через 3–6 місяців після одужання. Перед використанням у біотехнологічному виробництві плазма підлягатиме стандартному скринінговому контролю, що проводиться на підприємствах такого профілю; зразки з позитивними результатами скринінгу не включатимуться до подальшого аналізу. З дослідження будуть виключені особи з серцево-судинними або цереброваскулярними захворюваннями, дефіцитом вітаміну К, з травматичними порушеннями системи згортання крові, ті, хто отримував антикоагулянтну терапію, а також особи з іншими порушеннями, що могли б впливати на стан системи гемостазу та особи, які були вакциновані проти COVID-19.

УХВАЛИЛИ:

За результатами відкритого голосування («За» - 6; «Проти» - немає; «Утрималися» - немає) визнати, що наукова робота Карбовського В.Л., що виконується у рамках науково-дослідної теми «Тромбози як фактор ризику виникнення ускладнень у пацієнтів, що хворіли на COVID-19» (№д/р 0121U109854, 2021-2023 рр.) проводиться із дотриманням біоетичних вимог та відповідає принципам біоетики, викладеним у Гельсінській декларації Всесвітньої медичної асоціації "Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження", Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (Ов'єдська

конвенція), Міжнародних етичних рекомендаціях CIOMS, а також вимогам чинного законодавства України щодо проведення біомедичних досліджень.

Головуючий на засіданні,
заступник голови комісії — Микола МАКАРЧУК

Секретар комісії — Алеатина ЮЕТ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з наукової роботи
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

_____ Ганна ТОЛСТАНОВА

«___» _____ 2022 р.

ВИТЯГ

з протоколу № 3 засідання комісії з питань біоетики
Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету імені Тараса Шевченка

від «03» жовтня 2022 року

Присутні: головуючий на засіданні, заст. голови комісії, д.б.н., проф. Макарчук М.Ю.; секретар комісії, к.б.н. Юет А.С.; члени комісії: д.б.н., проф. Фалалєєва Т.М., д.м.н., проф. Маєвський О.Є., д.в.н., проф. Малюк М.О., Левків М.Ю.

СЛУХАЛИ:

2. Про дотримання біоетичних вимог при виконанні науково-дослідної роботи з дослідження біохімічно-молекулярних показників крові та синовіальної рідини хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції для подачі та опублікування такими авторськими колективами у складі та відповідними назвами статей і фахових журналів, тез доповідей і наукових конференцій:

- Юет А.С., Тугаров Ю.Р., Дворщенко К.О., Гребінник Д.М., Савчук О.М., Короткий О.Г., Остапченко Л.І. «Експресія генів *TGFB1*, *FOXO1* та *COMP* у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції». (Цитологія та Генетика, ISSN: 0564-3783).
- Бородін С., Короткий О., Юет А., Дворщенко К. «Перекисне окиснення ліпідів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія, ISSN: 1728-2748).
- Бородін С.В., Остапченко Д.І., Короткий О.Г., Дворщенко К.О. «Показники окисно-антиоксидантної системи у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (Вісник проблем біології та медицини. ISSN: 2077-4214).
- Короткий О., Тугаров Ю., Дворщенко К. «Інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові хворих на остеоартрит». (Міжнародна науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», 9–11 листопада 2022 р., м. Чернівці, Україна).
- Остапченко Д.І., Бородін С.В., Дворщенко К.О., Короткий О.Г. «Вільнорадикальні процеси у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (V науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція», 17 листопада 2022 року, м. Харків, Україна).
- Остапченко Д.І., Тугаров Ю.Р., Дворщенко К.О., Короткий О.Г. «Антиоксидантна ферментативна активність у крові хворих на остеоартрит SARS-CoV2-інфекції». (IX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень», 17–18 листопада 2022 р., м. Київ, Україна).
- Остапченко Д.І., Бородін С.В., Дворщенко К.О., Короткий О.Г. «Активність антиоксидантних ферментатів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (XVI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини», 24-25 листопада 2022 р., м. Запоріжжя, Україна).

Мета дослідження: проаналізувати експресію генів *TGFB1, FOXO1* та *COMP* та інтенсивність вільнорадикальних процесів, перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної ферментативної активності в крові та синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

Об'єкт дослідження: експресія генів *TGFB1, FOXO1* та *COMP* та інтенсивність вільнорадикальних процесів, перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної ферментативної активності.

Предмет дослідження: сироватка крові та синовіальна рідина контрольної (умовно здорових) та дослідних груп пацієнтів: хворих на остеоартрит та хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції.

Методи дослідження: робота виконувалась із застосуванням методів молекулярної генетики та біохімії, зокрема кількісна ЗТ-ПЛР у реальному часі, ІФА, спектрофотометричні методи. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати досліджень.

Було показано зниження рівня експресії генів *TGFB1* та *FOXO1* більшою мірою у хворих на остеоартрит, які перехворіли COVID-19, порівняно з групою хворих на остеоартрит колінних суглобів на фоні більш суттєвого зменшення як супероксиддисмутазної, так і каталазної активності (що свідчить про порушення редокс-статусу клітин і можливе приглушення TGF-β1-FoxO1 сигналінгу) у пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції. Це може бути пов'язано з посиленням загальносистемного запалення через реагування організму на вірусну інвазію. У той же час було виявлено більш суттєве зниження рівня експресії гена *COMP* у хворих на остеоартрит, які перехворіли COVID-19, у порівнянні з групою хворих на остеоартрит колінних суглобів на тлі інтенсивнішого зростання концентрації *COMP* у пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції. Такі дані вказують на більш значне активування деструктивних процесів у клітинах після перенесеної інфекції та подальше прогресування захворювання. Розуміння чітких механізмів формування більш важкого перебігу остеоартриту та розвитку ускладнень у пацієнтів із пост-COVID-19 синдромом на прикладі функціонування TGF-β1-FoxO1 сигнального каскаду потребує проведення подальших досліджень.

Встановлено, що у хворих на остеоартрит колінних суглобів після SARS-CoV2-інфекції, в сироватці крові та синовіальній рідині інтенсифікуються вільнорадикальні процеси, зростає вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів і знижується активність антиоксидантних ферментів, що свідчить про більш інтенсивні порушення окисно-антиоксидантного балансу та розвиток окисного стресу в суглобах порівняно з пацієнтами, в яких діагностовано лише остеоартрит. Отримані результати можуть свідчити про те, що після перенесення COVID-19 у хворих, які мають хронічне захворювання - остеоартрит, можливий розвиток більш важкого перебігу даного захворювання з виникненням ускладнень.

Дотримання біоетики при виконанні експериментальних досліджень.

У дослідженні брали участь пацієнти у віці від 39 до 70 років, які перебували на стаціонарному або амбулаторному лікуванні в ортопедичному спеціалізованому медичному центрі «Ортоклініка» (Тернопіль, Україна) з приводу остеоартриту. У пацієнтів був встановлений діагноз «остеоартрит колінних суглобів II–III ступеню» на підставі клінічних та рентгенологічних критеріїв. На етапі відбору усім хворим проводилася рентгенографія колінних суглобів у прямій (передньозадній) та боковій проекціях. Оцінка інтенсивності болю та функціонального стану колінних суглобів хворих проводилась за допомогою розрахунку індексу WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index), який підраховується в результаті самостійного проходження пацієнтом тесту, що включає 24 запитання, що відображають вираженість больових відчуттів (5 питань), скутості (2 питання) та функціональної активності (17 питань) (McConnell S at all., 2001). Всі учасники дослідження були поділені на такі групи. Перша група (n=10) – контрольна, умовно здорові люди. Друга група (n=22) – пацієнти з остеоартритом колінних суглобів II–III ступеню. Третя група (n=14) – пацієнти з

остеоартритом колінних суглобів II–III ступеню, які перенесли легку та середньотяжку форми COVID-19 6-9 місяців тому. Діагноз COVID-19 був підтверджений молекулярним аналізом (RT-PCR) мазка з носоглотки. Забір біологічного матеріалу (кров і синовіальна рідина) проводився з суворим дотриманням усіх вимог до таких маніпуляцій медичним персоналом на базі вищезгаданого спеціалізованого медичного центру «Ортоклініка», місто Тернопіль, Україна. Кров для подальшого отримання сироватки забирали в стерильних умовах за допомогою одноразових ін'єкційних систем. Синовіальну рідину збирали у стерильні пробірки з гепарином шляхом артроцентезу колінного суглобу відповідно до стандартних протоколів обробки. Крім того, враховуючи, що найбільші порожнини колінного та кульшового суглобів мають максимальний об'єм синовіальної рідини до 3,5 мл, забір біологічного матеріалу в умовно здорових людей може бути небезпечним, й тому для уникнення потенційних порушень структурно-функціонального стану суглобу в контрольній групі людей синовіальна рідина не відбиралася.

Усі учасники, що добровільно та на безоплатній основі погодилися взяти участь у дослідженні, ознайомилися та підписали відповідну форму інформованої згоди. Дослідження виконані з дотриманням основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ICH GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.; і були схвалені комісією з біоетики «Медичного центру Ортоклініка» (протокол № 1 від 17 січня 2022; м. Тернопіль, Україна). Було вжито всіх необхідних заходів для забезпечення анонімності пацієнтів.

УХВАЛИЛИ:

2. За результатами відкритого голосування («за» – 6, «проти» – немає, «утримались» – немає):

Науково-дослідна робота Дворщенко К.О. з співавторами виконана у відповідності до Гельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964 зі змінами), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації по біоетиці та правах людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятою в 1997 році в м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р.; схвалена комісією з біоетики «Медичного центру Ортоклініка» (протокол № 1 від 17 січня 2022; м. Тернопіль, Україна); та може бути опублікована такими авторськими колективами у складі та з відповідними назвами статей в фахових журналах і представлена матеріалами тез доповідей на наукових конференціях:

- Юет А.С., Тугаров Ю.Р., Дворщенко К.О., Гребінник Д.М., Савчук О.М., Короткий О.Г., Остапченко Л.І. «Експресія генів *TGFB1*, *FOXO1* та *COMP* у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції». (Цитологія та Генетика, ISSN: 0564-3783).
- Бородін С., Короткий О., Юет А., Дворщенко К. «Перекисне окиснення ліпідів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія, ISSN: 1728-2748).
- Бородін С.В., Остапченко Д.І., Короткий О.Г., Дворщенко К.О. «Показники окисно-антиоксидантної системи у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (Вісник проблем біології та медицини. ISSN: 2077-4214).
- Короткий О., Тугаров Ю., Дворщенко К. «Інтенсивність вільнорадикальних процесів у сироватці крові хворих на остеоартрит». (Міжнародна науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», 9–11 листопада 2022 р., м. Чернівці, Україна).

- Остапченко Д.І., Бородін С.В., Дворщенко К.О., Короткий О.Г. «Вільнорадикальні процеси у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (V науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція», 17 листопада 2022 року, м. Харків, Україна).
- Остапченко Д.І., Тугаров Ю.Р., Дворщенко К.О., Короткий О.Г. «Антиоксидантна ферментативна активність у крові хворих на остеоартрит SARS-CoV2-інфекції». (IX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень», 17–18 листопада 2022 р., м. Київ, Україна).
- Остапченко Д.І., Бородін С.В., Дворщенко К.О., Короткий О.Г. «Активність антиоксидантних ферментатів у синовіальній рідині хворих на остеоартрит після SARS-CoV2- інфекції». (XVI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини», 24-25 листопада 2022 р., м. Запоріжжя, Україна).

Експериментальні дослідження Дворщенко К.О. та співавторів вважати такими, що не суперечать загально прийнятим біоетичним нормам із дотриманням відповідних міжнародних положень стосовно проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень і можуть бути використані в матеріалах наукових публікацій.

Головуючий на засіданні,
заступник голови комісії — Микола МАКАРЧУК

Секретар комісії — Алевтина ЮЕТ

Додаток В

АКТ

впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи
«Протеолітичний дисбаланс у пацієнтів з хронічним коронарним синдромом після COVID-19» у клінічну практику

Розроблено: У межах виконання спільних досліджень за договором співробітниками кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка проведені дослідження сироваткових показників, що відображають інтенсивність протеолітичних процесів у тканинах пацієнтів з хронічним коронарним синдромом (ХКС) після COVID-19. Дослідження охоплювали визначення рівнів матриксних металопротеїназ (ММП-1, -2, -3, -8, -10) та їх інгібітора TIMP-1 методом імуноферментного аналізу, встановлення активності окремих протеаз методом зимографії, а також дослідження складу пептидного пулу в плазмі крові. На основі отриманих даних було зроблено висновок, що COVID-19 може бути тригером дестабілізації ХКС через дисбаланс в системі протеолізу, що, у свою чергу, може сприяти порушенню бар'єрної функції ендотелію. Використання ММП-1 та ММП-10 як біомаркерів, динамічний контроль та індивідуалізований підхід до лікування допоможуть зменшити ризики прогресування хвороби та оптимізувати терапевтичну стратегію для пацієнтів з ХКС після COVID-19. Результати у вигляді наукової продукції (науковий звіт) передані медичному центру **«Біомед» (м. Київ).**

Наукова новизна роботи: Встановлено, що у пацієнтів з ХКС після перенесення коронавірусної хвороби відбувалася суттєва активація матриксних металопротеїназ у плазмі крові, що може бути причиною посилення атерогенезу та ендотеліальної дисфункції. Це корелює з інтенсифікацією протеолітичної активності, що може сприяти деструкції бар'єрних структур судин та посилювати прогресування захворювання. Аналіз пептидного пулу виявив значні зміни у його складі в пацієнтів з ХКС після COVID-19, що свідчить про зміни у процесах деградації білків. Отримані дані підтверджують, що SARS-CoV-2 може виступати тригером патологічних реакцій за умов хронічного запалення в організмі через активацію ММП.

Практична реалізація:
Надані матеріали будуть використані у медичному центрі **«Біомед» (м. Київ)** для розробки рекомендацій з лікування пацієнтів з ХКС, які перенесли COVID-19.

Директор медичного центру «Біомед»
Ярослав Гулей
(Печатка медичного центру «Біомед»)
24.10.2024р

АКТ

впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи «Протеолітичний дисбаланс у пацієнтів із розсіяним склерозом після COVID-19» у клінічну практику

Розроблено: У межах виконання спільних досліджень за договором співробітниками кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка проведені дослідження сироваткових показників, що відображають інтенсивність протеолітичних процесів у тканинах пацієнтів з розсіяним склерозом (РС), які перенесли COVID-19. Дослідження охоплювали визначення рівнів матриксних металопротеїназ (ММП-1, -2, -3, -8, -10) та їх інгібітора TIMP-1 методом імуноферментного аналізу, встановлення активності окремих протеаз методом зимографії, а також дослідження складу пептидного пулу в плазмі крові. На основі отриманих даних було зроблено висновок, що COVID-19 може бути тригером загострення розсіяного склерозу через дисбаланс в системі протеолізу, що, у свою чергу, може сприяти порушенню бар'єрної функції ЦНС. Використання ММП-1 та ММП-10 як біомаркерів, динамічний контроль та індивідуалізований підхід до лікування допоможуть зменшити ризики прогресування хвороби та оптимізувати терапевтичну стратегію для пацієнтів з РС після COVID-19. Результати у вигляді наукової продукції (науковий звіт) передані медичному центру **«Андроцентр» (м.Обухів).**

Наукова новизна роботи: Встановлено, що у пацієнтів з розсіяним склерозом після перенесення коронавірусної хвороби відбувалася суттєва активація матриксних металопротеїназ у плазмі крові, що може бути причиною посилення нейрозапальних процесів. Це корелює з інтенсифікацією протеолітичної активності, що може сприяти деструкції бар'єрних структур центральної нервової системи та посилювати прогресування захворювання. Аналіз пептидного пулу виявив значні зміни у його складі в пацієнтів із РС після COVID-19, що свідчить про зміни у процесах деградації білків. Отримані дані підтверджують, що SARS-CoV-2 може виступати тригером патологічних реакцій за умов автоімунного ураження нервової системи через активацію ММП.

Практична реалізація:
Надані матеріали будуть використані у медичному центрі **«Андроцентр» (м. Обухів)** для розробки рекомендацій з лікування пацієнтів з розсіяним склерозом, які перенесли COVID-19.

В/о Директора медичного центру «Андроцентр»
Кашпорова Вікторія Вікторівна

10.12.2023 р.

АКТ

впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи «Функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом після COVID-19» у клінічну практику

Розроблено:

У межах виконання спільних досліджень за договором співробітниками кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка проведені дослідження основних параметрів коагуляції та фібринолізу у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом (РС), які перенесли COVID-19. Було проаналізовано рівні таких гемостатичних факторів як фібриноген, D-димер, протромбін, плазміноген, тканинний активатор плазміногену, інгібітор активатора плазміногену-1, протеїн С, розчинний тромбомодулін, а також активність плазміногену та α-2-антиплазміну. Виявлено ряд відмінностей між групами пацієнтів із РС, що перенесли COVID-19, і тими, що не мали підтвердженої інфекції. Результати у вигляді наукового звіту передані медичному центру **«Андроцентр» (м. Обухів).**

Наукова новизна роботи: Встановлено, що у пацієнтів з розсіяним склерозом після перенесеного COVID-19 спостерігаються певні зміни у параметрах системи гемостазу, що може свідчити про підвищений ризик тромбоутворення та мікросудинних уражень. Високі рівні D-димеру та розчинного тромбомодуліну можуть бути маркером порушення ендотеліальної функції та збільшення ризику тромбозів. Зниження активності плазміногену та підвищення рівня α-2-антиплазміну може свідчити про порушення фібринолітичної системи у пацієнтів з РС після COVID-19. Дисбаланс в системі гемостазу може бути ключовою ланкою у механізмах загострення РС після перенесеного COVID-19 та брати безпосередню участь у прогресуванні нейродегенеративних процесів.

Практична реалізація:

Надані матеріали будуть використані у медичному центрі **«Андроцентр» (м. Обухів)** для розробки персоналізованих підходів до лікування пацієнтів з розсіяним склерозом після COVID-19, включаючи моніторинг факторів системи гемостазу та призначення відповідної терапії.

В/о Директора медичного центру «Андроцентр»

Кашпорова Вікторія Вікторівна

10.12.2023р

АКТ

впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи «Функціонування системи гемостазу у пацієнтів із розсіяним склерозом після COVID-19» у клінічну практику

Розроблено:

У межах виконання спільних досліджень за договором співробітниками кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка проведені дослідження основних параметрів коагуляції та фібринолізу у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом (РС), які перенесли COVID-19. Було проаналізовано рівні таких гемостатичних факторів як фібриноген, D-димер, протромбін, плазміноген, тканинний активатор плазміногену, інгібітор активатора плазміногену-1, протеїн С, розчинний тромбомодулін, а також активність плазміногену та α-2-антиплазміну. Виявлено ряд відмінностей між групами пацієнтів із РС, що перенесли COVID-19, і тими, що не мали підтвердженої інфекції. Результати у вигляді наукового звіту передані медичному центру ТОВ **«Медбуд-Клінік» (м. Київ).**

Наукова новизна роботи: Встановлено, що у пацієнтів з розсіяним склерозом після перенесеного COVID-19 спостерігаються певні зміни у параметрах системи гемостазу, що може свідчити про підвищений ризик тромбоутворення та мікросудинних уражень. Високі рівні D-димеру та розчинного тромбомодуліну можуть бути маркером порушення ендотеліальної функції та збільшення ризику тромбозів. Зниження активності плазміногену та підвищення рівня α-2-антиплазміну може свідчити про порушення фібринолітичної системи у пацієнтів з РС після COVID-19. Дисбаланс в системі гемостазу може бути ключовою ланкою у механізмах загострення РС після перенесеного COVID-19 та брати безпосередню участь у прогресуванні нейродегенеративних процесів.

Практична реалізація:

Надані матеріали будуть використані у медичному центрі ТОВ **«Медбуд-Клінік» (м. Київ)** для розробки персоналізованих підходів до лікування пацієнтів з розсіяним склерозом після COVID-19, включаючи моніторинг факторів системи гемостазу та призначення відповідної терапії.

Головний лікар медичного центру ТОВ «Медбуд-Клінік» Дмитро Донець

Україна • Товариство з обмеженою відповідальністю • «Медбуд-Клінік» • м. Київ • 41764111 • ДЛЯ ДОВІДОК

12.12.2024 р.

АКТ

впровадження результатів виконаної науково-дослідної роботи «Протеолітичний дисбаланс у пацієнтів із розсіяним склерозом після COVID-19» у клінічну практику

Розроблено: У межах виконання спільних досліджень за договором співробітниками кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка проведені дослідження сироваткових показників, що відображають інтенсивність протеолітичних процесів у тканинах пацієнтів з розсіяним склерозом (РС), які перенесли COVID-19. Дослідження охоплювали визначення рівнів матриксних металопротеїназ (ММП-1, -2, -3, -8, -10) та їх інгібітора TIMP-1 методом імуноферментного аналізу, встановлення активності окремих протеаз методом зимографії, а також дослідження складу пептидного пулу в плазмі крові. На основі отриманих даних було зроблено висновок, що COVID-19 може бути тригером загострення розсіяного склерозу через дисбаланс в системі протеолізу, що, у свою чергу, може сприяти порушенню бар'єрної функції ЦНС. Використання ММП-1 та ММП-10 як біомаркерів, динамічний контроль та індивідуалізований підхід до лікування допоможуть зменшити ризики прогресування хвороби та оптимізувати терапевтичну стратегію для пацієнтів з РС після COVID-19. Результати у вигляді наукової продукції (науковий звіт) передані медичному центру ТОВ **«Медбуд-Клінік» (м.Київ).**

Наукова новизна роботи: Встановлено, що у пацієнтів з розсіяним склерозом після перенесення коронавірусної хвороби відбувалася суттєва активація матриксних металопротеїназ у плазмі крові, що може бути причиною посилення нейрозапальних процесів. Це корелює з інтенсифікацією протеолітичної активності, що може сприяти деструкції бар'єрних структур центральної нервової системи та посилювати прогресування захворювання. Аналіз пептидного пулу виявив значні зміни у його складі в пацієнтів із РС після COVID-19, що свідчить про зміни у процесах деградації білків. Отримані дані підтверджують, що SARS-CoV-2 може виступати тригером патологічних реакцій за умов автоімунного ураження нервової системи через активацію ММП.

Практична реалізація:

Надані матеріали будуть використані у медичному центрі ТОВ **«Медбуд-Клінік» (м.Київ)** для розробки рекомендацій з лікування пацієнтів з розсіяним склерозом, які перенесли COVID-19.

Головний лікар медичного центру
ТОВ «Медбуд-Клінік» *Дмитро* Донець

Україна • Товариство з обмеженою відповідальністю • «Медбуд-Клінік» • м. Київ • 01133 • ДЛЯ ДОВІДОК • ідентифікаційний код 42171

12.12.2024р