

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КАРБОВСЬКИЙ ВІТАЛІЙ ЛЕОНІДОВИЧ



УДК 577.112.7:612.115

СИСТЕМА ГЕМОСТАЗУ У ПОСТКОВІДНИЙ ПЕРІОД

03.00.04 - біохімія

Реферат
на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ-2026

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано самостійно. Експериментальна частина дисертації виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Король Леся Вікторівна,

Державна установа «Національний науковий центр хірургії та трансплантології імені О.О. Шалімова НАМН України»,
завідувач лабораторії біохімії;

доктор біологічних наук, старший дослідник

Корольова Дар'я Сергіївна,

Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України,
старший науковий співробітник відділу структури і функції
білка;

доктор біологічних наук, професор

Прилуцька Світлана Володимирівна,

Національний університет біоресурсів і природокористування
України, завідувач кафедри фізіології, біохімії рослин та
біоенергетики.

Захист відбудеться 24 червня 2026 р. о 14:00 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: вул. Володимирська 60, ауд. 202 головного корпусу із використанням засобів відеозв'язку в режимі реального часу за посиланням:

<https://knu->

[ua.zoom.us/j/89287331571?pwd=5IM491b4d2ZXLh3pwJX1yeFqydrIYa.1](https://knu-ua.zoom.us/j/89287331571?pwd=5IM491b4d2ZXLh3pwJX1yeFqydrIYa.1)

Ідентифікатор конференції: 892 8733 1571, Код доступу: 330271.

З дисертацією можна ознайомитися на офіційному сайті Науково-консультаційного центру <http://scc.knu.ua> та в Науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, к. 12.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 26.001.24



Наталія РАКША

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Пандемія COVID-19 не лише спричинила глобальну кризу охорони здоров'я, а й залишила по собі тривалі наслідки, які й дотепер позначаються на здоров'ї мільйонів людей по всьому світу (Chung, et al., 2024; Wang, et al., 2025). 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 (Davis, et al., 2023; Gheorghita, et al., 2024). 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 (Bohmwald, et al., 2024; Greenhalgh, et al., 2024). 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 порушеннями 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 (Wong, et al., 2021; Wilhelm, et al., 2025). 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 не лише за участю 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 (Charfeddine, et al., 2021; Roca-Fernández, et al., 2022). 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 пост-ковідний період» (№д/р 0122U001909, 2022-2024 рр.) та виконання завдань Перспективного плану розвитку наукового напрямку «Біологія та охорона здоров'я» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (№д/р 0121U112939, 2021-2025 рр.).

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 металопротейназ, 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-1 α , VEGF, NF- κ B, 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. Сформуванати 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 – система 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); функціональні 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 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 відображено 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 кuartилів (Q1 і Q2) та 2 статті у виданнях, віднесених до третього і четвертого кuartилів (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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

У дослідженні 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 дослідження. 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

дослідні групи донорів з різними значеннями титрів анти-SARS-CoV-2 IgG: 0 ($n = 20$); 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. 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; $n=56$). До контрольної групи увійшло 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 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 - від 45 до 68 років. Серед них було 12 чоловіків та 24 жінки. 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». 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 колінного суглоба, що відповідало 2 та 3 ступеням за KL. Таким чином, до першої дослідної групи (пацієнти з ОА) увійшли 14 осіб із ОА колінного суглоба. До другої дослідної групи (пацієнти з ОА, що перенесли COVID-19, $n=14$) були включені пацієнти зі 2 та 3 стадіями ОА, які перенесли COVID-19 легкої або середньої тяжкості приблизно 6–9 місяців до моменту дослідження. З дослідження були виключені особи з серцево-судинними та 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. Проведення досліджень було погоджено Комітетом з питань біоетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол №3 від 12 квітня 2022 року та протокол № 4 від 25 травня 2022 року).

Визначення активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ), тромбінового часу (ТЧ), протромбінового часу (ПЧ) зсідання плазми крові проводили використовуючи коагуляційний аналізатор Sysmex CS-2000i та, відповідно, реагенти Dade Actin, Dade Trombin, Dade Innovin (Siemens, Німеччина) згідно з інструкціями виробника. Антитромбін III з плазми крові отримували методом афінної хроматографії на гепарин-сефарозі (Hoffman, 1989). Фракцію вітамін К-залежних білків очищали з плазми крові шляхом сорбції на

сірчанокиислому бар'її (Hougie, et al., 1966) з подальшим аналізом методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 PG. 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). Фракцію середньомолекулярних метаболітів (СММ) одержували з плазми крові відповідно до методу (Мариненко, та ін., 2021). Аналіз пептидної складової у складі СММ проводили методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці Sephadex G15. 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). Процедура очищення з плазми крові комплексів антитіл класу G з білками системи гемостазу включала два етапи - афінну хроматографію на бензамідин-сефарозі (буфер посадки та відмивання незв'язаної фракції - 20 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містив 0,5 М NaCl, буфер елюції - 80 мМ гліцин-НСІ буфер, рН 3,0) з подальшим нанесенням зв'язаної фракції на протеїн А-сефарозу (буфер посадки та відмивання незв'язаної фракції - 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, буфер елюції - 0,1 М гліцин-НСІ буфер, рН 2,0). Для очищення комплексів антитіл з молекулами плазміненового походження використовували лізин-сефарозу (Grant, 1990). Елюцію здійснювали 0,05 М натрій-фосфатним буфером, рН 7,4, що містив 0,2 М ϵ -амінокапронову кислоту. Фракцію серинових протеїназ з плазми крові донорів отримували методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі (робочий буфер - 20 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містив 0,5 М NaCl, буфер елюції - 80 мМ гліцин-НСІ буфер, рН 3,0). Концентрацію розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) визначали за офенантроліновим тестом (Katrii, et al., 2017). Потенційну активність протромбіну оцінювали за здатністю тромбіну, розщеплювати специфічний хромогенний субстрат S₂₂₃₈ після попередньої інкубації проб з екамуліном. Визначення концентрації D-димеру у плазмі крові здійснювали за допомогою імунохемілюмінесцентного аналізатора Maglumi 1000 (Snibe Diagnostic, Китай). Інгібіторний потенціал антитромбіну ІІ оцінювали за залишковою активністю тромбіну з використанням специфічного хромогенного субстрату S₂₂₃₈, тоді як інгібіторний потенціал α_2 -антиплазміну визначали за залишковою активністю плазміну з використанням специфічного хромогенного субстрату S₂₂₅₁ (Korolova et al., 2023). Для визначення активності тканинного активатора плазміненогену (ТАП) використовували модельну систему, що містила плазміненоген та еуглобулінову фракцію. Після активації плазміненогену полі-D-лізином активність ТАП оцінювали за допомогою хромогенного субстрату S₂₂₅₁. Інгібіторний потенціал α_2 -антиплазміну, α_2 -макроглобуліну та α_1 -антитрипсину розраховували згідно методу (Kravchenko, et al., 2018) використовуючи відповідно як субстрат S₂₂₅₁ та N α -benzoyl-L-Arg-pNA. Активність протеїну С визначали за допомогою специфічного для цього фактору хромогенного субстрату S₂₃₆₆. Вміст матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ММП-10), тканинного інгібітору металопротеїнази-1 (TIMP-1), інтерлейкінів (IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-12 β , TNF- α , IL-4, IL-10), транскрипційних факторів HIF-1 α та NF- κ B,

ростових факторів VEGF, FGF-2, PDGF, шаперонів HSP-60, HSP-70 та білків системи гемостазу (протеїну С, тромбомодуліну, плазміногену, ПАІ-1, ТАП та молекул протромбінового пулу) визначали імуноферментним методом згідно стандартного протоколу, використовуючи відповідні первинні антитіла виробництва «Santa Cruz Biotechnology, Inc» (США) та вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою (Sigma-Aldrich, США). Концентрацію креатиніну, сечовини, ЛПВЩ, ЛПНЩ, тригліцеридів, загального холестеролу, а також активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, гамма-глутамілтранспептидази та лужної фосфатази в сироватці крові визначали за допомогою біохімічного аналізатора Microlab 300 використовуючи комерційні діагностичні набори фірми PLIVA-Lachema Diagnostika (Чехія). Визначення молекулярної маси білків проводили методом диск-електрофорезу у поліакріламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію відповідно до (Weber et al., 1969). Залежно від конкретних задач дослідження електрофорез проводили у пластинках 6%, 8% чи 10% поліакріламідного гелю. Для проведення електрофорезу за відновлювальних умов до проби попередньо кип'ятили з 5% β -меркаптоетанолом. 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). Ензим-електрофорез проводили відповідно до методу (Ostapchenko et al., 2011). 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. Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.04. Для оцінки присутності у складі очищених комплексів антитіл та молекул плазміногенового походження було використано метод вестерн-блоту, який проводили відповідно до стандартного протоколу. Перенесення білків на нітроцелюлозну мембрану здійснювали методом напівсухого електротрансферу. Як первинні антитіла використовували поліклональні антитіла проти плазміногену та протромбіну, як вторинні антитіла – козячі антикролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому. Для визначення присутності у складі комплексів антитіл було використано козячі антитіла проти людських імуноглобулінів класу G, кон'юговані з пероксидазою хрому. Для візуалізації результатів як субстрат використовували 3,3'-діамінобензидин. Загальну протеолітичну активність визначали відповідно до методу (Munilla-Moran et al., 1989) використовуючи казеїн як субстрат. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда (1976). Статистичну обробку 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 ($M \pm SD$). 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 кожен 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 $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Стан системи зсідання крові у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-COV-2 у постковідний період. На сьогодні доведено, що гостра фаза COVID-19 супроводжується глибокими порушеннями системи гемостазу на всіх її рівнях, що асоціюється з високим ризиком тромботичних ускладнень і летальних наслідків. Водночас стан системи гемостазу в постковідному періоді залишається недостатньо вивченим. Разом з тим, сучасні дані свідчать про збереження стійких порушень коагуляції у віддалені терміни після перенесеного ковіду. Особливе занепокоєння викликає той факт, що зазначені зміни виявляються не лише після тяжкого перебігу захворювання, але й у осіб із легкими та помірними формами COVID-19, що обґрунтовує необхідність лабораторного моніторингу та пошуку механізмів персистенції гемостатичних порушень.

Спочатку було оцінено загальний функціональний стан системи гемостазу з використанням хронометричних коагуляційних тестів - АЧТЧ, ПЧ та ТЧ, які характеризують відповідно внутрішній, зовнішній шляхи згортання крові, а також заключний етап згортання крові, а саме час, необхідний для перетворення фібриногену на нерозчинний фібрин (рис. 1). Нами не було виявлено суттєвих відхилень показників часу згортання плазми крові у хронометричних тестах, що свідчить про відсутність виражених порушень у функціонуванні системи гемостазу. Водночас незначне подовження часу зсідання крові у тесті ПЧ у донорів з титром антитіл 10 ± 3 , Індекс (S/C), 55 ± 5 , Індекс (S/C) та 75 ± 5 , Індекс (S/C), вказує на помірне ізольоване порушення зовнішнього шляху коагуляції, яке за виключенням донорів з титром антитіл 10 ± 3 , Індекс (S/C) не впливало на фінальну стадію утворення фібринових згустків.

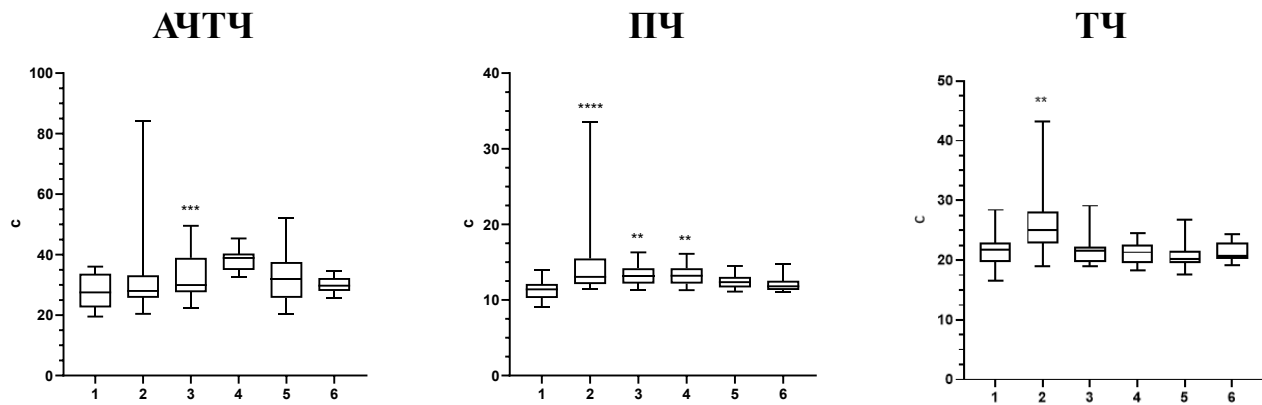


Рис. 1. Час зсідання плазми крові у хронометричних тестах «Активованій частково тромбопластиновий час» (АЧТЧ), «Протромбіновий час» (ПЧ) та «Тромбіновий час» (ТЧ) у донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 75 ± 5 ; 5 – 125 ± 5 ; 6 – 150 ± 5
 **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$ - відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Враховуючи важливу роль фібриногену як одного з ключових білків системи гемостазу, що забезпечує реалізацію завершальних етапів коагуляційного каскаду, надалі було досліджено його концентрацію у плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG.

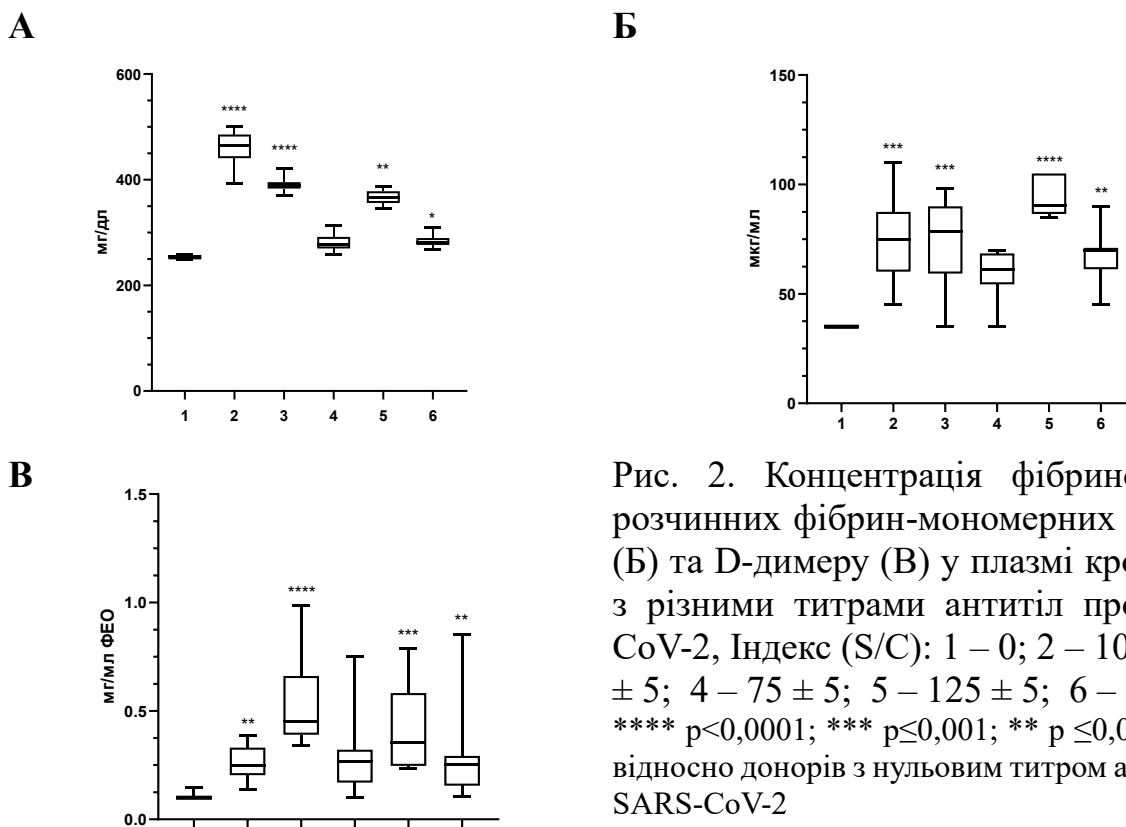


Рис. 2. Концентрація фібриногену (А), розчинних фібрин-мономерних комплексів (Б) та D-димеру (Б) у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 75 ± 5 ; 5 – 125 ± 5 ; 6 – 150 ± 5
 **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$ - відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Згідно ¹ отриманих ² результатів (рис. 2А), спостерігалось зростання концентрації фібриногену у плазмі крові донорів за виключенням донорів з титром

анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 , Індекс (S/C) та 150 ± 5 , Індекс (S/C), де концентрація фібриногену була на рівні значень групи донорів з нульовим титром антитіл. Підвищення концентрації фібриногену з одного боку є чинником, що може сприяти активації коагуляційного каскаду, з іншого - фібриноген є активним учасником запальної відповіді, що відіграє ключову роль у патогенезі багатьох захворювань - від атеросклерозу та інсульту до ревматоїдного артриту й постковідного синдрому. Зростання концентрації РФМК у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 (рис. 2Б) є свідченням активації процесу перетворення розчинного фібриногену у нерозчинний фібриновий згусток і, відповідно, може розглядатися як прямий маркер підвищеного ризику тромбоутворення у віддалені терміни після перенесеної COVID-19-інфекції. Також було проаналізовано концентрацію D-димеру та встановлено її підвищення у всіх групах донорів (рис. 2В), що свідчить про активацію процесів коагуляції з подальшим утворенням і лізисом фібрину, що є маркером інтенсифікації внутрішньосудинного тромбоутворення та вторинного фібринолізу.

З огляду на те, що до складу фракції РФМК можуть входити молекули, потенційно здатні впливати на функціональну активність окремих факторів системи гемостазу, детальний аналіз цієї фракції може сприяти розкриттю механізмів розвитку та персистенції гемостатичних порушень. Тому надалі фракцію РФМК було проаналізовано методом хроматографії, що поділяє за розмірами.

Таблиця 1

Склад фракцій РФМК, що отримані 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	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
	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

Показано, що із зростанням титру антитіл у фракції РФМК з'являються фрагменти вищої молекулярної маси та зростає відносний вміст (оцінений за

площею під піками) високомолекулярних білків (табл. 1). Такі зміни можуть свідчити як про посилення процесу полімеризації фібриногену у фібрин, так і бути наслідком утворення комплексів між РФМК та іншими білками. Таким чином, отримані результати свідчать, що в осіб, які перенесли COVID-19, зберігається активаційна напруга у системі гемостазу, що обумовлює підвищену схильність до тромбоутворення. У зв'язку з цим на наступному етапі було проаналізовано рівень молекул протромбінового походження та потенційну активність протромбіну. Виявлене нами зниження рівня у плазмі крові донорів більшості дослідних груп (рис. 3А) може бути результатом їх посиленого перетворення у тромбін.

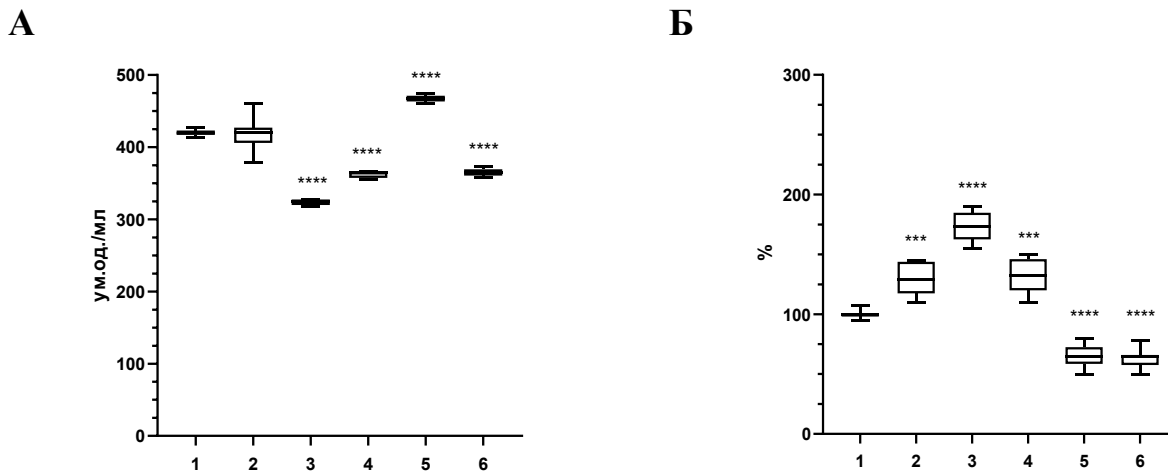


Рис. 3. Рівень молекул протромбінового походження (А) та потенційна активність протромбіну (Б) у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 75 ± 5 ; 5 – 125 ± 5 ; 6 – 150 ± 5

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

Водночас зростання потенційної активності протромбіну (рис. 3Б) свідчить про наявність у кровотоці донорів із титрами антитіл 10 ± 3 , Індекс (S/C), 55 ± 5 , Індекс (S/C) та 75 ± 5 , Індекс (S/C) достатньої кількості протромбіну та молекул протромбінового походження, здатних набувати каталітичної активності, тоді як у донорів із титрами 125 ± 5 , Індекс (S/C) та 150 ± 5 , Індекс (S/C) значна частка цих молекул, ймовірно, є функціонально неактивною.

Проведені дослідження виявили, що збереження прокоагуляційної спрямованості у системі гемостазу у постковідний період частково зумовлене порушенням механізмів регуляції активності факторів згортання крові. Зокрема, це проявляється зниженням концентрації та інгібіторного потенціалу антитромбіну III (рис. 4), виявлене нами у всіх групах донорів, за винятком осіб із титром антитіл 150 ± 5 , Індекс (S/C).

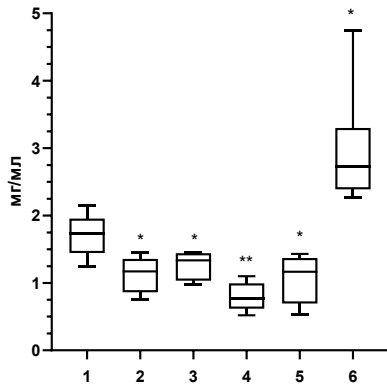
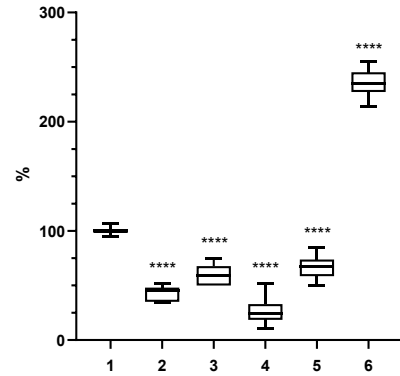
А**Б**

Рис. 4. Концентрація антитромбіну III (А) та інгібіторний потенціал антитромбіну III (Б) 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
 **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$ - відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Один з механізмів підтримання рівноваги у системі гемостазу реалізується за участі системи протеїну С, тому надалі було проаналізовано рівень та активність протеїну С у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Отримані результати виявили зниження рівня протеїну С у плазмі крові донорів всіх дослідних груп, за винятком групи з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 , Індекс (S/C), а також на підвищення його відносної активності у всіх групах, окрім донорів із титром 150 ± 5 , Індекс (S/C) (рис. 5).

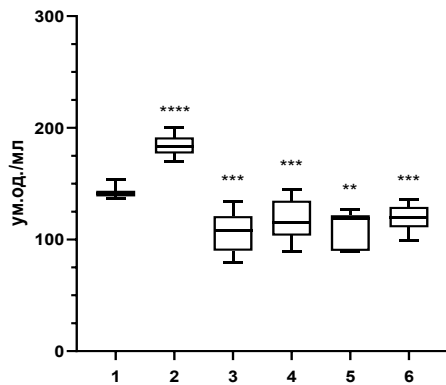
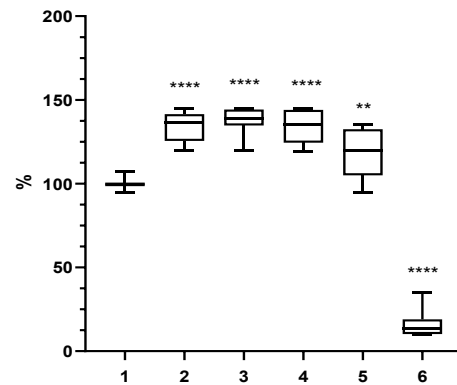
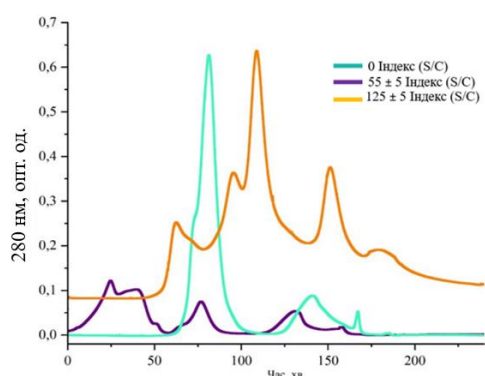
А**Б**

Рис. 5. Рівень протеїну С (А) та його відносна активність (Б) 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
 **** $p < 0,0001$; *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p < 0,05$ - відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Слід зазначити, що певна невідповідність між рівнем протеїну С та його відотною активністю може опосередковано свідчити про порушення регуляторних механізмів у системі протеїну С або бути наслідком структурних модифікацій молекули протеїну С, які впливають на його функціональну

активність. Зниження концентрації протеїну С може бути зумовлене як швидким споживанням цього фактору у відповідь на активацію коагуляції, так і порушенням процесів його синтезу.

Оскільки протромбін і протеїн С належать до вітамінів К-залежних білків, надалі було проаналізовано склад фракцій вітамінів К-залежних білків, очищених із плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Такі дослідження можуть сприяти кращому розумінню механізмів порушень у функціонуванні окремих ланок системи гемостазу у постковідний період. Зазначимо, що на рис. 6 наведено хроматограми розділення фракцій вітамінів К-залежних білків, отриманих з плазми крові донорів з найнижчим та найвищим вмістом молекул протромбінового походження (55 ± 5 , Індекс (S/C) та 125 ± 5 , Індекс (S/C)). Хроматографічний профіль фракцій вітамінів К-залежних білків у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 характеризувався зміною розподілу білків за молекулярною масою та суттєвим зростанням площ окремих піків, що вказує на зростання відносного рівня білків відповідної молекулярної маси.



Групи донорів, Індекс (S/C)	К-ть піків	Площа під піками, ум.од	Молекулярна маса, кДа
0	1	6,69	112
	2	0,58	70
	3	0,01	54
55 ± 5	1	3,45	103
	2	1,75	84
	3	3,76	60
	4	7,02	42
125 ± 5	1	7,78	80
	2	4,76	73
	3	1,84	65
	4	1,93	45

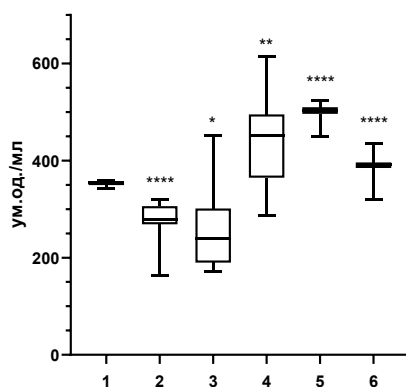
Рис. 6. Хроматограми розділення фракцій вітамінів К-залежних білків, отриманих з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2

З огляду на те, що значна частка вітамінів К-залежних білків представлена протромбіном зростання рівня білків з молекулярною масою 42–80 кДа може опосередковано вказувати на посилення процесів перетворення протромбіну у активну форму. Такий висновок добре узгоджується із загальною тенденцією до активації коагуляційних процесів, виявленою у донорів, які перенесли COVID-19.

Важливою складовою збереження балансу між процесами зсідання крові та тромбоутворенням є система фібринолізу, основною функцією якої є підтримання прохідності судинного русла. Ключову роль у реалізації цього процесу відіграє плазмін, який забезпечує деградацію фібринових згустків, тому на наступному етапі дослідження було проаналізовано вміст плазміногену та його потенційну

активність. Як видно з рис. 7, зниження рівня плазміногену спостерігалось лише у плазмі крові донорів із титрами антитіл 10 ± 3 , Індекс (S/C) та 55 ± 5 , Індекс (S/C), тоді як у решті груп донорів було виявлено його підвищення рівня плазміногену. Водночас у всіх досліджуваних групах донорів із анти-SARS-CoV-2 IgG спостерігалось зростання потенційної активності плазміногену, що свідчить про наявність у кровотоці пулу молекул плазміногену та/або його деградованих форм, здатних за певних умов перетворюватися на активні ферменти. З одного боку, такі результати можуть вказувати на збереження потенціалу системи фібринолізу, однак з іншого - активація деградованих форм плазміногену, які зберегли активний центр, може сприяти розвитку ускладнень, обумовлених надмірною активністю плазміну.

А



Б

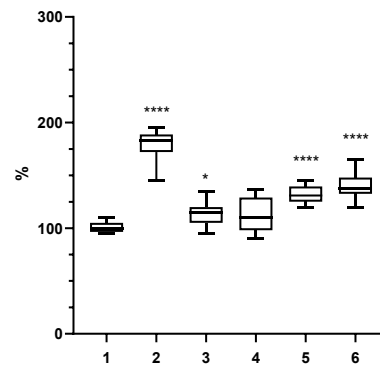


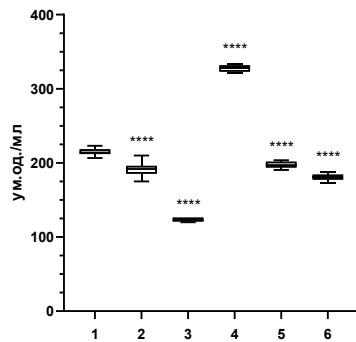
Рис. 7. Рівень плазміногену (А) та його потенційна активність (Б) у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 75 ± 5 ; 5 – 125 ± 5 ; 6 – 150 ± 5

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

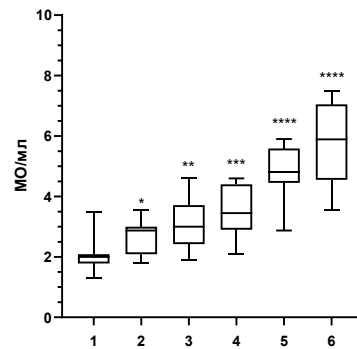
Відомо, що контроль активності фібринолізу здійснюється як на рівні регуляції вмісту плазміногену, так і шляхом інгібування активного плазміну. Тому на наступному етапі роботи було проаналізовано вміст і активність ключових регуляторів системи фібринолізу. Встановлено зниження рівня ТАП у плазмі крові всіх груп донорів, за винятком осіб із титром антитіл 75 ± 5 , Індекс (S/C) (рис. 8А), що відбувалося на тлі незначного підвищення рівня ПАІ-1 (рис. 8Б).

У цілому, підвищення рівня ПАІ-1 у поєднанні зі зниженням рівня ТАП сприяє пригніченню фібринолітичного потенціалу, оскільки за таких умов істотно обмежується можливість активації плазміногену у плазмі. Це може бути критичним для осіб із зниженим рівнем плазміногену, у яких ефективність лізису фібринових згустків буде додатково погіршуватись. Водночас, виявлена невідповідність між рівнем та активністю ТАП може бути зумовлена присутністю у кровотоці атипових білкових структур, здатних впливати на його функціональну активність.

А



Б



В

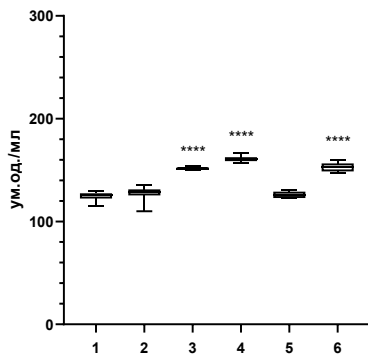


Рис. 8. Рівень ТАП (А), активність ТАП (Б) та рівень ПАІ-1 (В) у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 75 ± 5 ; 5 – 125 ± 5 ; 6 – 150 ± 5

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

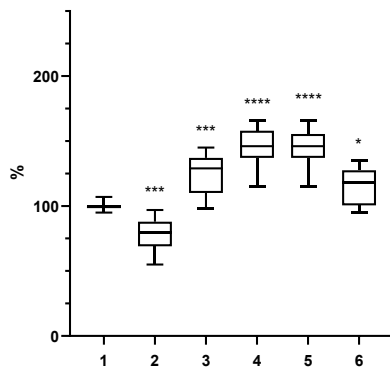
Зважаючи на те, що ефективність фібринолізу визначається не лише рівнем та активністю плазміногену та його регуляторів, але й дією інгібіторів, які діють безпосередньо на плазмін, нами було проаналізовано інгібіторний потенціал основних фізіологічних інгібіторів плазміну - α_2 -антиплазміну, α_2 -макроглобуліну (Б), α_1 -антитрипсину.

Як видно з рис. 9А, відносний інгібіторний потенціал α_2 -антиплазміну був підвищений у плазмі крові всіх груп донорів, за винятком осіб із титром антитіл 10 ± 3 , Індекс (S/C). З огляду на те, що α_2 -антиплазмін є швидким і високоспецифічним інгібітором плазміну, це створює умови для інгібування активності плазміну, а відтак, пригніченню фібринолізу. Додатковим чинником зниження у постковідний період активності фібринолізу може бути підвищення інгібіторного потенціалу α_2 -макроглобуліну (рис. 9Б) виявлене в усіх групах донорів із титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Згідно отриманих результатів, пригнічення фібринолізу частково відбувається із залученням неспецифічних механізмів, зокрема за участі α_1 -антитрипсину (рис. 9В), – у більшості донорів, за виключенням донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 10 ± 3 , Індекс (S/C) та 125 ± 5 , Індекс (S/C), було виявлено підвищення інгібіторного потенціалу α_1 -антитрипсину.

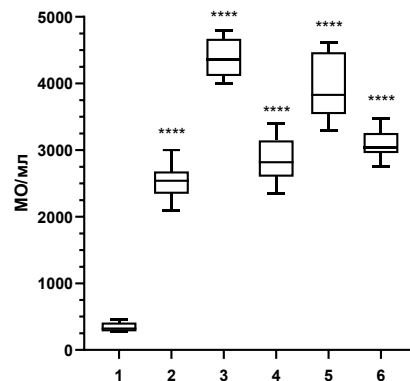
Узагальнюючи отримані результати, можемо зробити висновок, що постковідний період супроводжується збереженням дисбалансу у системі гемостазу, який характеризується посиленням коагуляції на тлі зниження активності фібринолізу. При цьому зниження фібринолітичної активності, ймовірно, зумовлене не стільки дефіцитом плазміногену, скільки порушенням

механізмів регуляції його функціонування - як на етапі активації проферменту, так і внаслідок залучення механізмів інгібування активного плазміну.

А



Б



В

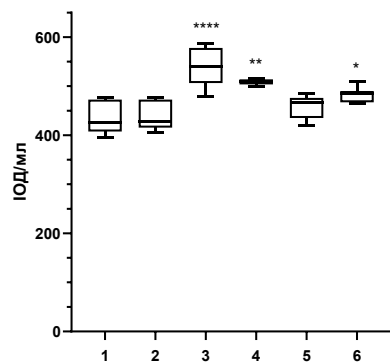


Рис. 9. Інгібіторний потенціал α_2 -антиплазміну (А), α_2 -макроглобуліну (Б), α_1 -антитрипсину (В) у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 75 ± 5 ; 5 – 125 ± 5 ; 6 – 150 ± 5

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

Оскільки фібриноліз і, частково коагуляція, є складовими ширшої мережі протеолітичних процесів організму, порушення протеолітичного гомеостазу потенційно може впливати на активність факторів системи гемостазу та бути одним із механізмів підтримання гемостатичних порушень у постковідний період. У зв'язку з цим наступний етап роботи було присвячено дослідженню вмісту та активності деяких протеолітичних ферментів у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Насамперед було проаналізовано вміст окремих ММП, як важливих ефекторів процесів протеолізу та ремоделювання тканин. Узагальнюючи отримані результати (рис. 10) можемо зробити висновок про активацію у постковідний період протеолізу, опосередкованого ММП, зокрема ММП-1, ММП-2 та ММП-9, 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 певні особливості: для одних ММП спостерігалось зростання вмісту у всіх досліджуваних групах донорів, тоді як вміст інших ММП змінювався залежно від титру антитіл проти SARS-CoV-2 - підвищуючись або знижуючись у різних групах донорів.

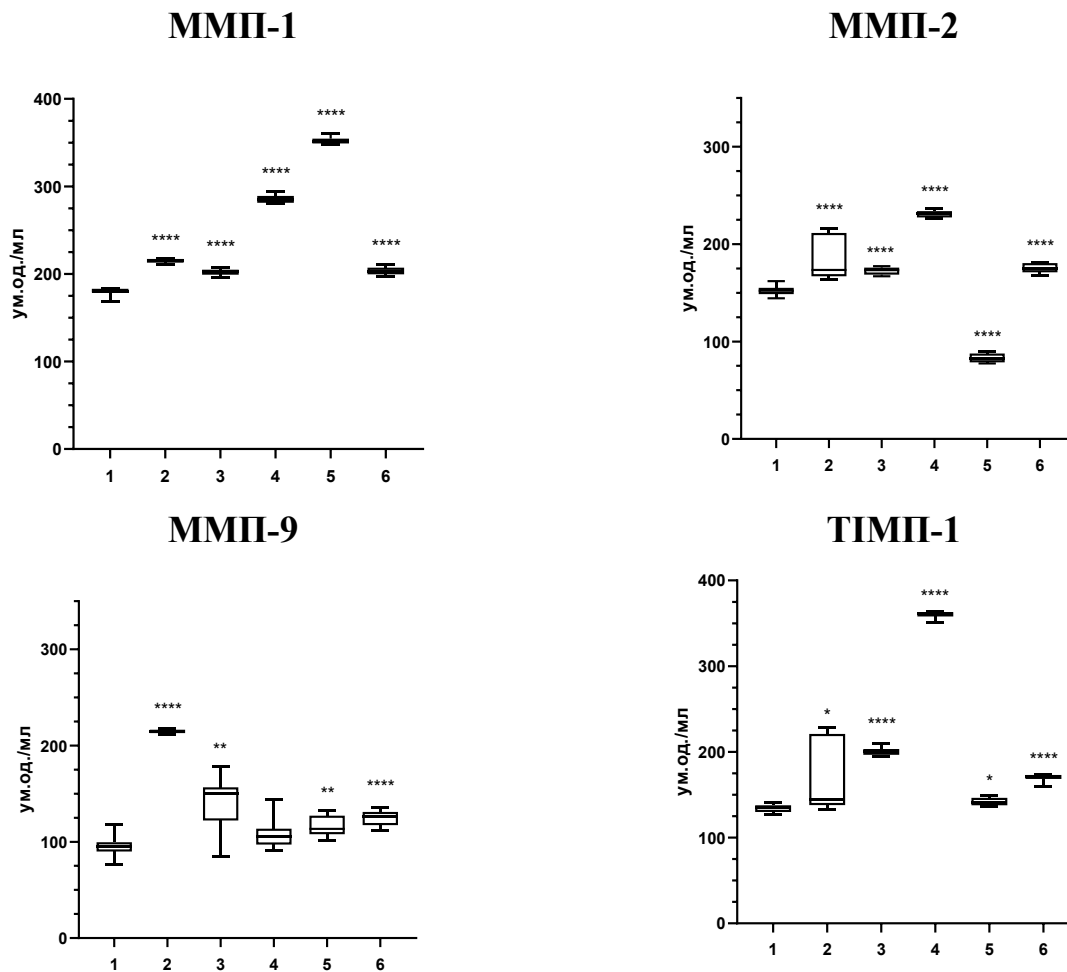


Рис. 10. Рівень окремих ММП та ТІМР-1 у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 75 ± 5 ; 5 – 125 ± 5 ; 6 – 150 ± 5

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

Зміни вмісту ферментів не завжди супроводжуються відповідними змінами їх активності, що може бути зумовлено наявністю неактивних форм, дією специфічних інгібіторів або посттрансляційними модифікаціями, які впливають на прояв активності. Тому надалі було проаналізовано вміст ТІМР-1, який є ключовим фізіологічним інгібітором цих ферментів. Виявлене зростання вмісту ТІМР-1 у плазмі крові донорів усіх груп (рис. 10) можна розглядати як компенсаторний механізм, спрямований на обмеження надмірного протеолізу. Водночас дисбаланс між рівнями ММП та ТІМР-1 свідчить про можливе порушення регуляції протеолітичної активності у постковідний період.

Також зразки плазми крові донорів було проаналізовано методом ензим-електрофорезу з використанням желатину як субстрату, що дозволило виявити активні форми ферментів та встановити їх приблизну молекулярну масу. Отримані результати (табл. 2) свідчать, що у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 присутні активних форм ферментів з молекулярною масою 72

і 92 кДа, які, згідно з даними літератури, відповідають молекулярній масі ММП-2 (72 кДа) та ММП-9 (92 кДа).

Таблиця 2

Молекулярна маса активних ферментів, що присутні у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 (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	+	+	-

З огляду на багатофункціональну роль ММП, їх активація може сприяти підтриманню хронічного запалення, порушенню репаративних процесів, дисфункції ендотелію та, відповідно до існуючих уявлень, модулювати активність ключових факторів системи гемостазу (Shapiro, et al., 2000; Orbe, et al., 2011). Продукти деградації, що при цьому утворюються, здатні ініціювати каскади патологічних реакцій посилюючи вираженість постковідних ускладнень.

Беручи до уваги, що більшість протеолітичних ферментів у плазмі крові належить до серинових протеїназ, надалі було проаналізовано їх концентрацію у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 (рис. 11).

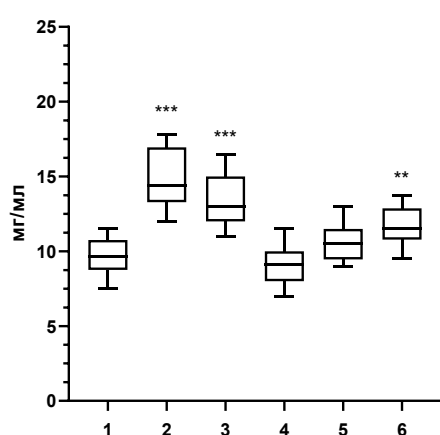


Рис. 11. Концентрація серинових протеїназ у плазмі крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 55 ± 5; 4 – 75 ± 5; 5 – 125 ± 5; 6 – 150 ± 5

*** $p \leq 0,001$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2; ** $p \leq 0,01$ відносно донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2

Варто зазначити, що фракцію серинових протеїназ отримували методом хроматографії на бензамідин-сефарозі, тому до її складу окрім ферментів з відкритою конформацією активного центру можуть входити деградовані форми плазміногену (зокрема міні-плазміноген і легкий ланцюг плазміну) та/або комплекси плазміногену чи його деградованих форм, які зберегли п'ятий крингл. Аналіз очищених фракцій методом ензим-електрофорезу показав, що молекулярна

маса переважної більшості активних ферментів перевищує 100 кДа. Водночас лише у донорів із титром антитіл проти SARS-CoV-2 125 ± 5 Індекс (S/C) було виявлено додаткову зону гідролізу, що відповідала білкам із молекулярною масою близько 23 кДа.

Таблиця 3

Молекулярна маса та відносний вміст ферментів у складі фракцій серинових протеїназ (за результатами ензим-електрофорезу з використанням желатину як субстрату)

Групи донорів	К-ть зон гідролізу	Молекулярна маса, кДа	Відносний вміст, %
0 Індекс (S/C)	1	104	37,60
	2	101	25,96
	3	100	36,43
	4	-	-
10 ± 3 Індекс (S/C)	1	114	38,91
	2	106	61,09
	3	113	45,00
	4	106	55,00
	5	113	69,29
	6	106	30,71
55 ± 5 Індекс (S/C)	1	113	58,33
	2	107	41,67
	3	113	46,27
	4	106	53,73
	5	112	51,26
	6	106	48,74
75 ± 5 Індекс (S/C)	1	114	21,98
	2	109	16,77
	3	23	61,24
	4	-	-
	5	-	-
125 ± 5 Індекс (S/C)	1	115	48,76
	2	108	51,24
	3	-	-
	4	-	-
	5	-	-

Проаналізувавши отримані результати, можемо зробити висновок, що зміни у функціонуванні окремих факторів системи гемостазу, які є функціонально взаємопов'язаними в межах інтегрованої відповіді організму, не супроводжуються очікуваними причинно-наслідковими зв'язками. Ми припускаємо, що частково це може бути обумовлено наявністю у кровотоці 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. Присутність у складі фракції серинових протеїназ білків з молекулярною масою понад 250 кДа (дані

наведено у дисертаційній роботі) та протеолітична активність, виявлена у зонах, що відповідають білкам з молекулярною масою понад 100 кДа, наштовхнули нас на думку, що таким провокуючим чинником можуть бути нетипові білкові комплекси, що зберігаються у кров'яному руслі протягом тривалого часу після перенесеної інфекції. За нашим припущенням це можуть бути комплекси антитіл з протеолітичними ферментами, у тому числі й плазміногеном та/чи його деградованими формами. Тому на наступному етапі роботи ми зосередились на очищенні з плазми крові донорів таких комплексів та їх первинній характеристиці. Оскільки основними ферментами у плазмі крові є серинові протеїнази, на першому етапі очищення було використано бензамідин-сефарозу – носій, який дозволяє вилучати саме серинові протеїнази. Порівняння білкових профілів зв'язаних фракцій, отриманих після нанесення зразків плазми крові на бензамідин-сефарозу, методом електрофорезу за невідновлювальних та відновлювальних умов (рис. 12) свідчить про присутність у складі очищених 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 150 кДа.

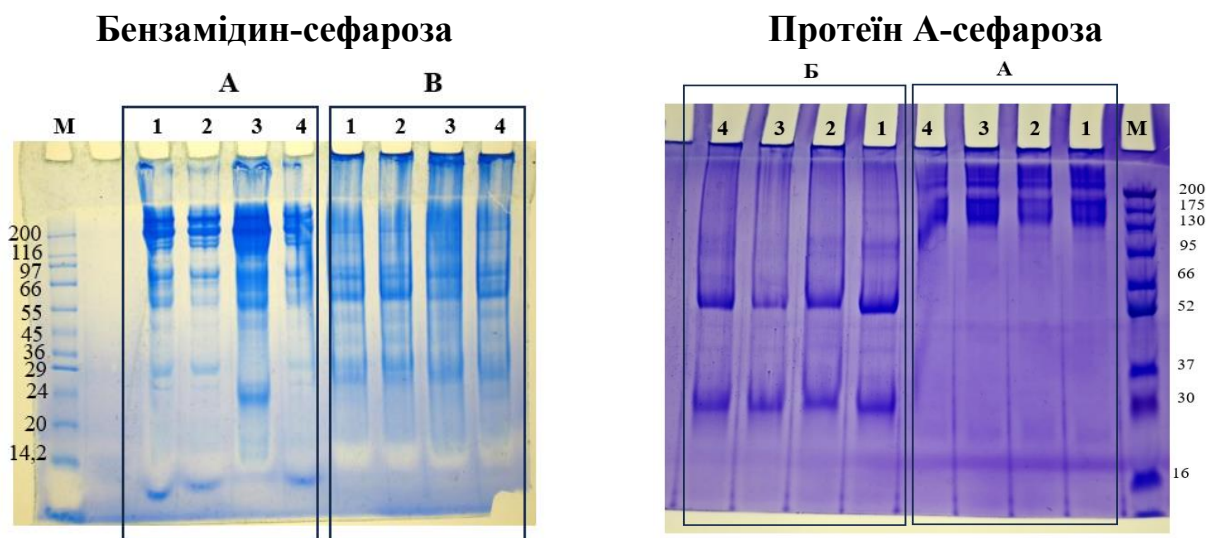


Рис. 12. Електрофореграми (А – електрофорез за невідновлювальних умов; Б – електрофорез за відновлювальних умов) зв'язаних фракцій, очищених з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2, Індекс (S/C): М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 75 ± 5 ; 4 – 150 ± 5

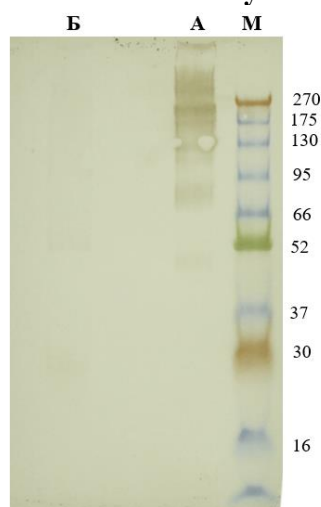
На наступному етапі фракції після бензамідин-сефарози наносили на протеїн А-сефарозу, що дозволило відділити комплекси, другим компонентом яких є антитіла. Як бачимо, при аналізі отриманих фракцій методом електрофорезу за відновлювальних умов (рис. 12) значна частина білкових смуг, що відповідають високомолекулярним білкам, зникала. 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. Зазначимо, що оскільки в обох випадках елюцію зв'язаного матеріалу проводили за умов, що

унеможлиблюють утримання на наосієві молекул за рахунок нековалентних взаємодій (присутність у буфері 0,5 М NaCl у випадку елюції матеріалу з бензамідин-сефарози та буфер зі значенням рН 2,0 при елюції матеріалу з протеїн А-сефарози), такі результати слугують непрямим доказом на користь ковалентної природи білок-білкових взаємодій між складовими комплексу. За результатами 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.

Надалі очищені комплекси було проаналізовано методом вестерн блоту з використанням антитіл до плазміногену та антитіл проти людських IgG. Так як картина розподілу білкових смуг під час електрофорезу була типовою для всіх груп донорів, методом вестерн блоту було проаналізовано лише фракцію, отриману з плазми крові донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 , Індекс (S/C). Результати, отримані з використанням антитіл до плазміногену, доводять, що до складу очищених комплексів входять молекули плазміногенового походження (рис. 13). Той факт, що молекулярна маса білкових смуг, ідентифікованих за допомогою антитіл проти плазміногену, є вищою 110 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.

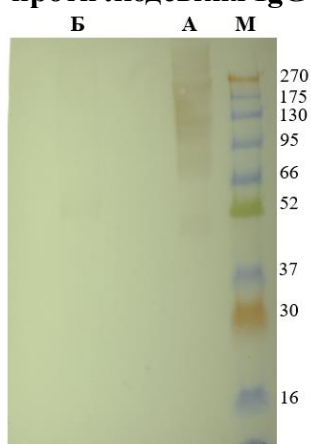
Аналіз проб після обробки β -меркаптоетанолом дозволяє зробити декілька висновків. По-перше, у частині комплексів взаємодія між антитілами та плазміногеном та/чи його деградованими формами відбувається за рахунок дисульфідних зв'язків, про що свідчить поява низки смуг (27 кДа, 50 кДа, 60 кДа, 97 кДа), які не спостерігалися при аналізі за невідновлювальних умов. По-друге, присутність на блотограмі смуг, що відповідають високомолекулярним білкам, навіть після обробки проб β -меркаптоетанолом вказує на те, що у частині комплексів взаємодія між білками відбувається за рахунок інших ковалентних взаємодій. Використання антитіл проти людських IgG дозволило встановити, що іншим білком у складі комплексів є саме антитіла.

Ідентифікація з використанням антитіл до плазміногену



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	-	-

Ідентифікація з використанням антитіл проти людських IgG



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. 13. Блотограми фракції, елюйованої з протеїн А-сефарози: М – маркери молекулярної маси (кДа); А – проба за невідновлювальних умов; Б – проба за відновлювальних умов

Використовуючи метод імуноферментного аналізу було визначено рівень молекул плазміногенового походження та рівень антитіл у складі очищених комплексів. Як бачимо, рівень молекул плазміногенового походження у складі комплексів різнився у залежності від титру антитіл проти SARS-CoV-2 і був найнижчим у донорів з нульовим титром антитіл (табл. 4). Зазначимо, що включення молекул плазміногенового походження до складу комплексів може впливати на загальну концентрацію у кровотоці функціонального плазміногену і, відповідно, на фібринолітичний потенціал. Використання антитіл проти людських IgG також виявило суттєво нижчий вміст антитіл у складі комплексів у донорів з нульовим титром антитіл проти SARS-CoV-2 у порівнянні з рештою дослідних груп.

Рівень молекул плазміногенового походження та рівень антитіл у складі комплексів, очищених з плазми крові донорів з різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2 ($M \pm m$)

Групи донорів, Індекс (S/C)	За використання антитіл до плазміногену	За використання антитіл проти людських IgG
	ум. од/мг білка	
0	0,004±0,0002	0,135±0,0023
10 ± 3	0,233±0,012*	1,156±0,0589*
75 ± 5	0,142±0,0068*	1,146±0,0400*
150 ± 5	0,159±0,0072*	1,250±0,0380*

Отже, отримані результати свідчать, що частина комплексів містить у своєму складі молекули плазміногенового походження. Ще одним підтвердженням цього факту слугують результати трьох стадійного хроматографічного очищення з послідовним нанесенням проби спочатку на бензамідин-сефарозу, далі на протеїн А-сефарозу і на лізин-сефарозу – специфічний носій, який використовують для очищення плазміногену та плазміну.

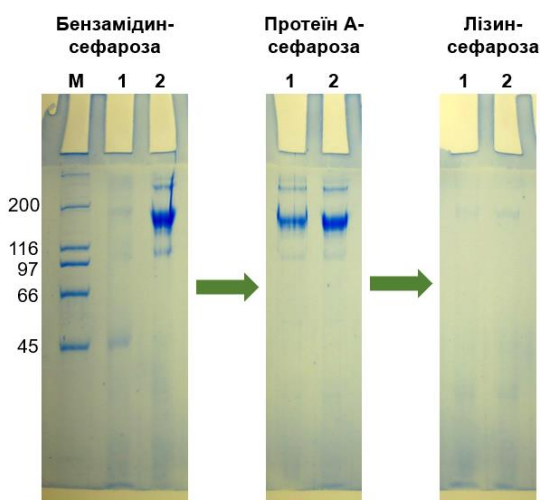


Рис. 14. Електрофореграми фракцій, очищених з плазми крові донорів з титром антитіл проти SARS-CoV-2 75 ± 5 , Індекс (S/C): М – маркери молекулярної маси; 1 – незв'язана фракція; 2 – зв'язана фракція

Як бачимо з рис. 14, фракція, отримана на лізин-сефарозі, містила декілька білкових смуг – смуга, що відповідає білкам з молекулярною масою близько 160-170 кДа може бути комплексом антитіл з фрагментами плазміногену, що мають молекулярну масу 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.

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 та/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, α_1 -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}) (рис. 15). У цілому, наявність спонтанної активності є несприятливим фактором, адже свідчить про існування постійної загрози, оскільки серед пулу комплексів антитіл із білками, присутніх у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, виявляються й комплекси, що містять каталітично активні молекули плазміногенового походження, здатні розщеплювати певний спектр білкових субстратів. Хоча їх активність та спорідненість до субстратів можуть бути нижчими порівняно з повноцінною молекулою плазміну, тривала присутність таких активних молекул в організмі може бути одним із чинників формування та підтримання патогенетичного фону, характерного для постковідного синдрому.

Результати, отримані після інкубації зразків із стрептокіназою (рис. 15), ще раз підтверджують, що до складу комплексів входять плазміноген та/чи його деградовані форми, які містять латентний каталітичний домен і потенційно здатні виявляти ферментативну активність. Така активність може лишатися не проявленою, або може бути реалізованою за певних умов, що є неконтрольованим чинником, а відтак, становить суттєву загрозу, адже субстратом можуть слугувати 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.

Незважаючи на високу інформативність, хромогенні субстрати повною мірою не відтворюють просторово-конформаційні особливості природних субстратів, тому для більш детальної характеристики очищених комплексів як субстратний білок було використано фібриноген.

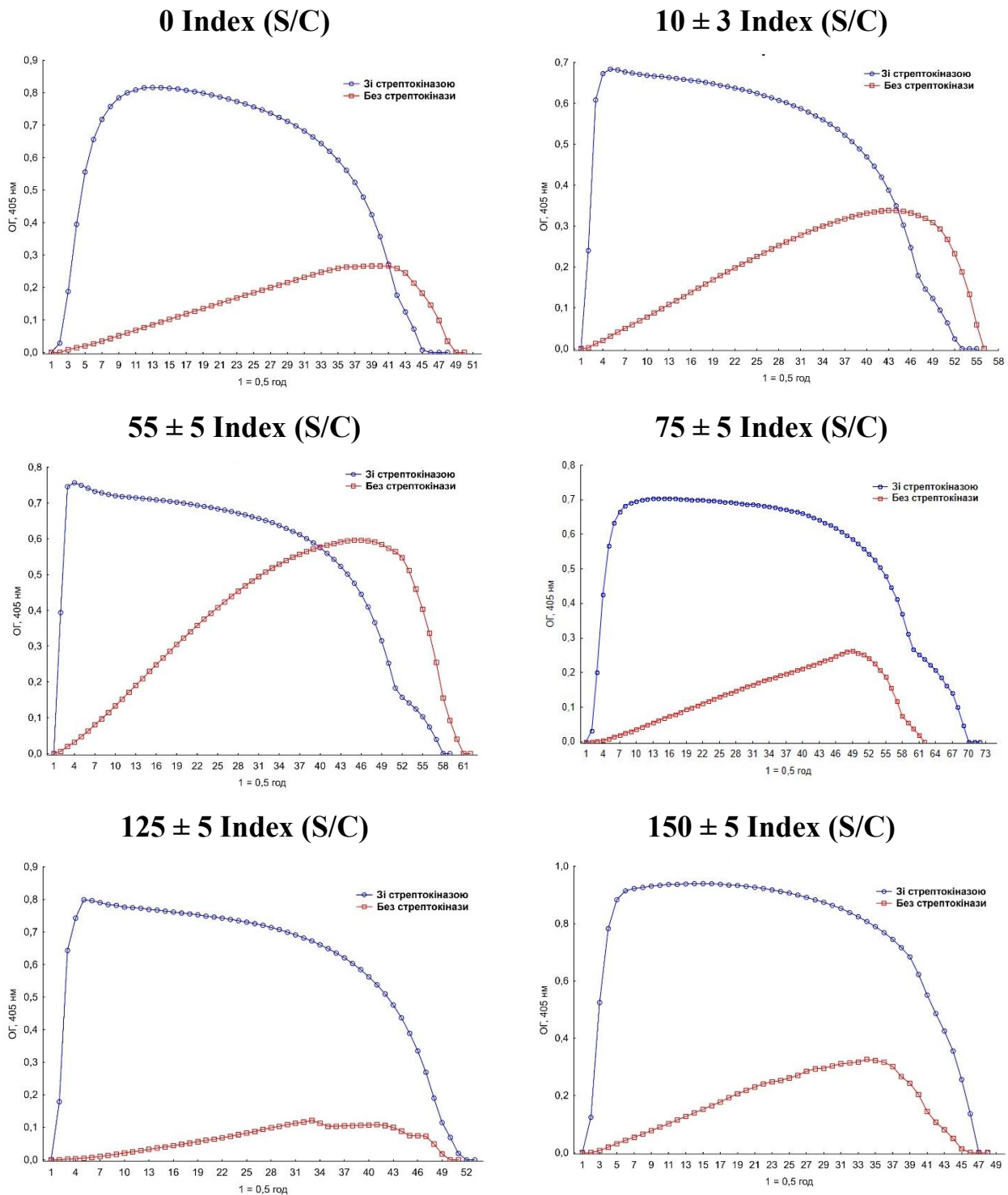


Рис. 15. Оптична щільність проб, що містять очищені комплекси, за умов їх інкубації із стрептокіназою та за її відсутності

Отримані результати, свідчать, що до складу комплексів входять молекули, здатні до гідролізу фібриногену (рис. 16). За результатами ензим-електрофорезу, молекулярна маса таких комплексів вища 130 кДа, що узгоджується з попередніми даними, зокрема з результатами вестерн-блоту та електрофорезу. 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 – як бачимо з рис.16, інтенсивність зон гідролізу зростає у донорів з вищим титром антитіл проти SARS-CoV-2.

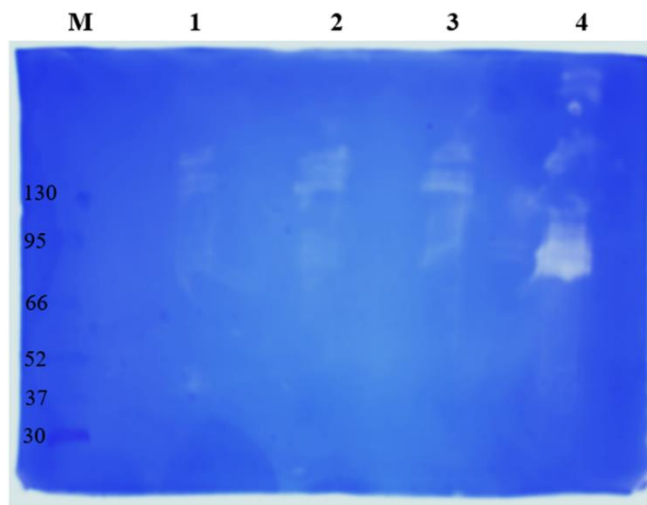


Рис. 16. Ензим-електрофореграма фракцій, що містять комплекси антитіл з молекулами плазміненового походження: М – маркери молекулярної маси (кДа); 1 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 0; 2 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C) 10 ± 3 ; 3 – титр анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C); 75 ± 5 ; 4 – 150 ± 5

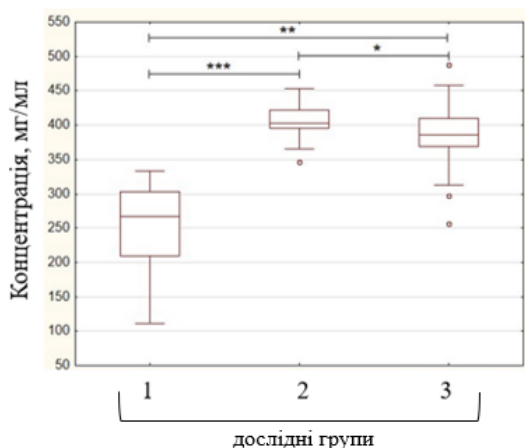
Отже, поява у кровотоці осіб, що перенесли COVID-19, комплексів антитіл з молекулами плазміненового походження зі зміненими властивостями може бути однією з причин формування своєрідного «атипового протеолітичного фону», що сприяє розвитку дисбалансу між коагуляційною та фібринолітичною ланками системи гемостазу. За таких умов спрямованість змін у системі гемостазу визначатиметься загальним станом організму, наявністю супутніх патологій і характером призначеного лікування.

Також було досліджено стан системи гемостазу у пацієнтів із РС та ОА. РС є аутоімунним захворюванням, тоді як ОА класифікується як дегенеративна патологія, однак обидва захворювання характеризуються хронічним запаленням, яке може впливати на систему гомеостазу. Такі дослідження є актуальними, оскільки виявлені нами активація протеолізу, хронічне низькоінтенсивне запалення та домінування процесів коагуляції у осіб після перенесеного COVID-19 можуть бути чинниками, що сприяють розвитку ускладнень на тлі основної патології. 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.

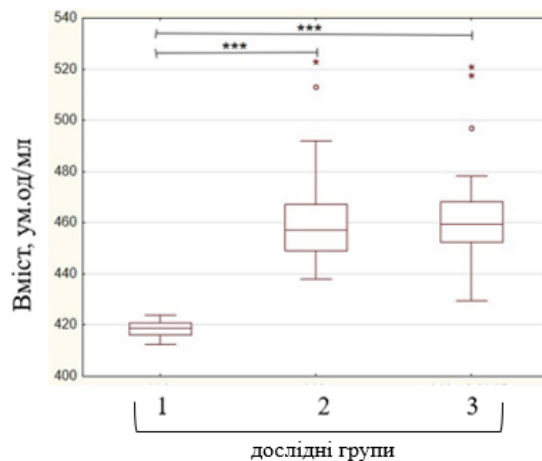
Аналіз показників системи зсідання крові – зокрема, зростання концентрації фібриногену, рівня протромбіну та концентрації РФМК у плазмі крові пацієнтів із РС як окремо, так і після перенесеного COVID-19 свідчить про активацію коагуляції (рис. 17). Поява D-димеру у плазмі крові пацієнтів із РС, з одного боку, свідчить про активацію коагуляційного каскаду та утворення фібрину, а з іншого – є маркером функціональної активності фібринолітичної системи, що забезпечує

деградацію сформованих фібринових згустків. Важливо зазначити, що істотних відмінностей у рівнях як D-димеру, так і РФМК у пацієнтів із РС, які раніше перенесли інфекцію SARS-CoV-2, порівняно з пацієнтами із РС без COVID-19 в анамнезі, виявлено не було.

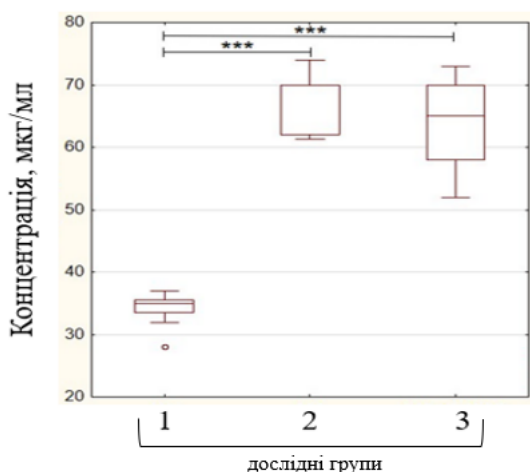
А



Б



В



Г

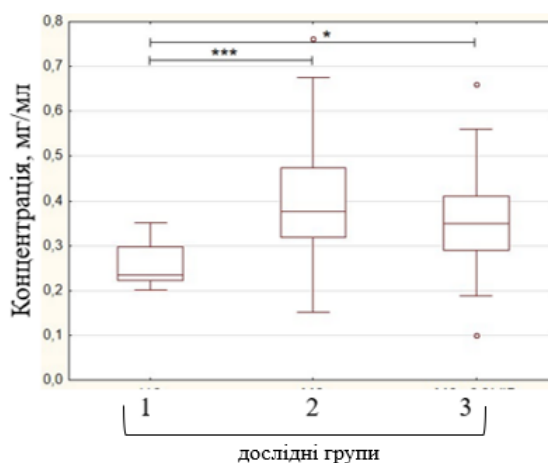
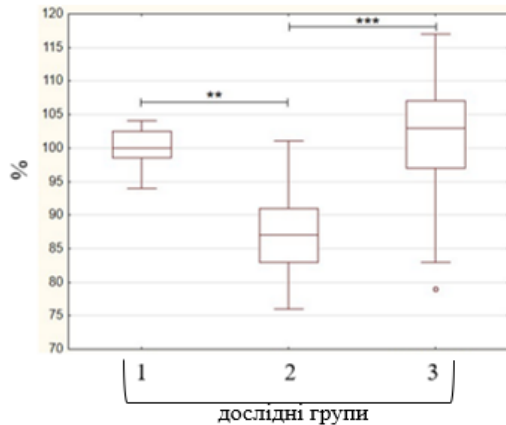


Рис. 17. Концентрація фібриногену (А), вміст протромбіну (Б), концентрація РФМК (В) та концентрація D-димеру (Г) у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з розсіяним склерозом; 3 – пацієнти з розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19 (середнє значення $\pm$ SD)

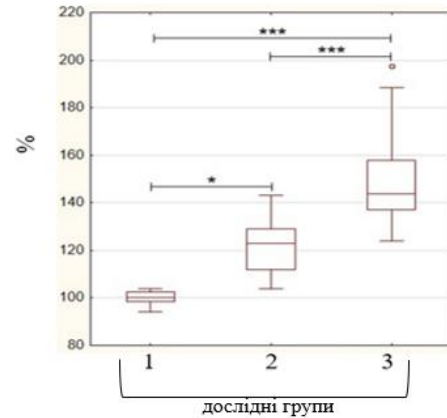
різницю між групами позначено як *** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,005$; * $p < 0,01$

Домінуванню процесів коагуляції сприяє дещо знижена ефективність системи фібринолізу, що проявляється зменшенням потенційної активності плазміногену, зниженням рівня ТАП, зростанням рівня ПАІ-1 та відносного інгібіторного потенціалу α_2 -антиплазміну. Ці зміни є більш вираженими у пацієнтів, що перенесли COVID-19 (рис. 18).

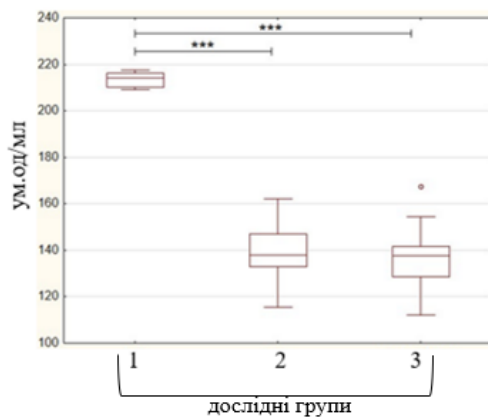
А



Б



В



Г

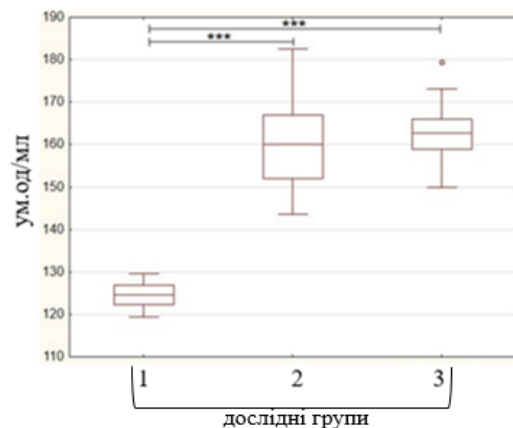


Рис. 18. Потенційна активність плазміногену (А), відносний інгібіторний потенціал α_2 -антиплазміну (Б), рівень ТАП та ПАІ-1 у плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з РС; 3 – пацієнти з РС, що перенесли COVID-19

різницю між групами позначено як *** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,005$; * $p < 0,01$

ОА 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 функціонуванні системи гемостазу (Fujii, et al., 2022). Незважаючи на те, що у пацієнтів з ОА також спостерігаються порушення у функціонуванні системи гемостазу, механізми, що лежать в основі цих порушень є дещо відмінними від таких у пацієнтів з РС. Так, зниження вмісту протромбіну та суттєве зростання концентрації РФМК вказує на гостру активацію процесів коагуляції (рис. 19).

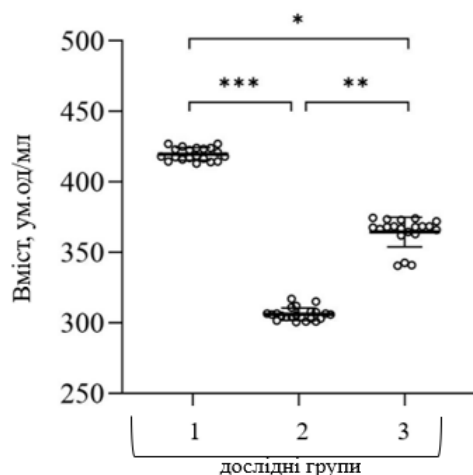
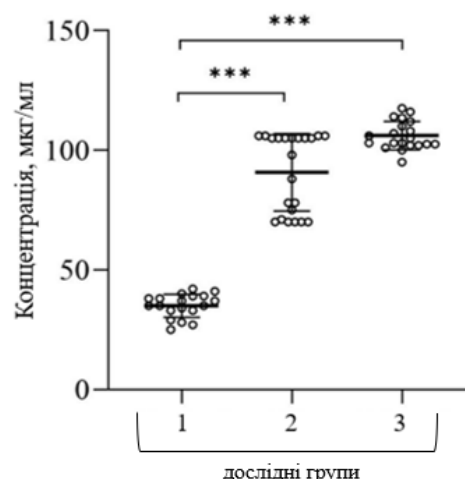
А**Б**

Рис. 19. Вміст протромбіну (А) та концентрація РФМК (Б) у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з ОА; 3 – пацієнти з ОА, що перенесли COVID-19
різницю між групами позначено як *** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,005$; * $p < 0,01$

Отримані результати свідчать про зниження антикоагуляційного потенціалу як у пацієнтів з ОА, що перенесли COVID-19, так і в осіб, що не хворіли на COVID-19. Зокрема, виявлено зниження відносної активності протеїну С та активності антитромбіну III (рис. 20).

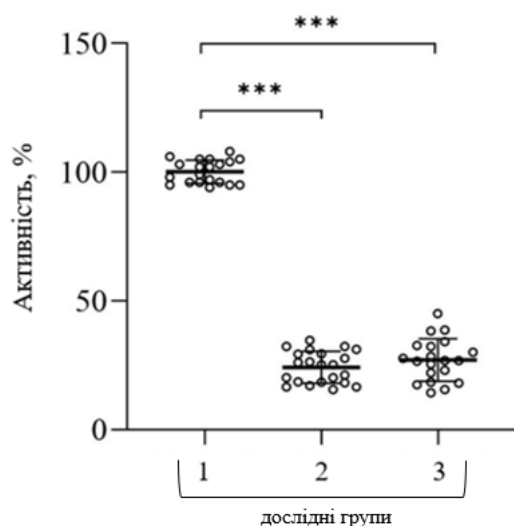
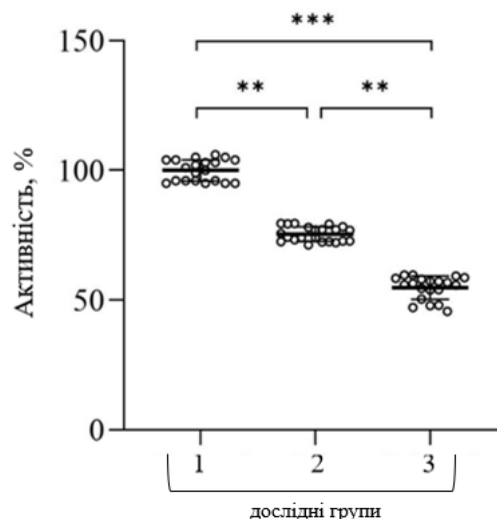
А**Б**

Рис. 20. Відносна активність протеїну С (А) та антитромбіну III (Б) у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з ОА; 3 – пацієнти з ОА, що перенесли COVID-19
різницю між групами позначено як *** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,005$; * $p < 0,01$

Разом з тим, на відміну від пацієнтів з РС, за ОА функціональна активність системи фібринолізу зберігалась на достатньому рівні, на що вказує зниження

вмісту плазміногену на тлі зростання його потенційної активності (рис. 21). Підтриманню належної активності фібринолізу сприяє зростання активності ТАП та зниження вмісту ПАІ-1. Такий комплекс змін вмісту та активності ключових факторів системи фібринолізу може бути проявом компенсаторної реакції організму у відповідь на посилення коагуляції.

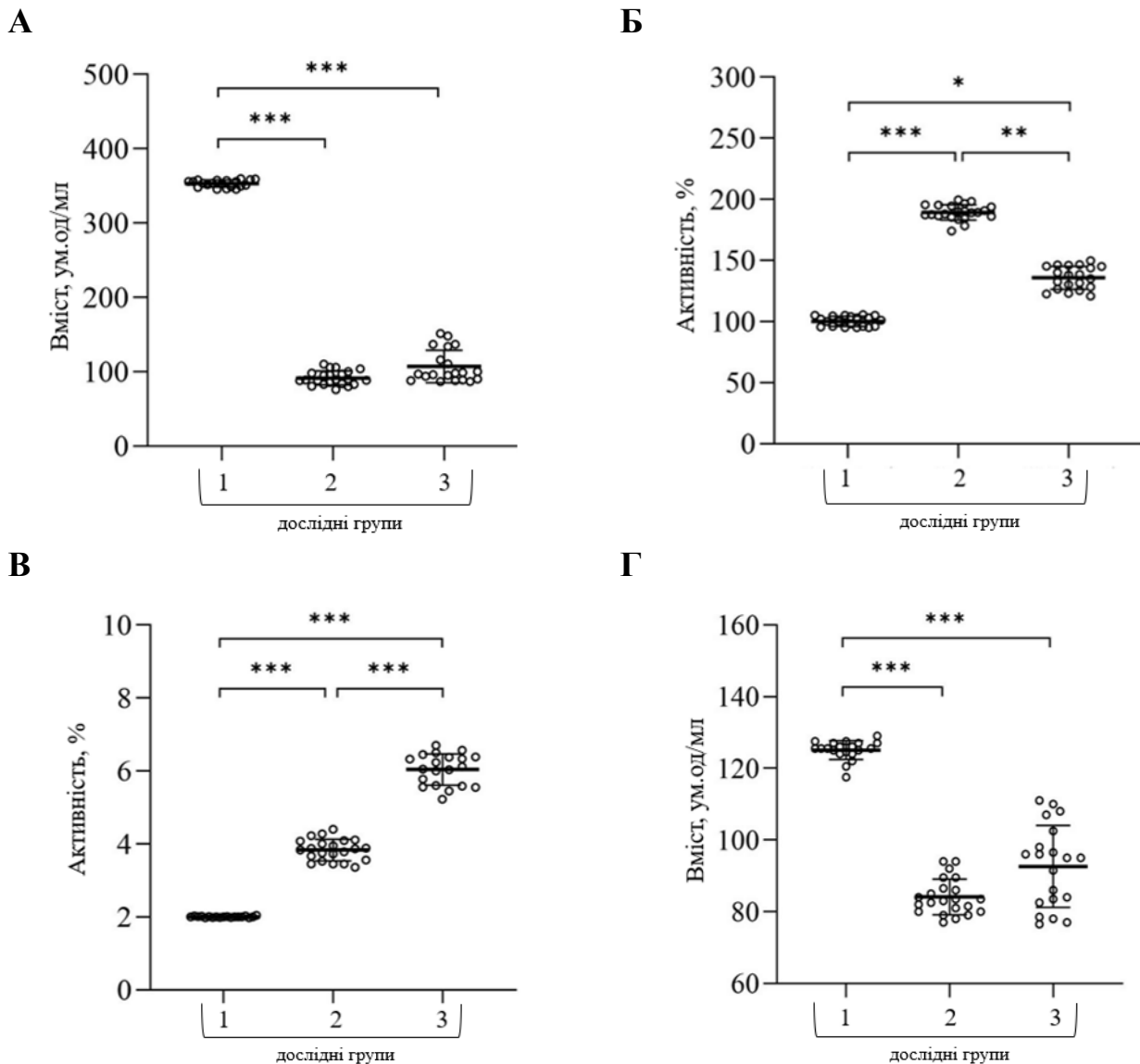


Рис. 21. Вміст плазміногену (А) та його потенційна активність (Б), а також активність ТАП (В) та вміст ПАІ-1 (Г) у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом: 1 – умовно здорові донори; 2 – пацієнти з ОА; 3 – пацієнти з ОА, що перенесли COVID-19 ($M \pm SD$)

різницю між групами позначено як *** $p < 0,001$; ** $p \leq 0,005$; * $p < 0,01$

Отже, при розсіяному склерозі спостерігається активація коагуляції, яка має системний характер і супроводжується пригніченням антикоагуляційних механізмів і фібринолізу, тоді як у пацієнтів з ОА виявлені зміни свідчать переважно про гостру, реактивну активацію коагуляції з частковим збереженням компенсаторного фібринолізу. Найбільш виражені порушення в обох групах

спостерігаються після перенесеного COVID-19, що вказує на його роль як додаткового протромботичного чинника.

Оскільки проведені дослідження продемонстрували появу у кровотоці осіб, які перенесли COVID-19, ковалентних комплексів між антитілами та молекулами плазміногенового походження, доцільним було дослідити можливість формування таких комплексів у плазмі крові пацієнтів із РС та ОА, що перехворіли на COVID-19. Застосувавши описаний вище метод очищення комплексів, з плазми крові пацієнтів з РС та ОА було вилучено білкові комплекси. Використовуючи відповідні антитіла ми довели присутність у складі комплексів як IgG, так і молекул плазміногенового походження (табл. 5). Той факт, що у плазмі крові пацієнтів із РС та ОА, які не хворіли на COVID-19, також присутні ковалентні комплекси, хоча й у нижчих концентраціях, опосередковано свідчить, що утворення таких комплексів є складовою патогенезу захворювань, асоційованих із хронічними запальними та дегенеративними процесами, тоді як COVID-19 може виступати потужним тригером, який суттєво посилює їх утворення.

Таблиця 5

Складові (плазміногенова, протромбінова та антитіла) білкових комплексів, очищених з плазми крові пацієнтів з розсіяним склерозом та остеоартритом

Групи	За використання антитіл проти		
	плазміногену	людських IgG	протромбіну
	ум. од/мг білка		
Пацієнти з розсіяним склерозом	0,074±0,0037	0,142±0,0071	0,031±0,0015
Пацієнти розсіяним склерозом, що перенесли COVID-19	0,274±0,0130*	1,153±0,0576*	0,200±0,0100*
Пацієнти з остеоартритом	0,065±0,0025	0,141±0,0750	0,096±0,0048
Пацієнти з остеоартритом, що перенесли COVID-19	0,300±0,0100**	1,120±0,0345**	0,234±0,0032**

* – $p < 0,05$ різниця значуща у порівнянні з групою пацієнтів з розсіяним склерозом; ** – $p < 0,05$ різниця значуща у порівнянні з групою пацієнтів з остеоартритом

Ми припустили, що до складу комплексів можуть входити не лише молекули плазміногенового походження, але й інші білки плазми крові, зокрема молекули протромбінового походження, які в умовах сформованого при COVID-19

патогенетичного середовища могли зазнавати структурно-функціональних модифікацій, пов'язаних, зокрема, зі зміною доступності або експонуванням активного центру, що й забезпечило можливість їх очищення за допомогою бензамідин-сефарози. Використання антитіл до протромбіну підтвердило наявність у складі досліджуваних комплексів протромбінової компоненти (табл. 5).

На підставі результатів, отриманих в ході виконання дисертаційного дослідження, запропоновано узагальнюючу концепцію, що відображає участь комплексів антитіл класу G з молекулами плазміногенового походження у біохімічних механізмах формування і підтримання гемостатичних та протеолітичних порушень, характерних для постковідного періоду (рис. 21). Запропонована модель передбачає існування кількох взаємопов'язаних ланок впливу, які перебувають у стані динамічного взаємозв'язку, формуючи каскад взаємопідсилюючих процесів. Перша ланка охоплює потенційні властивості плазміногенової компоненти у складі комплексів. Через змінені структурно-функціональні характеристики молекули плазміногенового походження втрачають чутливість до дії ефекторних молекул (інгібіторів та активаторів), порушується взаємодія з канонічними субстратами і рецепторами, виникають нові рецепторні взаємодії та розширюється перелік неспецифічних субстратів. Наслідком є дизрегуляція протеолітичних і рецепторно-сигнальних шляхів, що виявляється у пригніченні фібринолізу, посиленні коагуляції, порушенні клітинного сигналіngu та патологічному перепрограмуванні клітин. Третя ланка узагальнює системні патобіохімічні наслідки впливу ковалентних білкових комплексів, зокрема включає комплекс подій, які призводять до виникнення патологічно зміненого тканинного мікрооточення з прозапальним, профібротичним фенотипом та зміщення гемостатичного балансу у бік протромботичного стану, що суттєво підвищує ризик виникнення тромботичних ускладнень. 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 сигналіngu, 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, протромботичним і профібротичним 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. 21. Схема залучення ковалентних комплексів антитіл з плазміногеном/плазміном (Пг/Пм) та їх деградованими формами (дПг/дПм) у формування патогенезу постковідного синдрому

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-1 β (за винятком донорів із титром 55 ± 5 S/C).

6. Виявлені зміни у вмісті ростових і транскрипційних факторів - VEGF, FGF-2, PDGF, NF- κ B та HIF-1 α - 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ 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. *Mižnarodnij Endokrinologičnij 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 $\alpha 2$ -макроглобуліну та $\alpha 1$ -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 $\alpha 2$ -антиплазміну, $\alpha 1$ -антитрипсину та $\alpha 2$ -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., & **Karbovskyy, 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., & **Karbovskyy, 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 білірубину, 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 білірубину 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.

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 в осіб, які перенесли COVID-19, та виявленню молекулярно-біохімічних механізмів постковідних ускладнень з урахуванням титру антитіл проти SARS-CoV-2. Встановлено порушення функціонування системи зсідання крові, що проявляються підвищенням концентрації фібриногену та розчинних фібрин-мономерних комплексів у плазмі крові донорів із різними титрами антитіл. Показано зростання потенційної активності молекул протромбінового походження за умов зниження вмісту протромбіну, що може свідчити про циркуляцію його фрагментів, здатних до активації. Зниження активності антитромбіну III та експресії тромбомодуліну вказує на посилення дисбалансу між про- та антикоагуляційними механізмами. За таких умов підвищення рівня D-димеру, ймовірно, відображає активацію коагуляційного каскаду. Виявлено зміни вмісту та активності ключових компонентів системи фібринолізу, зокрема плазіногену, ТАП, ПАІ-1 та α_2 -антиплазіну. Для постковідного періоду характерним є збереження хронічного низькорівневого запалення, що проявляється підвищенням рівнів IL-6, IL-8 та IL-1 β на тлі пригнічення IL-4, IL-10 та IL-12 β . Встановлено порушення протеолітичного гомеостазу, що супроводжується змінами рівнів ММП-1, ММП-3, ММП-8 і ММП-9 та особливостями їх молекулярних форм у донорів із різними титрами антитіл проти SARS-CoV-2. Одночасне збільшення вмісту та активності інгібіторів протеїназ (α_2 -макроглобуліну, α_1 -антитрипсину, α_2 -антиплазіну, ПАІ-1 і TIMP-1) свідчить про активацію компенсаторних механізмів, спрямованих на обмеження надлишкового протеолізу. Вперше експериментально підтверджено, що однією з причин тривалого збереження порушень системи гемостазу можуть бути нетипові білок-білкові взаємодії та накопичення у кровотоці ковалентних комплексів, до складу яких входять молекули зі зміненими структурно-функціональними властивостями. 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 молекули плазіногенового походження. Встановлено ковалентний характер взаємодії білків у складі комплексів та доведено, що до їхнього складу входять антитіла класу G і молекули плазіногенового походження. Показано, що очищені комплекси виявляють активність щодо хромогенного субстрату, специфічного для плазіну, а також здатні розщеплювати фібриноген. Встановлено, що після інкубації зі стрептокіназою активність комплексів істотно зростає, що свідчить про присутність у їхньому складі плазіногену та/чи його деградованих форм, здатних до подальшої активації. Показано, що у плазмі крові пацієнтів із розсіяним

склерозом та остеоартритом присутні ковалентні білкові комплекси антитіл із білками плазміногенового та протромбінового походження, а також встановлено, що їхній рівень достовірно зростає після перенесеного COVID-19. Виявлені кореляційні взаємозв'язки між рівнем антитіл і ключовими параметрами системи гемостазу (фібриноген, РФМК, протромбін, протеїн С, тромбомодулін, плазміноген, 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.

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

ABSTRACT

Karbovskyy V.L. The hemostatic system in the post-COVID period - Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Dissertation for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences in speciality 03.00.04 “Biochemistry”. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2026.

The dissertation is devoted to the assessment of hemostatic system alterations in individuals after COVID-19 and to the identification of molecular and biochemical mechanisms underlying post-COVID complications, taking into account anti-SARS-CoV-2 antibody titers. Disturbances in blood coagulation were identified, including elevated levels of fibrinogen and soluble fibrin-monomer complexes in the plasma of donors with different anti-SARS-CoV-2 antibody titers. Increased potential activity of prothrombin-derived molecules was detected despite reduced prothrombin content, suggesting the presence of potentially activatable prothrombin fragments in the bloodstream. Reduced antithrombin III activity together with decreased thrombomodulin expression enhanced the imbalance between pro- and anticoagulant mechanisms. Under these conditions, elevated D-dimer levels are more likely associated with activation of the coagulation cascade rather than fibrinolysis of already formed clots. Analysis of the fibrinolytic system revealed alterations in the content and activity of key components, including plasminogen, tPA, PAI-1, and α_2 -antiplasmin. The post-COVID period was characterized by persistent low-grade inflammation associated with an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines. Elevated IL-6, IL-8, and IL-1 β levels combined with reduced IL-4, IL-10, and IL-12 β indicated predominance of a pro-inflammatory environment with a tendency toward chronic inflammation. Altered levels of MMP-1, MMP-3, MMP-8, and MMP-9, together with changes in protease inhibitor activity, demonstrated disruption of proteolytic homeostasis in post-COVID donors. For the first time, it was experimentally confirmed that prolonged hemostatic disturbances may result from atypical protein–protein interactions and accumulation of covalent complexes containing structurally modified molecules. Using affinity chromatography, PAGE electrophoresis, and Western blotting, covalent complexes consisting of IgG antibodies and plasminogen-derived molecules were isolated and characterized from

donor plasma. These complexes exhibited activity toward a plasmin-specific chromogenic substrate and were capable of fibrinogen degradation. Their activity significantly increased after streptokinase treatment, indicating the presence of plasminogen and/or its degraded forms capable of further activation. Similar covalent antibody complexes with plasminogen- and prothrombin-derived proteins were also detected in patients with multiple sclerosis and osteoarthritis, with their levels significantly increasing after COVID-19. Identified correlations between antibody titers and key hemostatic parameters suggest their potential use as biomarkers for assessing coagulation-fibrinolysis imbalance and monitoring anticoagulant therapy efficiency in the post-COVID period.

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