

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ТУГАРОВ ЮРІЙ РАДІОНОВИЧ

УДК 616.72-002:[616.98:578.834COV-19]-097.3:616-002

ДИСЕРТАЦІЯ
ПОКАЗНИКИ ЗАПАЛЕННЯ ТА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ
ПРОЦЕСІВ У КРОВІ ХВОРИХ НА ОСТЕОАРТРИТ
ПІСЛЯ SARS-CoV2-ІНФЕКЦІЇ

Спеціальність 091 – Біологія

Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Науковий керівник: Дворщенко Катерина Олександрівна, доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Тугаров Ю.Р. Показники запалення та вільнорадикальних процесів у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2025.

Підготовка здійснювалась на кафедрі біохімії навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України.

У 2019 році у світі виникла пандемія, що була спровокована коронавірусом 2, пов'язаним з тяжким гострим респіраторним синдромом (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, SARS-CoV-2). Нова коронавірусна хвороба 2019 року (coronavirus disease 2019, COVID-19) стала серйозною загрозою для здоров'я та життя людей нашої планети. Це захворювання глибоко відбилося на системі охорони здоров'я у всьому світі, вплинувши не лише на безпосередні показники захворюваності та смертності, але й на віддалені наслідки для здоров'я різних верств населення.

Останні тенденції у вивченні COVID-19 змінилися від гострих її наслідків до тривалих ефектів на організм. У групі ризику опинилися люди, що мають хронічні захворювання. В зв'язку з цим, нагальним стає дослідження питань прогнозування перебігу хронічних патологій у осіб, що перехворіли коронавірусною інфекцією. Серед розповсюджених хронічних захворювань важливе місце займають остеоартрити, які вражають велику кількість населення. Остеоартрит є хронічним дегенеративним захворюванням суглобів, при якому відбувається руйнування та втрата суглобового хряща, що призводить до болю, деформації та обмеження рухливості суглобу. Остеоартрит є хронічним і часто прогресуючим захворюванням. З часом у

важких випадках може відбуватися повна втрата рухливості суглобу, і він стає динамічно непридатним.

Загроза захворювання COVID-19 полягає в тому, що при перебігу остеоартриту у осіб під час системної запальної відповіді можливе формування ускладнень за рахунок більш глибоких порушень в організмі. В результаті такі пацієнти в постковідний період можуть мати більш високий ризик розвитку ускладнень остеоартриту.

Тому метою дисертаційної роботи було проаналізувати ряд параметрів запальних та вільнорадикальних процесів у крові пацієнтів з остеоартритом колінних суглобів II-III ступеню після SARS-CoV2-інфекції.

У вступі до дисертаційної роботи сформульовано мету та завдання даного експериментального дослідження, проведено обґрунтування актуальності обраної теми, дано характеристику предмету та об'єкту дослідження, проведений перелік методів, що були застосовані для досягнення мети роботи. Також, у даному розділі роботи показані елементи дослідження, що характеризують його наукову новизну. Крім того у розділі сформульовані основні результати проведеної роботи та можливі далекосяжні напрямки їх застосування у практиці. Зазначено дані щодо апробації результатів дослідження, які були отримані при виконанні роботи, та визначено особистий внесок здобувача у наданих наукових працях.

У першому розділі роботи надано оглядову інформацію щодо сучасних наукових даних, які присвячені досліджуваній у дисертації тематиці. Зокрема, у ньому висвітлені питання етіологічних чинників та патофізіології важкого гострого респіраторного синдрому, спричиненого коронавірусом 2. Розглянуто результати досліджень, які характеризують порушення гемостазу при коронавірусній хворобі 2019. Також проведена оцінка формування можливих постковідних ускладнень у пацієнтів, які пов'язані з патологічними змінами опорно-рухового апарату.

У другому розділі роботи надана інформація щодо умов проведення експериментів, характеристики основних дослідних груп пацієнтів,

використаних хімічних реагентів та обладнання, а також зроблено детальний опис застосованих у роботі методів дослідження.

У третьому розділі наведені основні результати експериментальних досліджень та проведено їх обговорення з використанням наукових літературних даних. Цей розділ побудований із трьох основних блоків. Кожний блок присвячений оцінці певних показників можливих напрямків ураження організму рековалесцентних осіб з остеоартритом після COVID-19. Так, у першому блоці проаналізовано ключові маркери запалення у крові людей з діагнозом остеоартрит, що перехворіли COVID-19. У даному підрозділі вивчаються наступні параметри: концентрація С-реактивного білка (СРБ), молекул середньої молекулярної маси, вміст цитокінів (інтерлейкін (ІЛ)-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12 β , фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α) та інтерферон- γ (ІФ- γ)) у плазмі крові та рівні експресії генів *PTGS2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, простагландин-ендопероксидсинтаза 2 або циклооксигеназа), *NOS2* (nitric oxide synthase 2, NO-синтаза 2) та *NFKB1* (nuclear factor kappa B, ядерний фактор κ B) у клітинах крові. У другому блоці визначені показники інтенсивності вільнорадикальних процесів у крові осіб з остеоартритом після перенесеної коронавірусної хвороби. В даному підрозділі вивчаються наступні параметри: концентрація активних форм кисню (супероксидний радикал та пероксид водню), продуктів перекисного окиснення ліпідів (дієнові кон'югати, ТБК-активні сполуки, шиффові основи), продуктів окисної модифікації білків (нейтральні альдегідні та кетонні продукти і основні альдегідні та кетонні продукти), сульфгідрильних груп (небілкові, білкові та загальні SH-групи), активність ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутаза та каталаза) у плазмі крові, а також рівні експресії генів *LRP1* (low density lipoprotein receptor related protein 1, білок 1, подібний до рецептора ліпопротеїнів низької щільності) та *OLR1* (oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) receptor 1, рецептор окиснених ліпопротеїнів низької щільності) у клітинах крові. У третьому блоці проведена оцінка маркерів метаболізму хрящової тканини у крові хворих на остеоартрит після COVID-19. В даному

підрозділі вивчаються наступні параметри: рівень матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 і ММП-10) та тканинного інгібітору металопротеїнази-1 (ТІМП-1), концентрація білка COMP (cartilage oligomeric matrix protein, хрящовий олігомерний матриксний білок) у плазмі крові, а також рівні експресії генів *TGFBI* (transforming growth factor beta 1, трансформуючий фактор росту β 1), *FOXO1* (forkhead box protein O1, фактор транскрипції FoxO1), *COMP* (cartilage oligomeric matrix protein, хрящовий олігомерний матриксний білок) у клітинах крові.

У четвертому розділі дисертаційного дослідження – заключення – проведено узагальнення отриманих результатів, показана значимість та можливе використання виявлених відмінностей у формуванні остеоартриту у осіб після COVID-19 та пацієнтів, що не інфікувались SARS-CoV-2. Продемонстровано новизну та перспективи практичного застосування результатів дисертаційного дослідження.

Результатом дисертаційної роботи є проведена всебічна оцінка параметрів запалення, вільнорадикальних процесів та маркерів метаболізму хрящової тканини у крові осіб з діагнозом остеоартрит та після одужання від інфікування SARS-CoV-2.

В цілому, отримані нами експериментальні дані констатують, що COVID-19 може спричинити розвиток більш важкого перебігу остеоартриту та можливе формування ускладнень у таких пацієнтів. Виявлена інтенсифікація запальних та вільнорадикальних процесів у осіб з діагнозом остеоартрит після COVID-19 сприятиме більшому руйнуванню суглобового хряща, що підтверджується зростанням у крові маркерів деградації хряща. Встановлені у дисертаційній роботі відмінності у перебігу остеоартриту у рековалесцентних осіб після COVID-19 можна застосовувати як прогностичні маркери оцінки розвитку патофізіологічного процесу, а також дієвості його лікування.

Матеріали за результатами виконаних досліджень опубліковано в 11 наукових працях, з них: 6 статей у фахових періодичних виданнях України, одна стаття у фаховому закордонному виданні, що входить до міжнародних

наукометричних баз Scopus та Web of Science (Q3). Здійснено апробацію результатів у рамках наукових конференцій з опублікуванням 5 тез доповідей.

Ключові слова: COVID-19, остеоартрит, запалення, спондиліт, біохімічні індикатори крові, імунні клітини, цитокіни, активні форми кисню і нітрогену, оксид азоту, супероксиддисмутаза, металопротеїнази, протеоліз.

ABSTRACT

Tugarov Yu.R. Indicators of inflammation and free radical processes in the blood of osteoarthritis patients after SARS-CoV2 infection. - Manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 – Biology. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2025.

The preparation was carried out at the Department of Biochemistry of the Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of the Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine.

In 2019, a pandemic broke out worldwide, caused by severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) has become a serious threat to the health and lives of people around the world. This disease has had a profound impact on healthcare systems worldwide, affecting not only immediate morbidity and mortality rates, but also long-term health outcomes for various population groups.

Recent trends in the study of COVID-19 have changed from its acute consequences to long-term effects on the body. People with chronic diseases are at risk. In this regard, research on the prediction of the course of chronic pathologies in people who have had a coronavirus infection is becoming urgent. Among the common chronic diseases, osteoarthritis occupies an important place, affecting a large number of the population. Osteoarthritis is a chronic degenerative disease of the joints, in which there is destruction and loss of articular cartilage, which leads to pain, deformation and limited mobility of the joint. Osteoarthritis is a chronic and often progressive disease. Over time, in severe cases, will be complete loss of mobility of the joint will occur and it becomes dynamically unusable.

The threat of COVID-19 disease lies in the fact that during the course of osteoarthritis in individuals during a systemic inflammatory response, complications may develop due to deeper disorders in the body. As a result, such patients in the

post-COVID period may have a higher risk of developing osteoarthritis complications.

Therefore, the purpose of the dissertation was to analyze a number of parameters of inflammatory and free radical processes in the blood of patients with knee osteoarthritis of the II-III degree after SARS-CoV2 infection.

In the introduction to the dissertation, the goal and objectives of this experimental study are formulated, the relevance of the chosen topic is justified, the subject and object of the study are characterized, and a list of methods that were used to achieve the goal of the work is provided. Also, this section of the work shows the elements of the study that characterize its scientific novelty. In addition, the section formulates the main results of the work and possible far-reaching directions of their application in practice. Data on the validation of the research results obtained during the work are indicated and the applicant's personal contribution to the submitted scientific works is determined.

The first section of the work provides an overview of current scientific data devoted to the topic studied in the dissertation. In particular, it highlights the issues of etiological factors and pathophysiology of severe acute respiratory syndrome caused by coronavirus 2. The results of studies characterizing hemostasis disorders in coronavirus disease 2019 are considered. The formation of possible post-covid complications in patients associated with pathological changes in the musculoskeletal system is also assessed.

The second section of the work provides information on the conditions of the experiments, the characteristics of the main study groups of patients, the chemical reagents and equipment used, and a detailed description of the research methods used in the work is provided.

The third section presents the main results of experimental studies and discusses them using scientific literature data. This section is built from three main blocks. Each block is devoted to the assessment of certain indicators of possible areas of damage to the body of convalescent individuals with osteoarthritis after COVID-19. Thus, in the first block, key markers of inflammation in the blood of people

diagnosed with osteoarthritis who have recovered from COVID-19 were analyzed. In this section, the following parameters are studied: the concentration of C-reactive protein, medium molecular weight molecules, the content of cytokines (interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 β , tumor necrosis factor- α and interferon- γ) in blood plasma as well as the levels of expression of the genes *PTGS2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2 or cyclooxygenase), *NOS2* (nitric oxide synthase 2) and *NFKB1* (nuclear factor kappa B) in blood cells. In the second block, the intensity of free radical processes in the blood of people with osteoarthritis after recovering from coronavirus disease was determined. This section studies the following parameters: the concentration of reactive oxygen species (superoxide radical and hydrogen peroxide), lipid peroxidation products (diene conjugates, TBA-active compounds, Schiff bases), protein oxidative modification products (neutral aldehyde and ketone products and basic aldehyde and ketone products), sulfhydryl groups (non-protein, protein and total SH-groups), the activity of antiradical protection enzymes (superoxide dismutase and catalase) in blood plasma as well as the levels of expression of *LRP1* (low-density lipoprotein (LDL) receptor related protein 1) and *OLR1* (oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) receptor 1) genes in blood cells. In the third block, markers of cartilage metabolism in the blood of patients with osteoarthritis after COVID-19 were assessed. This section studies the following parameters: the level of matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-10) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), the concentration of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) protein in blood plasma as well as the levels of expression of the genes *TGFBI* (transforming growth factor beta 1), *FOXO1* (forkhead box protein O1), *COMP* (cartilage oligomeric matrix protein) in blood cells.

In the fourth section of the dissertation research – conclusion – the results obtained are summarized, the significance and possible use of the identified differences in the formation of osteoarthritis in individuals after COVID-19 and patients not infected with SARS-CoV-2 are shown. The novelty and prospects for practical application of the results of the dissertation research are demonstrated.

The result of the dissertation work is a comprehensive assessment of the parameters of inflammation, free radical processes and markers of cartilage metabolism in the blood of individuals diagnosed with osteoarthritis and after recovery from SARS-CoV-2 infection.

In general, the experimental data we obtained state that COVID-19 can cause the development of a more severe course of osteoarthritis and the possible formation of complications in such patients. The detected intensification of inflammatory and free radical processes in individuals diagnosed with osteoarthritis after COVID-19 will contribute to greater destruction of articular cartilage, which is confirmed by the increase in markers of cartilage degradation in the blood. The differences in the course of osteoarthritis in convalescent individuals after COVID-19 established in the dissertation can be used as prognostic markers for assessing the development of the pathophysiological process, as well as the effectiveness of its treatment.

Materials based on the results of the research have been published in 11 scientific works, including: 6 articles in professional periodicals of Ukraine, one article in a professional foreign publication included in the international scientometric databases Scopus and Web of Science (Q3). The results have been tested within the framework of scientific conferences with the publication of 5 abstracts of reports.

Key words: COVID-19, osteoarthritis, inflammation, spondylitis, biochemical blood indicators, immune cells, cytokines, reactive oxygen and nitrogen species, nitric oxide, superoxide dismutase, metalloproteinases, proteolysis.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Тугаров Ю.**, Юет А., Торгалло Є., Дворщенко К. Концентрація С-реактивного білка та вміст молекул середньої молекулярної маси у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія», Volume 1, Issue 88, 2022, pp. 47-50, doi:10.17721/1728.2748.2022.88.47-50* (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).
2. Borodin S., **Tuharov Y.**, Ostapchenko D., Kot L., Korotkyi O. View of the pathogenetic mechanisms of joint damage in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Visnyk of Taras Shevchenko national university of Kyiv, series «Biology», 2022, 2(89):5-8, doi.org/10.17721/1728_2748* (пошук літератури, підготовка статті до друку).
3. Huet A., **Tugarov Yu.**, Dvorshchenko K., Grebinyk D., Savchuk O., Korotkyi O., Ostapchenko L. TGFB1, FOXO1, and COMP genes expression in blood of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. *Cytol Genet.* 2023;57(2):128-133, doi:10.3103/S009545272302010X (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку) – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.
4. **Тугаров Ю.**, Дворщенко К. Показники системи антиоксидантного захисту у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія», 2023. 93(2): 29-33, doi:10.17721/1728.2748.2023.93.29-33* (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення

літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).

5. **Тугаров Ю.**, Юет А., Дворщенко К. Експресія генів LRP1 та OLR1 у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія», 2023, 3(94):35-40, doi:10.17721/1728.2748.2023.94.35-40 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).*

6. **Yuriy Tuharov**, Daryna Krenytska, Tetiana Halenova, Larysa Kot, Nataliia Raksha, Olexii Savchuk, Larisa Prysiashniuk, Ruzhena Matkivska, Tetyana Falalyeyeva, and Liudmyla Ostapchenko Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in patients with osteoarthritis after recovery from COVID-19. *Reviews on Recent Clinical Trials, 2023; Volume 18, Issue 4, pp. 123-128, doi:10.2174/1574887118666230131141608 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку) – Q3 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.*

7. **Тугаров Ю.**, Дворщенко К. Окисна модифікація білків у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія, 2024, 97(2):22-27, doi:10.17721/1728.2748.2024.97.22-27 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).*

Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. Короткий О., **Тугаров Ю.**, Дворщенко К. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у плазмі крові хворих на остеоартрит. *Міжнародна науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку»,*

присвячена Всесвітньому дню науки, 9–11 листопада 2022 року, Чернівці, Україна, с. 60-63.

2. Остапченко Д.І., **Тугаров Ю.Р.**, Дворщенко К.О., Короткий О.Г. Антиоксидантна ферментативна активність у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *IX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень»*, 17-18 листопада 2022 р., Київ, Україна, с. 128-130.

3. Юет А.С., **Тугаров Ю.Р.**, Гребіник Д.М., Дворщенко К.О. Експресія генів *OLR1*, *ACAN* та *LRP1* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит після перенесеної SARS-COV2-інфекції. *Міжнародна наукова конференція «Міжгалузеві диспути: динаміка та розвиток сучасних наукових досліджень»*, 27 січня 2023 р., м. Хмельницький, Україна, с. 173-175.

4. **Тугаров Ю.Р.**, Юет А.С., Гребіник Д.М., Цибенко Л.Д., Дворщенко К.О. Показники запалення у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / advancements in life sciences»*, 24-26 квітня 2024 р., м. Київ, Україна, с. 230-234.

5. Huet A. S., Dvorshchenko K.O., Grebinyk D.M., Kostyuk O.S., **Tugarov Y.R.** Aminotransferase activity in patients with osteoarthritis after SARS-COV2 infection. *The 7th International scientific and practical conference «Current trends in scientific research development»*, February 13-15, 2025, BoScience Publisher, c. Boston, USA, p. 52-55.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Етіологія та патогенез важкого гострого респіраторного синдрому, спричиненого коронавірусом SARS-CoV2	27
1.2. Порушення гемостазу, окисно-відновного балансу та особливості вродженої імунної відповіді в хворих на COVID-19	32
1.3. Постковідні ускладнення у пацієнтів, пов'язані з патологією опорно-рухового апарату	44
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
2.1. Використані матеріали та реактиви	52
2.2. Обладнання	53
2.3. Умови проведення експерименту	54
2.4. Отримання крові та її плазми	55
2.5. Визначення концентрації С-реактивного білка	56
2.6. Визначення концентрації молекул середньої молекулярної маси	57
2.7. Визначення концентрації цитокінів, матриксних металопротеїназ, тканинного інгібітору металопротеїнази-1 та хрящового олігомерного матриксного білка	57
2.8. Визначення вмісту супероксидного радикалу	58
2.9. Визначення вмісту пероксиду водню	59
2.10. Визначення концентрації дієнових кон'югатів та шиффових основ	60
2.11. Визначення концентрації ТБК-активних продуктів	62
2.12. Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків	63
2.13. Визначення концентрації загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних груп	64
2.14. Визначення супероксиддисмутазної активності	66

2.15.	Визначення каталазної активності	67
2.16.	Визначення концентрації білка	68
2.17.	Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі	69
2.17.1.	Виділення загальної РНК	69
2.17.2.	Оцінка рівнів експресії генів	70
2.18.	Статистична обробка результатів дослідження	72
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ		74
3.1.	Оцінка ступеню запалення у крові пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли SARS-CoV2-інфекцією	74
3.1.1.	Концентрація С-реактивного білка у плазмі крові	75
3.1.2.	Концентрація молекул середньої молекулярної маси у плазмі крові	78
3.1.3.	Концентрація цитокінів у плазмі крові	80
3.1.4.	Рівні експресії генів <i>PTGS2</i> , <i>NOS2</i> , <i>NFKB1</i> у клітинах крові	92
3.2.	Інтенсивність вільнорадикальних процесів у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції	100
3.2.1.	Вміст активних форм кисню у плазмі крові	101
3.2.2.	Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові	105
3.2.3.	Вміст продуктів окисної модифікації білків у плазмі крові	111
3.2.4.	Рівні експресії генів <i>LRP1</i> та <i>OLR1</i> у клітинах крові	116
3.2.5.	Концентрація білкових та небілкових сульфгідрильних груп у плазмі крові	122
3.2.6.	Активності ферментів антиоксидантного захисту у плазмі крові	127
3.3.	Маркери метаболізму хрящової тканини у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції	130
3.3.1.	Рівні матриксних металопротеїназ у плазмі крові	130

3.3.2. Рівні експресії генів <i>TGFBI</i> , <i>FOXO1</i> , <i>COMP</i> та концентрація білка COMP у крові	141
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	151
ВИСНОВКИ	158
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	161
ДОДАТКИ	201

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АФК	активні форми кисню;
ВІТ	відділення інтенсивної терапії;
ВООЗ	Всесвітня організація охорони здоров'я;
ГРДС	гострий респіраторний дистрес-синдром;
ДВЗ	дисеміноване внутрішньосудинне згортання;
2,4-ДНФГ	2,4-динітрофенілгідразин;
ДСН	додецилсульфат натрію;
ДТНБК	5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота;
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота;
ІФА	імуноферментний аналіз;
ІФ-γ	інтерферон-гамма;
ІкВ	інгібітор ядерного фактору кВ;
ІЛ	інтерлейкін;
кПЛР	кількісна полімеразна ланцюгова реакція;
ММП	матриксна металопротеїназа;
НАДН	нікотинамідаденіндинуклеотид гідрид;
НАДФН	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат;
НПЗП	нестероїдні протизапальні препарати;
НСТ	нітросиній тетразолій;
ПОЛ	перекисне окиснення ліпідів;
РАА	ренін-ангіотензин-альдостерон;
СРБ	С-реактивний білок;
ТБК	тіобарбітурова кислота;
ТІМП	тканинний інгібітор металопротеїназ;
ТХО	трихлороцтова кислота;
ФМС	феназинметасульфат;
ФНП-α	фактор некрозу пухлин-альфа;

ACE-2	angiotensin converting enzyme-2 (ангіотензин-перетворювальний фермент-2);
APLA	antiphospholipid antibody (антифосфоліпідне антитіло);
ARDS	adult respiratory distress syndrome (респіраторний дистрес-синдром);
CCP	cyclic citrullinated peptide (циклічний цитруліновий пептид);
COMP	cartilage oligomeric matrix protein (хрящовий олігомерний матриксний білок);
CoV	coronavirus;
COVID-19	coronavirus disease-2019 (короновірусна хвороба-2019);
COX2	cyclooxygenase 2 (циклооксигеназа 2);
CRS	cytokine release syndrome (синдром вивільнення цитокінів);
DMARD	disease-modifying antirheumatic drug (протиревматичні препарати, що модифікують захворювання);
ECM	extracellular matrix (екстрацелюлярний матрикс);
FOXO1	forkhead box protein O1 (фактор транскрипції FoxO1);
Ig	immunoglobulin (імуноглобулін);
LOX-1	lectin-type oxidized LDL receptor-1 (рецептор 1-го типу для окиснених ліпопротеїдів низької щільності);
LRP1	LDL receptor related protein 1 (білок 1, подібний до рецептора ліпопротеїнів низької щільності);
MASP2	mannose-binding protein-associated serine protease 2

	(серинова протеаза 2, що зв'язує манозу);
MERS	Middle East Respiratory Syndrome (близькосхідний респіраторний синдром);
MERS-CoV	middle east respiratory syndrome coronavirus (коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому);
NETs	neutrophil extracellular traps (позаклітинні пастки нейтрофілів);
NF-κB	nuclear factor kappa B (ядерний фактор κB);
NK-cells	natural killer cells (природні кілери);
NOS2	nitric oxide synthase 2 (індуцибельна NO-синтаза);
OLR1	oxidized low density lipoprotein receptor 1 (рецептор окиснених ліпопротеїнів низької щільності (ox-LDL));
ox-LDL	oxidized low density lipoprotein (окиснений ліпопротеїн низької щільності);
PACS	post-acute COVID-19 syndrome (постковідний синдром);
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (простагландин-ендопероксидсинтаза 2);
Real-time PCR	real-time polymerase chain reaction (кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі);
SARS	severe acute respiratory syndrome (тяжкий гострий респіраторний синдром);
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 (коронавірус 2, пов'язаний з тяжким гострим респіраторним синдромом);
TGFB1	transforming growth factor beta (трансформуючий фактор росту-β1);

TLR	toll-like receptor (толл-подібний рецептор);
ХТТ	2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2H-тетразолій-5-карбоксанлід).

ВСТУП

Пандемія COVID-19 (coronavirus disease-2019, коронавірусна хвороба-2019), спричинена новим коронавірусом SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, коронавірус 2, пов'язаний з тяжким гострим респіраторним синдромом), постала серйозною загрозою для здоров'я населення усього світу [19]. Це стало величезним викликом для системи охорони здоров'я та економіки кожної країни на планеті, вплинувши не лише на безпосередні показники захворюваності та смертності, але й на віддалені наслідки для здоров'я різних груп населення [41, 150, 352].

До основних клінічних симптомів COVID-19 належать респіраторні: сухий кашель, задуха, біль у горлі тощо, відчуття слабкості, лихоманка та порушення в роботі травної системи. Її тривалість та перебіг у пацієнтів могли варіювати від безсимптомної хвороби до тяжкої пневмонії з серйозними наслідками [78, 357, 358]. У частини пацієнтів з'являлись симптоми порушення функціонування опорно-рухового апарату: розвиток артралгій, міалгій, набряків та болю в суглобах, хребті тощо [94, 109, 155, 223, 233, 271]. Треба зазначити, що нерідко більш важкий перебіг та поява ускладнень розвивались у осіб з COVID-19, що були похилого віку або мали різні хронічні захворювання, зокрема патології опорно-рухового апарату, включаючи остеоартрит [18, 50, 104, 176, 214].

Отже, існує зв'язок між тяжкістю остеоартриту та COVID-19. Однак оптимальні стратегії патогенезу, діагностики та лікування для пацієнтів з цими захворюваннями залишаються невизначеними.

Обґрунтування вибору теми дослідження: наразі достеменно не вивченими є механізми, які спричинюють ураження опорно-рухового апарату у рековалесцентних осіб після COVID-19, зокрема, групи населення, що страждають на остеоартрити. Виявлені клінічні випадки ураження суглобів після COVID-19 засвідчують, що вірусна інфекція, спричинена SARS-CoV-2, може стати причиною більш тяжкого перебігу остеоартриту та погіршити стан

пацієнта. Отже, актуальним питанням є детальне вивчення особливостей перебігу остеоартриту в осіб, що зазнали інфікування вірусом SARS-CoV-2 та одужали.

Отримана інформація щодо потенційного впливу COVID-19 на запальні та вільнорадикальні процеси, залучені у формування остеоартриту, допоможе зрозуміти патофізіологію ураження суглобів у рековалесцентних осіб, передбачити можливі ризики розвитку ускладнень та створити/редагувати існуючі стандартні протоколи лікування таких пацієнтів.

Мета і завдання дослідження: метою дисертаційної роботи було проаналізувати ряд параметрів запальних та вільнорадикальних процесів у крові пацієнтів з остеоартритом колінних суглобів II-III ступеню після SARS-CoV2-інфекції.

Для досягнення поставленої мети було поставлено такі завдання:

1. Оцінити ступінь розвитку запалення (С-реактивний білок, молекули середньої молекулярної маси, ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12 β , ФНП- α , ІФ- γ , рівні експресії генів *PTGS2*, *NOS2*, *NFKB1*) у крові пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції.

2. Визначити концентрацію активних форм кисню, продуктів окиснення ліпідів і білків та рівні експресії генів *LRP1* і *OLR1* у крові пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції.

3. Дослідити концентрацію сульфгідрильних груп та активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази) у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції.

4. Визначити маркери метаболізму хрящової тканини (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9, ММП-10, ТІМП-1, СОМР, рівні експресії генів *TGFBI*, *FOXO1*, *COMP*) у крові пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми розвитку запалення та вільнорадикальних процесів в організмі пацієнтів з остеоартритом, що перехворіли COVID-19.

Предмет дослідження: маркери запалення, стан окисно-антиоксидантної системи, маркери метаболізму хрящової тканини та рівні експресії генів, залучених у розвиток запальних, вільнорадикальних та дегенеративних процесів у пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції.

Методи дослідження: імуноферментні – визначення концентрації цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12 β , ФНП- α та ІФ- γ), матричних металопротеїназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 і ММП-10), тканинного інгібітору металопротеїнази-1, хрящового олігомерного матричного білка; спектрофотометричні – визначення концентрації С-реактивного білка, молекул середньої молекулярної маси, супероксидного радикалу, пероксиду водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків, супероксиддизмутази та каталази активності, вмісту тіолових груп; спектрофлюориметричні – визначення концентрації шиффових основ; молекулярно-біологічні – ПЛР-аналіз експресії генів циклооксигенази (*PTGS2*), індукцибельної нітрооксидсинтази (*NOS2*), транскрипційного фактору NF- κ B (*NFKB1*), білка 1, подібного до рецептора ліпопротеїнів низької щільності (*LRP1*), рецептору окиснених ліпопротеїнів низької щільності (*OLR1*), фактору транскрипції FoxO1 (*FOXO1*), трансформуючого фактора росту бета (*TGF β 1*), хрящового олігомерного матричного білка (*COMP*), та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено ґрунтовну оцінку показників запальних та вільнорадикальних процесів у крові рековалентних пацієнтів з остеоартритом колінних суглобів II-III ступеню, які перехворіли на COVID-19. У крові вищезгаданих пацієнтів порівняно з групою хворих на остеоартрит, що не інфікувалися SARS-CoV-2, виявлено збільшення концентрацій С-реактивного білка, молекул середньої молекулярної маси, прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α та антизапального ІЛ-10, активних форм кисню (супероксидного радикалу та пероксиду водню), продуктів окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових

основ) і білків (нейтральних альдегідних та кетонних продуктів і основних альдегідних та кетонних продуктів), матричних металопротеїназ (ММП-2, ММП-8), хрящового олігомерного матричного білка на фоні зниження концентрацій сульфгідрильних груп (небілкових, білкових та загальних SH-груп) та активностей антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази). Виявлені відхилення досліджуваних біохімічних параметрів супроводжувались зміною рівнів експресії генів, залучених у розвиток запалення (*PTGS2*, *NOS2*, *NFKB1*), окисного стресу (*OLR1*, *LRP1*) та в механізми деградації хряща (*TGFBI*, *COMP*, *FOXO1*). Встановлена нами інтенсифікація перебігу запальних і вільнорадикальних реакцій в організмі осіб з остеоартритом, що перенесли COVID-19, провокує більш інтенсивні дегенеративні зміни суглобового хряща порівняно з пацієнтами з остеоартритом, що не були заражені вірусом SARS-CoV-2. Наші результати демонструють можливі довгострокові наслідки інфекції, спричиненої вірусом SARS-CoV-2, на перебіг остеоартриту та підкреслюють його потенційну роль як тригера для розвитку патологій опорно-рухового апарату.

Практичне значення одержаних результатів. Знання про особливості механізмів розвитку запалення та вільнорадикальних процесів, залучених у перебіг остеоартриту в рековалесцентних пацієнтів після перенесеного захворювання COVID-19, зробить можливим виявлення потенційних прогностичних біомаркерів, які можуть використовуватись для оцінки перебігу остеоартриту, так і для розробки індивідуальних терапевтичних стратегій його лікування у постковідному періоді.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням автора. Здобувачем особисто виконано пошук, аналіз фахової наукової літератури за темою представленої роботи й проведено оцінку сучасного стану досліджуваної проблеми, самостійно виконано експериментальні дослідження, проведено статистичний аналіз отриманих результатів та їх теоретичне обґрунтування, а також здійснено підготовку матеріалів до публікації.

Формування ідеї роботи, планування схем експериментальних моделей і методичних підходів, аналіз та обговорення отриманих результатів, а також узагальнення висновків було проведено спільно з науковим керівником, д.б.н., с.н.с. К.О. Дворщенко Автор висловлює глибоку вдячність д.б.н., проф. Л.І. Остапченко та д.б.н., проф. О.М. Савчуку з ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за консультативну допомогу в проведенні даних досліджень. Всі дані, отримані у співавторстві, відображені у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи було представлено на таких конференціях: Міжнародна науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», присвячена Всесвітньому дню науки (м. Чернівці, Україна, 9–11 листопада 2022 року), ІХ Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень» (м. Київ, Україна, 17–18 листопада 2022 року), Міжнародна наукова конференція «Міжгалузеві диспути: динаміка та розвиток сучасних наукових досліджень» (м. Хмельницький, Україна, 27 січня 2023 року), XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / advancements in life sciences», (м. Київ, Україна, 24–26 квітня 2024 року), The 7th International scientific and practical conference «Current trends in scientific research development», (с. Boston, USA, February 13–15, 2025).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми «Патології суглобів, спричинені порушеннями метаболізму в пост-ковідний період», 2022–2024 рр., № ДР 0122U001909.

Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №4 від 9 листопада 2021 року.

Уточнення теми дисертаційної роботи затверджено на засіданні Вченої ради Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №4 від 12 листопада 2024 року.

Публікації. За темою дисертаційного дослідження опубліковано 7 статей у фахових наукових виданнях: 6 статей у фахових періодичних виданнях України. Дві публікації індексуються в міжнародній наукометричній базі Scopus: одна стаття – у періодичному науковому виданні, віднесеному до четвертого квартилю (Q4), одна стаття – у періодичному науковому виданні, віднесеному до третього квартилю (Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, а також 5 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація містить такі розділи: Вступ, Огляд літератури, Матеріали та методи досліджень, Результати досліджень та їх обговорення, Узагальнення результатів дослідження, Висновки, Список використаних джерел та Додатки.

Загальний обсяг дисертації становить 204 машинописних сторінок, із яких основний зміст роботи викладено на 160 сторінках. У тексті дисертаційної роботи налічується 40 рисунків. Список використаних джерел містить 359 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етіологія та патогенез важкого гострого респіраторного синдрому, спричиненого коронавірусом SARS-CoV2

З початку нового тисячоліття і до наших днів через зоонозні процеси виникло кілька вірусних захворювань. Такі події відбуваються, коли вірус, який вражає тварину, стає здатним заражати людей. Донедавна найвідомішими з цих захворювань були коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1, SARS-CoV) та коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV). Перший випадок зараження вірусом SARS-CoV зареєстровано у листопаді 2002 року у південному Китаї у провінції Гуандун, смертність від цього вірусного захворювання становила біля 15 % [264]. Гостра респіраторна вірусна інфекція, спричинена MERS-CoV, з'явилася на Близькому Сході приблизно в 2012 році та мала смертність біля 35 % [56]. При цьому слід зауважити, що кількість інфікованих людей часто може бути сильно занижена. Так, наприклад, під час пандемії коронавірусної хвороби-2019 (Coronavirus disease 2019, COVID-19) було інфіковано в 10 разів більше людей, ніж кількість людей, офіційно оголошених хворими в США [336]. Таким чином, ці та подібні показники смертності є наближеними. Певною мірою всі ці захворювання пов'язані з коронавірусами (CoV; переважно β - та α -варіанти), ендемічними для кажанів [252].

Коронавіруси – це велике сімейство вірусів, які викликають різні захворювання, від звичайної застуди до більш важких захворювань [114]. Найпоширенішими інфекціями, викликаними коронавірусами, є інфекції дихальних шляхів та шлунково-кишкового тракту. Коронавіруси належать до родини *Coronaviridae*. Це віруси із позитивною одноланцюговою РНК, що за особливостями геному поділяються на чотири основні роди: альфа-, бета-,

гамма- та дельта-коронавірус [182]. Перші два класи викликають інфекцію переважно у ссавців, тоді як останні в основному заражають птахів [299]. Коронавіруси, які вражають людей, є відповідальними за кілька спалахів хвороби. До них належать альфа-коронавіруси (HCoV-229E та HCoV-NL63) та бета-коронавіруси (HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NKU1 та MERS-CoV) [66].

Епідемії, спричинені SARS-CoV у 2002 році, MERS-CoV у 2012 році та останній спалах хвороби, викликаної новим вірусом SARS-CoV-2 у 2019 році привертають увагу світового масштабу [171, 292]. Коронавіруси SARS-CoV та MERS-CoV є особливо патогенними за своєю природою [27]. Обидва віруси, швидше за все, передаються від кажанів до пальмових цивет [116] або верблюдів-дромадерів [264], а потім до людей [72]. Генوم коронавірусу має довжину приблизно 26 000–32 000 основ і містить змінну кількість відкритих рамок зчитування (від 6 до 11) [292]. Перша відкрита рамка зчитування становить приблизно 67 % геному і кодує 16 неструктурних білків, а решта відкритих рамок зчитування кодують додаткові та структурні білки [72]. Різні домени, що зв'язують рецептори, у білках шипа вірусів SARS-CoV та MERS-CoV приєднуються до різних рецепторів клітин-хазяїв. Вірус SARS-CoV використовує як основний рецептор ангіотензин-перетворюючий фермент-2 (angiotensin converting enzyme-2, ACE-2) [123], тоді як для MERS-CoV основним є дипептидилпептидаза 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4) [334].

31 грудня 2019 року Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) повідомила про випадки пневмонії невідомої причини у місті Ухань, Китай. 7 січня 2020 року китайська влада назвала новий коронавірус причиною, який отримав тимчасову назву «2019-nCoV». Новий коронавірус (nCoV) – це мутантний штам, який раніше не був виявлений у людей. Згодом новий вірус отримав назву «вірус COVID-19». Новий коронавірус мав інший епідеміологічний характер від раніше відомого SARS-CoV. У хворих на COVID-19, багато активних вірусів виробляється під час продромального періоду у верхніх дихальних шляхах, що відповідає за різке поширення інфекції. На відміну від нинішнього поширення хвороби COVID-19, передача

SARS-CoV не відбувалася легко протягом продромального періоду. Уражені вірусом мали більш легкий перебіг хвороби; проте більшість випадків передачі вірусу від спалахів SARS-CoV у осіб із важким перебігом захворювання було легше контролювати [240]. Новий коронавірус SARS (SARS-CoV-2) також міг реплікуватися в клітинах нижніх дихальних шляхів через його спорідненість з цими клітинами, що призводило до ураження нижніх дихальних шляхів [55, 323].

Важливою різницею є те, що SARS-CoV найбільш ефективно поширюється, коли у пацієнтів є симптоми захворювання [110], що робить лікування/стримування SARS-CoV відносно простим. Навпаки, люди, інфіковані SARS-CoV-2, є джерелом зараження інших людей до появи клінічних симптомів [52]. У більшості досліджень показано, що безсимптомні пацієнти з COVID-19 (1 з 5 інфікованих) [231], можуть поширювати хворобу [107]. Однак оцінки науковців різняться щодо важливості поширення COVID-19 через людей, що мають безсимптомний період хвороби [23, 249].

Для проникнення SARS-CoV-2 у клітини господаря потрібне використання його спайкового білка. Спочатку відбувається приєднання рецептор-зв'язувального домену вірусу до ангіотензин-перетворювального ферменту 2 (angiotensin converting enzyme-2, ACE-2) за рахунок використання протеаз людини. Таким чином, ACE-2 є місцем входу коронавірусу в клітину хазяїна. Виявлено, що рецептор-зв'язувальний домен SARS-CoV-2 має в 10–20 разів вищу спорідненість до зв'язування з ACE-2 людини порівняно з вірусом SARS-CoV. Також ефективному проникненню в клітину хазяїна сприяє попередня активація шипа коронавірусу протеїновою конвертазою (фурином). Таку фуриноподібну ділянку розщеплення в білку S (спайковий білок) має SARS-CoV-2, а SARS-CoV її не має [277].

В організмі людини для SARS-CoV-2 клітинами-мішенями дихальної системи є два типи клітин: в'їчасті епітеліальні клітини бронхів і альвеолярні пневмоцити II типу. Втім ACE-2 людини широко розповсюджений і в багатьох інших клітинах організму: серцево-судинній системі, шлунково-кишковому

тракті та сечовидільній системі, що робить їх тропними до коронавірусу. Так, при взаємодії вірусу SARS-CoV-2 з ендотеліальними клітинами різних систем можуть розвиватися такі стани як системний васкуліт, дисеміноване внутрішньосудинне згортання (ДВЗ) крові та тромбоемболії. При зв'язуванні коронавірусу з епітеліальними клітинами травної системи (печінки, підшлункової залози, кишечника) може розвинутих нудота, діарея, біль в животі та навіть шлунково-кишкові кровотечі, гостре ураження печінки з підвищенням рівнів печінкових ферментів у крові, панкреатит та інші серйозні ураження органів-мішеней [17].

Вірус SARS-CoV-2 починає розмножуватися після проникнення в клітину хазяїна, до того як його розпізнає та зможе атакувати імунна система людини. Загалом вірус SARS-CoV-2 проявляє високу контагіозність щодо організму людини та здатний швидко поширюватися в суспільстві. Стрімке розповсюдження коронавірусної інфекції серед людей відбувається через респіраторні виділення при чханні та кашлі хворих (повітряно-крапельний шлях), а також / або при непрямому контакті за рахунок взаємодії з різними предметами, що містять вірусний матеріал інфікованих SARS-CoV-2 людей (контактно-побутовий шлях).

Відповідно до щотижневих епідеміологічних оновлень ВООЗ до 18 липня 2021 року в усьому світі було підтверджено 190 833 853 випадки та 4 100 087 смертей, а також введено 3 402 275 866 доз вакцин. За даними ВООЗ, найбільшу кількість хворих було виявлено в Америці, за якою йшли Індія, Бразилія та Франція. При цьому Індія пережила дуже тривожну ситуацію: станом на 18 червня 2021 року в цій країні було зареєстровано 31 106 065 випадків. Згідно зі статистичними даними, 59 % смертей зазнали чоловіки, 41 % – жінки. У представників обох статей найбільша кількість випадків захворюваності відзначалася у віковій групі 30–39 років, тоді як вікова група 65+ мала найвищий рівень смертності [333].

В Україні перший випадок коронавірусної інфекції-2019 було офіційно зареєстровано у місті Чернівці Чернівецької області 3 березня 2020 року. На

жаль, 13 березня 2020 року була констатована перша смерть жінки (71 рік) внаслідок зараження SARS-CoV-2. Згідно статистичних даних, у нашій державі станом на 13 квітня 2024 року діагноз COVID-19 був офіційно підтверджений у 5 557 995 пацієнтів (13,5 % населення України), серед яких у 112 418 випадках (2,0 % населення) хвороба призвела до летального наслідку [3]. На сьогодні, кожного тижня в Україні офіційно підтверджують близько 500 нових випадків зараження людей вірусом SARS-CoV-2. Позитивним є те, що серед хворих на COVID-19 летальні випадки від ускладнень зустрічаються рідко [8].

У більшості пацієнтів з COVID-19 захворювання має неважкий перебіг без ускладнень. На ранніх стадіях захворювання більшість пацієнтів відчують наступні клінічні симптоми: сухий кашель, задуха, нежить, біль у горлі, температура до 38°C, головний біль, шлунково-кишкові розлади, біль у м'язах та загальна слабкість. Однак у 20 % пацієнтів захворювання швидко прогресує у важкий стан, який потребує госпіталізації та лікування киснем, а 5 % хворих необхідна госпіталізація у відділення інтенсивної терапії. У таких хворих розвивається атипова інтерстиціальна двостороння пневмонія, гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС), ДВЗ крові та поліорганна дисфункція. Такі хворі мають поганий прогноз захворювання та майже 10 % цих важкохворих пацієнтів згодом помирають [51, 106, 297].

У загостренні цього захворювання важливу роль відіграють імунологічна гіперреакція, що характеризується широким ураженням ендотелію, індукованим комплементом згортанням крові та системною мікроангіопатією [313].

ГРДС, септичний шок і сепсис є частими ускладненнями у серйозних випадках COVID-19, як і різні порушення органів, такі як ураження серця та гостре ушкодження нирок [345]. Крім того, тяжкі захворювання та смертність від COVID-19 пов'язують зі старшим віком і супутніми захворюваннями, такими як серцева недостатність, підвищення артеріального тиску, захворювання легенів або цукровий діабет [258, 339].

Також у пацієнтів з COVID-19 описані різні скелетно-м'язові та аутоімунні ускладнення [13, 92, 101]. У ряді досліджень повідомлялося про пост-COVID-19 реактивний артрит, васкуліт та захворювання сполучної тканини, включаючи вовчак та запальний міозит [255].

У групу ризику більш важкого перебігу COVID-19 та розвитку постковідних ускладнень також входять хворі на аутоімунний артрит. Такі пацієнти для лікування артриту повинні приймати препарати, що пригнічують власну імунну систему [32, 38, 270]. Це може ускладнити перебіг COVID-19 у людей з аутоімунними захворюваннями.

Отже, важливою медико-біологічною проблемою є вивчення механізмів розвитку коронавірусної хвороби в організмі з урахуванням його індивідуальних особливостей, зокрема, наявності коморбідних захворювань, що допоможе у ефективному лікуванні даної вірусної інфекції та знизить ризик розвитку ускладнень.

1.2. Порушення гемостазу, окисно-відновного балансу та особливості вродженої імунної відповіді в хворих на COVID-19

COVID-19 викликає протромботичний стан, про що свідчить висока частота зареєстрованих серйозних тромботичних подій у хворих на коронавірусну хворобу [68]. Мікро- та макросудинні тромбоемболічні або тромботичні ускладнення *in situ* спостерігалися при COVID-19 у судинах легенів, селезінки, мозку, кишечника та на периферії [165, 318, 327, 340]. Є повідомлення про часте утворення тромбу у кровообігу при гемодіалізі, інсульту у пацієнтів, які раніше були здоровими, а також утворення артеріальної та венозної тромбоемболії, незважаючи на профілактичну або повністю терапевтичну антикоагулянтну терапію [165, 236]. У пацієнтів були описані випадки тромбозу, які в інших епізодах протікали безсимптомно. Більше того, тромбози були виявлені як у гострому стані, так і протягом тижнів

після критичного етапу захворювання, що свідчить про те, що протромботичний стан може тривати кілька тижнів або навіть довше після госпіталізації. Подібні тромботичні ускладнення спостерігалися при тяжкому гострому респіраторному синдромі (severe acute respiratory syndrome, SARS) та близькосхідному респіраторному синдромі (Middle East respiratory syndrome, MERS) [118, 330].

Емболія легеневої артерії та тромбоз глибоких вен є найбільш частими тромботичними явищами при COVID-19, при цьому початкові звіти відзначають частоту від 20 % до 30 % у важкохворих пацієнтів [213]. У голландській когорті зі 184 пацієнтів із COVID-19 у відділенні інтенсивної терапії (ВІТ), кумулятивна частота тромботичних подій великих судин становила 49 %, більшість з яких були представлені емболією легеневої артерії, виявленою на комп'ютерній томографії в сегментарних та субсегментарних легеневих артеріях [165]. Це сталося, незважаючи на загальну тромбопрофілактику надропарином у дозі 2800 або 5700 МО один або двічі на добу, і ризик смерті від усіх причин у цій когорті був у 5 разів вищим серед пацієнтів із тромботичним випадком. Італійська когорта з 388 пацієнтів виявляла меншу, але, тим не менш, значну кумулятивну частоту тромбоемболічних подій у 21 % (27,6 % у ВІТ, 6,6 % у загальній палаті), половина з яких була діагностована протягом 24 годин після госпіталізації [195].

У французькій когорті спостерігалась подібна кумулятивна частота тромботичних подій. Результати, отримані при дослідженні даної когорти, порівнювали із частотою подій у двох різних історичних контрольних популяціях: 1) пацієнтів із відділень реанімації без COVID-19, які були госпіталізовані взимку 2019 року, та 2) пацієнтів із грипом, госпіталізованих до у 2019 році в тій самій реанімації [245]. Серед пацієнтів із COVID-19, що перебували у ВІТ, у 20,6 % виявлено ознаки тромбоемболії легеневої артерії (діагностовано в середньому через 6 днів від моменту надходження у відділення реанімації), що було у 2 рази вище порівняно з будь-якою

історичною контрольною групою. Таким чином, схоже, що COVID-19 може бути виключно протромботичним у порівнянні з іншими важкими вірусними респіраторними пневмоніями.

Хоча опубліковані дослідження розтинів були відносно рідкісними в умовах пандемії, невеликі серії випадків відзначали часті макросудинні та мікросудинні фібринозні тромби в легенях, а іноді й у багатьох інших органах. Дослідження, проведені під час серії розтинів у Німеччині, встановили, що з 12 послідовних смертей від COVID-19 у семи пацієнтів була виявлена венозна тромбоемболія, а легенева емболія вважалася прямою причиною смерті у чотирьох людей [327]. Швейцарські патологоанатоми, які розглядали 21 розтин пацієнтів із COVID-19, виявили мікротромби в альвеолярних капілярах у п'яти з одинадцяти пацієнтів, у яких проводили імуногістохімію фібрину, що потенційно відповідало комплемент-опосередкованому мікросудинному пошкодженню [206, 209]. Ознаки зменшеної легеневої вени та капілярного васкуліту також спостерігалися в одного пацієнта, хоча системний васкуліт був відсутній. Дані, отримані в серії з двадцяти одного розтину, проведеного у кількох містах Сполучених Штатів Америки, підтвердили таку ж високу частоту легеневих мікротромбів, причому велика легенева тромбоемболія була поширеним смертельним ускладненням [43].

Вважається, що дисеміновані легеневі мікротромби є причиною унікальної фізіології респіраторного дистрес-синдрому (adult respiratory distress syndrome, ARDS) у дорослих при COVID-19, який має відносно нормальну податливість легенів, що потенційно потребує стратегій вентиляції, відмінних від тих, які зазвичай застосовуються при лікуванні респіраторного дистрес-синдрому дорослих з іншою етіологією [53, 111]. Однак початковий інтерес до нових стратегій вентиляції був помилковим, оскільки патологічний зв'язок синдрому респіраторного дистрес-синдрому дорослих з дифузним пошкодженням альвеол дійсно спостерігався при дослідженні більшості розтинів COVID-19 [43].

Нарешті, остаточне дослідження порівнювало дані при розтині легенів у семи пацієнтів, які померли від COVID-19, із такими в семи пацієнтів, які померли від респіраторного дистрес-синдрому дорослих, спричиненого вірусом грипу H1N1 [185]. У пацієнтів з COVID-19 мікротромби альвеолярних капілярів виявлялися в 9 разів частіше, ніж у пацієнтів з грипом ($p < 0,001$), що узгоджується зі збільшенням частоти тромбів при COVID-19 порівняно з іншими вірусними пневмоніями. Важке ураження ендотелію та вірус всередині клітин також було відмічено у пацієнтів із COVID-19 в ділянках, пов'язаних із мікротромбозом, що свідчить про те, що пошкодження та запалення ендотелію можуть безпосередньо мати відношення до початкових стадій утворення тромбу.

Імовірно, що гостра дисфункція правого шлуночка та легенева тіло при COVID-19, принаймні частково, пов'язані з великою кількістю центральних або сегментарних легневих емболій або високим навантаженням мікротромбів дрібних судин легенів. Вони посилюються гіпоксичною вазоконстрикцією та підвищенням внутрішньогрудного тиску від штучної вентиляції легень, що призводить до раптового збільшення постнавантаження правого шлуночка, що, у свою чергу, може привести до роз'єднання правого шлуночка та легеневої артерії. Справді, у когорті зі 120 пацієнтів із COVID-19 ознаки порушення поздовжньої деформації правого шлуночка та дилатації правого шлуночка були пов'язані зі смертністю, хоча ці ехокардіографічні зміни ще не були безпосередньо пов'язані з наявністю легеневої емболії [185]. Нарешті, легенева емболія та розтягнення правого шлуночка також можуть сприяти підвищенню вмісту тропоніну в крові, кардіогенному шоку та раптовій смерті, які можуть розвинутиися зненацька навіть у пацієнтів із COVID-19, які раніше були безсимптомними або вже одужували від дихальної недостатності [144, 247].

Вважається, що пацієнти з COVID-19 піддаються підвищеному ризику мікросудинного тромбозу, ймовірно, через вивільнення прокоагулянтних цитокінів, таких як інтерлейкін-6 (ІЛ-6) [138, 252, 257]. Незважаючи на відсутність ДВЗ-синдрому, концентрація D-димеру та продуктів розщеплення

фібрину часто помітно підвищуються при тяжкому перебігу COVID-19, що відображає високий рівень утворення та деградації фібрину. Ця сукупність даних свідчить про тромбоз мікросудин легенів. Ранні звіти про розтин пацієнтів, померлих від COVID-19, повідомляли про неспецифічні ознаки, включаючи обширні запальні інфільтрати, дифузне пошкодження альвеол, фіброз легенів, великі атипові пневмоцити, набряк та утворення гіалінових мембран [29, 130, 199, 340]. Однак більш свіжі та вичерпні повідомлення відмічають гіперплазію дрібних судин, потовщення стінки, гіаліновий тромбоз судин і вогнищеву легенеvu кровотечу, можливо, через венозний застій [199, 347]. Про це ураження ендотелію та фібриновий тромбоз також повідомлялося в капілярах клубочка [294, 313].

У новітній серії патологоанатомічних досліджень з Нового Орлеана було ретельно вивчено серцево-легеневу систему чотирьох померлих від COVID-19 і виявлено консолідацію легенів з плямистими ділянками крововиливу з дрібними твердими тромбами, ідентифікованими в периферичній паренхімі легенів. Мікроскопічно спостерігався інтерстиціальний лімфоцитарний інфільтрат, що оточує тромбовані дрібні судини (містить фібрин і тромбоцити з домішками запальних клітин) зі значним асоційованим крововиливом. Альвеолярні капіляри та дрібні судини були потовщені та містили тромби з фібрину. Обмежена легенева тромботична мікроангіопатія була названа потенційною причиною смерті у цих пацієнтів. Інтенсивна активація комплементу була запропонована як індуктор мікросудинного тромбозу внаслідок відкладення кінцевого комплексу комплементу C5b-9, C4d та серинової протеази 2, що зв'язує манозу (mannose-binding protein-associated serine protease 2, MASP2) в легенях [206].

Тромбоцити відіграють важливу роль у патогенезі COVID-19. У посмертних звітах відзначається наявність значної кількості тромбоцитів і мегакаріоцитів в альвеолярних капілярах, що підвищує можливість екстрamedулярного виробництва тромбоцитів. Ця інтерпретація також може пояснити відносно більшу кількість тромбоцитів при COVID-19 у порівнянні зі

звичайним сепсисом, що підвищує можливість активації легеневих мегакаріоцитів, що призводить до агрегації тромбоцитів і утворення тромбоцитарно-фібринового тромбозу. Цікаво, що мегакаріоцитарна реакція була задокументована раніше при вірусних інфекціях, спричинених вірусами грипу H1N1 та SARS-CoV, через надмірну експресію індукованого інтерфероном трансмембранного білка 3, який стимулює вироблення тромбоцитів [47, 102]. Дані також свідчать про те, що SARS-CoV безпосередньо інфікує мегакаріоцити, що може впливати на кількість і функцію тромбоцитів [102, 347]. Вплив COVID-19 на мегакаріоцити залишається невідомим, але можливо, що вивільнення цитокінів (переважно ІЛ-6) у цих пацієнтів посилює проліферацію, диференціацію та активацію мегакаріоцитів за рахунок збільшення виробництва тромбопоєтину [158, 211] і може бути пов'язано з низькою частотою значної тромбоцитопенії у пацієнтів з COVID-19.

Ендотелій судин підтримує гомеостаз через регуляцію імунної компетентності, запальну рівновагу, щільні з'єднувальні бар'єри, гемодинамічну стабільність, а також оптимально збалансовані тромботичні та фібринолітичні шляхи. У новому коронавірусному захворюванні 2019 року, спричиненому SARS-CoV-2, порушення регуляції багатьох із цих шляхів виявилось посередником тяжкого захворювання. Сукупність клінічних зрушень і змін біомаркерів, які спостерігаються при COVID-19, можна класифікувати на порушення імунної ланки, системи ренін-ангіотензин-альдостерон (РАА) і гемостазу, усі з яких сходяться на ендотелії судин. Нагромадження даних фундаментальної науки, візуалізації та клінічних спостережень прояснило картину COVID-19 як судинного захворювання. Бачення хвороби в цьому контексті може надати нові шляхи розуміння COVID-19 і привести до вкрай необхідних удосконалень терапевтичних стратегій.

SARS-CoV-2 використовує ACE-2, щоб полегшити проникнення в клітини-мішені та ініціювати інфекцію. Це надходження вірусу в клітину додатково опосередковується трансмембранною сериною протеазою 2 та катепсином L, які розщеплюють білок S на вірусній частинці, щоб забезпечити

взаємодію з ACE-2 [193]. Ендотеліальні клітини загалом і, зокрема, серцеві перицити (клітини Руже) експресують багато ACE-2, що робить їх прямою мішенню інфекції, спричиненої SARS-CoV-2 [127]. Дослідження легеневого судинного русла показує серйозні порушення при COVID-19 порівняно з контрольними та хворими на грип пацієнтами, такі як поширений тромбоз та мікроангіопатія, активація ендотелію та інтенсивний ангіогенез [12]. Ці дослідження та поширені висновки встановлюють роль вірусного ураження судинної системи, що призводить до судинної дисфункції у пацієнтів з COVID-19 [118, 119].

Інфекція SARS-CoV-2 порушує процеси імунної регуляції та запалення, в яких ендотелій судин відіграє важливу роль. Звіти, зроблені грецькими, німецькими, румунськими, нідерландськими та китайськими лікарями, свідчать про активацію імунної системи у госпіталізованих пацієнтів із COVID-19, що узгоджується з цитокиновим штормом, синдромом активації макрофагів та подальшим імунним виснаженням імунної системи [81]. Ці патологічні зміни є найбільш серйозними у пацієнтів, що перебувають у найбільш важкому стані. Цей гіперзапальний стан має шкідливий вплив на судинну систему, що призводить до дисфункції ендотеліальних клітин. У присутності циркулюючих медіаторів запалення, таких як ІЛ-1, ІЛ-6, молекулярні структури, пов'язані з пошкодженням, і патоген-асоційовані молекулярні структури, ендотеліальні клітини зазнають переходу в активований стан, який бере участь у захисті господаря [248]. Активовані ендотеліальні клітини сприяють локалізованому запаленню шляхом індукування експресії прозапальних генів, залучення імунних клітин, сприяння залученню запальних клітин до пошкоджених або інфікованих тканин, судинного витоку за рахунок збільшення проникності ендотелію та зміни тромботичного потенціалу місцевої поверхні інтими. Активація нейтрофілів призводить до утворення позаклітинних пасток нейтрофілів (neutrophil extracellular traps, NETs) у процесі, який називають нетозіз (NETosis), і який може сприяти відповіді на патогени та тромбоз [120]. Крім того, пошкодження ендотеліальних клітин посилюється активацією толл-

подібних рецепторів (toll-like receptors, TLRs) шляхом розпізнавання вірусної РНК, що призводить до збільшення продукції активних форм кисню (АФК) [305].

При COVID-19 спостерігаються посилення вродженої імунної відповіді та протромботичний стан, викликані медіаторами вродженого імунітету. Це призводить до ескалації каскадів цих шляхів, які сприяють глибокій мікро- та макросудинній дисфункції та пошкодженню ендотеліальних клітин із порушенням інших важливих функцій ендотелію. Нещодавні повідомлення про гіперзапальний синдром, подібний до шокового синдрому за хвороби Кавасакі, у дітей, що супроводжується підвищеними рівнями в крові біомаркерів ураження серця, розвитком аритмії та прогресуванням до гігантських коронарних аневризм у деяких випадках, додатково проливають світло на один із проявів макросудинного імунного феномену при COVID-19 [259].

Порушення регулювання функцій ендотеліальних клітин, спричинене COVID-19, виходить за межі кровоносної системи. Легеневі ендотеліальні клітини відіграють важливу роль в імунному нагляді, підтримці цілісності альвеол і забезпеченні належного кисневого обміну. При COVID-19 пряма вірусна інфекція та системна запальна відповідь, ймовірно, призводять до серйозної дисфункції цих важливих ендотеліальних клітин, що посилює результуючу картину тяжкої гіпоксії та ГРДС, про які часто повідомляють у госпіталізованих пацієнтів.

Ендотелій разом зі своїми ключовими імунорегуляторними функціями також відіграє важливу роль у підтримці динамічної взаємодії між прокоагулянтними та фібринолітичними факторами у судинній системі. У стані спокою ендотелій утворює бар'єр між протромботичним субендотеліальним шаром і прокоагулянтними факторами крові. Під час стресу активовані ендотеліальні клітини експресують більше інгібітора активатора плазміногену-1 (ключового інгібітора ендогенного фібринолізу), тканинного фактора (потужного прокоагулянту) і фактора фон Віллебранда (білка, що утворює мультимери, що сприяють росту тромбу). Активовані ендотеліальні клітини

знижують активність тромбомодуліну та тканинного активатора плазміногену, сприяючи утворенню тромбу [213].

Крім того, під час стресу імунні ефектори потенціюють тромботичні реакції, включаючи утворення позаклітинних пасток нейтрофілів, і, таким чином, можуть також поширювати тромбоз [120]. Ці зміни, поряд з іншими складними регуляторними шляхами, призводять до ендотеліальної дисфункції, активації каскаду згортання та пригнічення фібринолітичних механізмів, що призводить до протромботичного середовища [324]. Такі порушення тонкого балансу здоров'я ендотелію та згортання й фібринолітичної систем призводять до макросудинної та дифузної мікросудинної тромботичної хвороби у пацієнта з COVID-19 [65].

Клінічні дослідження показують, що у крові пацієнтів з COVID-19 підвищуються рівні фібриногену, продуктів розпаду фібрину, D-димеру і фактору фон Віллебранда, і ці підвищення, мабуть, корелюють із тяжкістю захворювання та ризиком тромбозу [122, 137]. Ранні звіти показали значне ушкодження міокарда у пацієнтів, які були у критичному стані або померли від COVID-19 [279]. Існує кілька механізмів, які можуть спричинити ураження серця при COVID-19 [24]. Хоча інфекція та гемодинамічні стреси при гострому критичному захворюванні можуть спровокувати розрив бляшки і, як наслідок, інфаркт міокарда, останні повідомлення вказують на те, що деякі пацієнти з COVID-19 демонструють високі рівні біомаркерів у крові та електрокардіографічні дані інфаркту міокарда без ознак гострого розриву бляшки на ангіографії [28]. Крім того, німецьки кардіологи повідомили про 78 %-вої поширеності серцево-судинного ураження та запалення міокарда без видимого ураження лівого шлуночка на магнітно-резонансній томографії серця у пацієнтів, які одужали від COVID-19 без серцевих симптомів після виписки з лікарні [251]. Ця модель ураження серця може бути результатом ендотеліальної дисфункції та коронарного мікросудинного тромбозу у цих пацієнтів, а не коронарного макросудинного тромбозу.

Докази ураження ендотелію також надходять зі звітів про розтин, які надають додаткову підтримку цієї судинної залученості при COVID-19 та демонструють переконливі докази високої частоти як тромбозу глибоких вен, так і тромбозу легеневої артерії *in situ* [12, 177]. Основні висновки цих розтинів включали повідомлення про мікросудинні тромби, особливо в легeneвому кровообігу, що вказує на порушений ендотелій із прокоагуляційним станом при COVID-19.

Численні аналізи та систематичні огляди продемонстрували значний тягар венозної тромбоемболії у пацієнтів з COVID-19 (до 25 % випадків) та захворюваності на тромбоемболію легеневої артерії (до 20 % випадків) у госпіталізованих пацієнтів, особливо у більш важкохворих, які потребують невідкладної допомоги [35, 249, 355]. Повідомлення про взаємозв'язок між макросудинними проявами ендотеліальної дисфункції з активацією протромботичних механізмів підкреслюють більш високу частоту інсульту великих судин у пацієнтів з COVID-19. Також показано із результатів ретроспективного аналізу «випадок-контроль», що COVID-19 є незалежним фактором ризику інсульту [31, 236].

Останні акушерські дані також додають докази дії SARS-CoV-2 через ендотеліальні та судинні механізми. У серії випадків із 42 вагітностей, зареєстрованих із інфекцією SARS-CoV-2, у 14 % усіх жінок та 75 % жінок із тяжкими симптомами COVID-19 виявлялася сукупність симптомів, подібних до преєклампсії та гемолізу, підвищення рівня печінкових ферментів, а також синдром низького рівня тромбоцитів зі спонтанним вирішенням після одужання від COVID-19 [208]. Преєклампсія має значну судинну та ендотеліальну дисфункцію в своїй центральній патобіології, і розвиток цього розладу зі значною швидкістю у жінок з COVID-19 свідчить про ураження ендотелію як наслідок вірусної інфекції.

Також бере участь у розвитку COVID-19 система РАА, яка регулює здоров'я та функцію судин. Оскільки ACE-2 відіграє критичну роль у біології інфекції, викликаній SARS-CoV-2, велика увага зосереджена на взаємодії між

COVID-19 і системою РАА. Ангіотензин II є основним судинним ефектором системи РАА і чинить шкідливий вплив на серцево-судинну систему через рецептори ангіотензину-II типу 1, активуючи судинозвужувальні, запальні та фіброзні шляхи.

Попередні дослідження показують, що ангіотензин II порушує функції ендотелію різними способами, в тому числі шляхом рекрутації моноцитів, утворення АФК, активації прозапальних шляхів, зокрема через ядерний фактор κВ (nuclear factor kappa B, NF-κB), а також стимулювання виробництва інгібітора активатора плазміногену-1 у ендотеліальних клітинах [36, 217]. У підтримці гомеостазу ACE-2 відіграє контррегуляторну роль у системі РАА, розщеплюючи ангіотензин II до ангіотензину 1–7. Фермент також діє на ангіотензин I, перетворюючи його в ангіотензин 1–9. Обидва ці ферментні перетворення дають пептиди, які мають потужні протизапальні, антиоксидантні та антифіброзні властивості.

Ранні дані вказують на те, що SARS-CoV-2 обмежує експресію ACE-2, сприяючи розщепленню ACE-2 спеціалізованою металопротеїназою 17 (a disintegrin and metalloproteinase domain 17, ADAM17) та відходженню від клітинної поверхні, що призводить до зниження захисної ролі ACE-2 для ендотеліальних клітин та інших органів [171]. Одне дослідження за участю пацієнтів із COVID-19 показало помітно підвищений рівень ангіотензину II у сироватці крові, що додатково вказує на активну систему РАА у проявах інфекції SARS-CoV-2 [195].

Одним із механізмів, за допомогою яких інфекція, викликана SARS-CoV-2, може вплинути на судинну дисфункцію, є окисний стрес. Фагоцитарна НАДФН-оксидаза 2, яка регулюється ангіотензином-II, сприяє окисному стресу в ендотелії через продукцію АФК та зростає при тяжкому перебігу COVID-19, додаючи потенційних шкідливих ефектів дисрегуляції системи РАА при інфекції, спричиненій SARS-CoV-2 [317]. Загалом, SARS-CoV-2- інфекція призводить до активації системи РАА з результируючим профілем пошкоджених функцій ендотелію. Ця дисрегуляція посилює вроджену імунну стимуляцію,

окисний стрес і протромботичні стани, що підживлює порочне коло у судинному дисбалансі в хворих на COVID-19 [36].

Хоча пацієнти з COVID-19 мають більш високий ризик тромбоутворення, механізм, через який виникає тромбоз, ще не точно з'ясований. Є деякі припущення, згідно яких COVID-19 може спричинити тромбофілію, пов'язану з синдромом антифосфоліпідних антитіл (antiphospholipid antibody, APLA). До APLA, зокрема, відносять антикардіоліпінові імуноглобуліни (Immunoglobulin, Ig), антитіла до бета-2 глікопротеїну та вовчаковий антикоагулянт. У нещодавній доповіді з Китаю описано трьох пацієнтів з інфарктом головного мозку (ішемічним інсультом) та позитивною серологічною реакцією на антикардіоліпінові імуноглобуліни (Immunoglobulin, Ig) IgA та IgG та антитіла до бета-2 глікопротеїну (IgA та IgG) [357]. Для діагностики синдрому APLA необхідна персистенція антитіл протягом 12 тижнів, що не було підтверджено у цих пацієнтів. Усі троє пацієнтів були літніми з множинними цереброваскулярними факторами ризику, такими як гіпертонія, цукровий діабет, ішемічна хвороба серця та злякисні новоутворення. Це підвищувало у них ризик розвитку інсульту. Таким чином, зв'язок між COVID-19 і APLA видається обмеженим. Примітно, що позитивна реакція на вовчаковий антикоагулянт зареєстрована у 45 % пацієнтів з COVID-19 і до 88 % тих, хто госпіталізований у відділення реанімації [131, 137]. У деяких пацієнтів також повідомлялося про помірний дефіцит фактора XII [42], що може бути пов'язано з підвищеним ризиком тромбозу [121].

Таким чином, COVID-19 часто призводить до змін гемостазу, а саме до гіперкоагуляційного стану, який тісно пов'язаний зі смертністю. Існують численні фактори, що сприяють розвитку гіперкоагуляції, і саме ендотеліальна дисфункція є основним з них, оскільки активація цих клітин може сильно активувати тромбоцити та систему згортання крові. Це призводить до мікро- або макросудинних тромбозів у пацієнтів при COVID-19. Крім того, відбувається порушення регуляції РАА-системи через захоплення SARS-CoV-2 ACE-2, що призводить до сильної імунної відповіді, яка може ще більше

пошкодити ендотелій. Важливим фактором для визначення тяжкості клінічної картини перебігу COVID-19 у пацієнтів є утворення тромбів у структурі мікроциркуляторного русла легенів. З'являється все більше доказів, що при коронавірусній хворобі існує тісний зв'язок між імунною відповіддю людини та прогресуванням захворювання, а порушення в імунних клітинах, зростання вмісту в крові маркерів запалення та цитокіновий шторм впливають на тяжкість захворювання та розвиток ускладнень.

Отже, існує безліч патогенних механізмів, які можуть призводити до ускладнень у системі згортання крові за умов SARS-CoV-2-інфекції, тому зараз ведеться активне дослідження можливих шляхів їх розвитку. Крім того, на сьогодні не визначено, чи є звичайні методи антикоагуляції ефективними при COVID-19, чи коагулопатія COVID-19 обходить механізми існуючих методів лікування. Отримання цих знань має вирішальне значення для розробки нових ефективних терапевтичних підходів, що допоможе зменшити тяжкість перебігу коронавірусної хвороби та знизити смертність від інфекції, спричиненої SARS-CoV-2.

1.3. Постковідні ускладнення у пацієнтів, пов'язані з патологією опорно-рухового апарату

За літературними даними відомо, що вірусні інфекції можуть бути причиною розвитку гострої артралгії та артриту [84, 103, 106, 197, 253]. Так, моноартикулярний артрит може виникнути після інфікування різними збудниками, включаючи такі як вірус гепатиту В, вірус гепатиту С, вірус Епштейна-Барра, вірус імунодефіциту людини, парвовірус та ряд інших вірусів [204, 275]. Дуже складним є підтвердження діагнозу саме вірусного артриту, тим не менш, його слід враховувати у всіх пацієнтів з раптовим початком поліартикулярного артриту. На сьогоднішній день приблизно 1% усіх випадків гострого запального артриту мають вірусне походження [312]. Так, наприклад,

респіраторні вірусні інфекції у осіб похилого віку та жінок призводять до зростання кількості випадків розвитку ревматоїдного артрити [96, 97, 140, 154].

На сьогоднішній день, офіційно лікарями зафіксовані випадки розвитку артрити у хворих на COVID-19 у різних країнах світу. Перший випадок реактивного артрити був зареєстрований в Анкарі, Туреччині у 73-річного пацієнта, якому поставили діагноз та лікували від інфекції SARS-CoV-2 [273]. Через вісім днів після завершення лікування COVID-19 у нього з'явилися ознаки запалення в лівому першому плюснефаланговому, проксимальному та дистальному міжфалангових суглобах. Через два дні подібні симптоми з'явилися в правому другому проксимальному та дистальному міжфалангових суглобах. В той самий час у крові хворого виявлено помітно підвищені рівні С-реактивного білка, феритину та D-димеру. Лабораторні скринінгові тести на ревматоїдний артрит – ревматоїдний фактор, антитіла до циклічного цитрулінового пептиду були негативними, а рівень сечової кислоти був у межах норми. У пацієнта було діагностовано реактивний артрит, спричинений через COVID-19. Симптоми артрити у хворого повністю зникли за допомогою терапії нестероїдними протизапальними препаратами. Хворого виписали з лікарні на 22 день. Отже, це був перший випадок реактивного артрити, спричиненого COVID-19.

У Турині в Італії [239] зафіксований випадок розвитку вірусного артрити у жінки європеїдної раси віком 58 років з встановленим діагнозом SARS-CoV-2 за допомогою мазків з носа qRT-PCR. Вона мала нетяжкі симптоматичні прояви COVID-19 та лікувалася лише парацетамолом. Через 25 днів після продромального періоду захворювання (артралгія, лихоманка, кашель, нудота, діарея та дисгевзія) у жінки розвинувся артрит гомілковостопного суглоба. За лабораторними показниками у неї було виявлено незначне підвищення С-реактивного білка та відносну лімфопенію, при цьому функціональні показники печінки та нирок були у нормі. Проведені аналізи на виявлення у пацієнтки антинуклеарних антитіл, антиекстрагованого ядерного антигену, ревматоїдного фактору та антитіл до циклічного цитрулінового пептиду були негативними.

Для того, щоб виключити сприятливі фактори до розвитку уражень суглобів дистрофічної природи, було проведено тестування на людський лейкоцитарний антиген-B27, який тісно пов'язаний із спондилоартропатіями. При проведенні ультразвукового дослідження суглобу виявлено гіпертрофію синовіальної оболонки в передній та бічній западині великогомілкової кістки з балом 2 (за оцінкою Outcome Measures in Arthritis Clinical Trials (OMERACT)). Ознак запального процесу сухожилля та його синовіальних оболонок (теносиновіту) в обстежених передніх і задніх відділах не виявлено, але були виявлені ознаки тендиніту ахіллового сухожилля. У хворої на COVID-19 через 30 днів після перших симптомів захворювання мазок з носоглотки на SARS-CoV-2 був негативним. Для підтвердження отриманих даних було взято другий мазок з носоглотки через 7 днів після останнього негативного дослідження. Початкові симптоми лихоманки, кашлю, нудоти, діареї та дисгевзії поступово зменшувалися, поки повністю не зникли протягом 30 днів. Після прийому НПЗП артралгія зникла, але ультразвукове дослідження залишалось стабільним через 30 днів після фармакологічного лікування, а синовіт (позначений сигналом енергетичного доплера) все ще був присутній, навіть за відсутності болю. За призначенням лікарів пацієнтка продовжувала перебувати під ревматологічним спостереженням.

Японські дослідники також повідомляють про перший випадок розвитку реактивного артрит у хворого після зараження SARS-CoV-2 [233]. Пацієнт 50 років був госпіталізований із пневмонією. Мазок з носоглотки на інфекцію SARS-CoV-2 був позитивним. Також чоловік страждав на стеатогепатит. Хворий отримував стандартну дозу фавіпіравіру, але стан його дихання погіршився. На четвертий день госпіталізації у нього розвинувся ГРДС. На 21 день у нього розвинувся гострий двосторонній артрит гомілковостопного суглоба з легким ентезитом правого ахіллового сухожилля. Артроцентез лівої щиколотки виявив легку запальну рідину без кристалів уратів мононатрію або пірофосфату кальцію, що виключало подагричний артрит. Рентгенівські знімки щиколоток і стоп не показали ерозивних змін або ентезофітів. Тести на

антинуклеарні антитіла, ревматоїдний фактор, антициклічні цитруліновані пептидні антитіла та людський лейкоцитарний антиген-B27 були негативними. Тому хворому був поставлений діагноз реактивний артрит на фоні вірусної інфекції, спричиненої SARS-CoV-2. Призначення в якості терапії НПЗП та внутрішньосуглобових ін'єкцій кортикостероїдів призвели до помірного поліпшення стану пацієнта.

Італійськими дослідниками описаний інший випадок гострого олігоартриту, який розвинувся через 13 днів після важкої пневмонії, спричиненої SARS-CoV2 у 60-річного європеїдного чоловіка без відповідних супутніх захворювань [109]. Пацієнт був виписаний після 19 днів госпіталізації у хорошому загальному стані та невисокому ступені запалення за аналізами крові. Проведений тест на SARS-CoV2 мазків з носоглотки був негативним. Проте через 13 днів після виписки у чоловіка почалась субфебрильна лихоманка та він почав скаржитися на болючість правої щиколотки, коліна та стегна. Ультразвукове обстеження виявило невелике запалення правої щиколотки та артрит правого коліна. За біохімічними показниками було виявлено високу концентрацію у крові С-реактивного білка – 237 мг/л. Після проведеної пункції порожнини суглобу (артроцентезу) отримано 20 см³ каламутної та жовтої синовіальної рідини. У її складі було виявлено 20000/мм³ лейкоцитів, з яких 90% поліморфнонуклеатів і 10% моноцитів, при цьому кристалів не було виявлено. Отримані дані свідчать про розвиток запалення суглобу. Пацієнт стверджував, що перед початком клінічних симптомів артрити, він не отримував фізичних травм, не мав попередніх епізодів артрити та не хворів на псоріаз. Поглиблене обстеження щодо системних ревматичних причин артрити було негативним, включаючи антинуклеарні антитіла, ревматоїдний фактор, антицитруліновий пептид та людський лейкоцитарний антиген-B27. На рентгенограмі колін, щиколоток і кульшового суглоба не виявлено ерозій або внутрішньосуглобових кальцифікатів. Тому найбільш вірогідним діагнозом є поствірусний гострий артрит, який виник на фоні інфекції SARS-CoV-2. Після лікування НПЗП клінічні ознаки артрити

зменшились та у крові знизилась концентрація С-реактивного білка. Пацієнт був виписаний через 9 днів і продовжував приймати НПЗП ще 3 тижні. До 6 місяців після припинення терапії у нього не було ознак рецидиву артриту.

Пакістанські лікарі провели оцінку п'яти пацієнтів, у яких на постінфекційній стадії COVID-19 розвинувся запальний артрит [223]. У хворих на фоні інфекції SARS-CoV2 сформувався двосторонньо-симетричний поліартрит. Ці пацієнти раніше не хворіли на будь-які ревматичні захворювання. Серед пацієнтів були три жінки віком 25, 32 та 65 років та два чоловіка віком 35 та 40 років. Серед них літня жінка (65 років) страждала на гіпертензію та чоловік (40 років) хворів цукровим діабетом II типу, інші хворі не мали коморбідних захворювань. Усі ці пацієнти залишалися клінічно стабільними протягом перебігу захворювання COVID-19 без жодного епізоду гіпоксії ($SPO_2 > 95\%$). Але після коронавірусної хвороби ці пацієнти звернулися до ревматологічної амбулаторії зі скаргами на больовий синдром у суглобах. До цього у них ніколи не було патології суглобів. Хворим була проведена оцінка можливих системних ревматичних причин артриту: лабораторні дослідження крові на ревматоїдний фактор та антицитруліновий пептид були негативними. На підставі клінічного огляду та результатів ультразвукового дослідження опорно-рухового апарату цим пацієнтам було діагностовано серонегативний постковідний запальний артрит (поліартикулярний), який за фенотипом нагадував ревматоїдний артрит. Цікавим є факт, що специфічною закономірністю, яка спостерігалася у цих пацієнтів, було ураження (синовіт) дрібних суглобів кисті та зап'ястя з двох сторін, яке було поширене у всіх п'яти пацієнтів. Ці клінічні ознаки нагадували клінічну картину ревматоїдного артриту. Вони успішно лікувались низькими дозами глюкокортикоїдів разом з НПЗП. Також було розпочато застосування протиревматичних препаратів.

Датські лікарі описали випадок розвитку реактивного артриту у пацієнта після інфекції SARS-CoV2 [37]. Чоловік 53 років (тест на інфекцію SARS-CoV-2 позитивний) був госпіталізований у лікарню та потім переведений до відділення інтенсивної терапії внаслідок постійної лихоманки, посилення

легеневих симптомів (гіпоксія <90%, незважаючи на оксигенацію). Після лікування через 12 днів його стан поступово покращився без необхідності штучної вентиляції легень. На момент виписки хворий був стабільний та не мав лихоманки, а концентрація С-реактивного білка була в межах норми. Через чотири дні пацієнт знову звернувся до регіональної лікарні Рандерса з сильним болем у кількох суглобах нижніх кінцівок. Біль почався невдовзі після виписки і вразив праве коліно, обидві щиколотки та бічну сторону лівої стопи. Під час огляду праве коліно та щиколотки були набряклими, теплими та злегка червонуватими. Рух хворого був обмежений та він ледве стояв на ногах. Проведені лабораторні тести на можливі ревматичні причини розвитку артриту були негативними: антинуклеарні антитіла, ревматоїдний фактор, антициклічний цитруліновий пептид та людський лейкоцитарний антиген-В27. У хворого було ураження одного коліна та обох гомілковостопних суглобів, що нехарактерно для ревматоїдного артриту, який на початку захворювання симетрично уражує менші суглоби кистей і стоп. Крім того, в родині пацієнта не було випадків аутоімунних захворювань, що часто зустрічається при ревматоїдному артриті. Під час другого надходження хворому негайно внутрішньовенно вводили антибіотики широкого спектру дії. Лікування реактивного артриту також було розпочато в перший день госпіталізації: прийом НПЗП та глюкокортикоїдів. Використані для лікування протизапальні препарати значно знизили концентрацію С-реактивного білка у крові та стан пацієнта покращився клінічно. Через 5 днів пацієнт одужав і знову міг ходити, після цього його виписали з лікарні. Через 4 місяці після появи симптомів інфекції SARS-CoV2, пацієнт повністю одужав як від COVID-19, так і від реактивного артриту.

Бразильські педіатри зафіксували клінічний випадок розвитку хронічного артриту у дитини, який розвинувся після зараження інфекцією SARS-CoV-2 [199]. У 11-річної дівчинки почалися симптоми мультисистемного запального синдрому, пов'язаного з COVID-19, після чого у дитини згодом розвинувся хронічний артрит. Першим симптомом була лихоманка (чотири добові піки),

через три дні у дитини з'явилися міалгія та артралгії в щиколотках, зап'ястях та колінах. На п'яту добу цього стану у пацієнтки з'явилася дифузна свербляча еритематозна висипка, пов'язана із загостренням міалгії та утрудненням ходьби через біль у колінах. У дитини розвинувся важкий артрит гомілковостопних, колінних, ліктювих, зап'ястних та міжфалангових суглобів. Через шість тижнів артрити для лікування почали застосовувати кортикостероїди. Після двох тижнів їх застосування це призвело до клінічного покращення стану дитини, клінічний артрит зник і препарат поступово відмінили. Серологічні дослідження на SARS-CoV-2 були позитивними на п'ятому тижні після появи симптомів. Після цього пацієнтка не мала клінічних скарг. Через місяць після повної відміни кортикостероїдів за лабораторними показниками у дівчинки була підвищена швидкість осідання еритроцитів. Ультразвуковий контроль виявив дискретну синовіальну гіпертрофію без енергетичного доплерівського сигналу. Через п'ять місяців після появи симптомів, дитина залишалася безсимптомною, за винятком скарг на ранкову скутість протягом 30 хвилин. Отже, даний випадок свідчить, що інфекція SARS-CoV-2 може бути тригером розвитку хронічного артрити.

Таким чином, клінічні особливості та механізми скелетно-м'язових проявів COVID-19 потребують вивчення та глибокого аналізу. Вважається, що ці симптоми в основному виникають внаслідок запальних та/або імунних реакцій, у розвиток яких залученні прозапальні цитокіни (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-17, ФНП- α), що вивільняються при альвеолярному і скелетно-м'язовому запаленні [86].

Проведений аналіз літературних даних клініцистів з різних частин світу свідчить, що у хворих після інфікування COVID-19 можливо виникнення такого ускладнення як запальний реактивний артрит, який може уражувати різні суглоби. Близько у 15% пацієнтів з інфекцією SARS-CoV-2 з'являється один із найпоширеніших симптомів – артралгія (біль у суглобах). COVID-19 вражає кістково-м'язову систему (м'язи та суглоби) на її інфекційній та постінфекційній стадії, викликаючи запальний артрит. На даний момент

залишаються не дослідженими та маловідомими механізми розвитку цієї патології.

Тому не зважаючи на те, що з початку пандемії було зроблено багато кроків вперед у розумінні патогенності вірусу, але багато наслідків, пов'язаних із інфекцією, ще потрібно з'ясувати. У літературі повідомляється про все більшу кількість випадків артриту, пов'язаного з COVID-19, що робить цей стан вартим для подальшого вивчення. Повні клінічні та лабораторні дані, ретельне спостереження за пацієнтом та вивчення механізмів патогенезу мають першорядне значення для проведення ретельної диференціальної діагностики та кращого визначення ознак запального ураження суглобів, пов'язаного з інфекцією SARS-CoV2.

Таким чином, у пацієнтів після SARS-CoV2 вірогідний розвиток інфекційного артриту, який може виникнути як новий патологічний стан, пов'язаний з COVID-19. Враховуючи хронічний характер артритів, який спричинює порушення структурно-функціонального стану суглобів та з часом часто призводить до втрати працездатності та інвалідизації хворих, необхідно вивчати механізми їх виникнення та розвитку у людей на фоні коронавірусної інфекції. Це дозволить вчасно встановити діагноз та почати лікування, що знизить розвиток рецидивів артритів та збереже здоров'я суглобів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Використані матеріали та реактиви

У проведених експериментах нами було застосовано наступні матеріали та реактиви: комерційний тест-набір «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» (Thermo Scientific, Литва), 2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфопеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксанілід (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, ХТТ), о-фенілендіамін, сорбітол, нітросиній тетразолій (НСТ), ксиленол помаранчевий натрієва сіль, супероксиддисмутаза, додецилсульфат натрію (ДСН), 2-тіобарбітурова кислота (ТБК), 2,4-динітрофенілгідразин (2,4-ДНФГ), етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) (Sigma-Aldrich Co. LLC, США); фенол (Fluka AG, Швейцарія), трис(гідроксиметил)амінометан, трис(гідроксиметил)амінометан HCl, нікотинамідеаденіндинуклеотид гідрид (НАДН), Твін-20 (полісорбат 20), NERES, 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойна кислота (ДТНБК), гуанідин ізотіоціанат (Merck, Німеччина), комерційні набори для визначення ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12 β , ФНП- α , ІФ- γ , ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 і ММП-10, тканинного інгібітору металопротеїнази-1 (ТІМП-1) та COMP (Biotrak ELISA System; Sigma Aldrich, США), агароза LE (Gibco, Німеччина), етидіум бромід, Coomassie Brilliant Blue G250 (AppliChem, Німеччина); хлорид магнію, 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфати (дНТФ), RiboLock, Taq ДНК-полімераза, RevertAid M-MLV зворотна транскриптаза (Fermentas, Литва). Інші реактиви (гептан, гідрофосфат натрію однозаміщений, гідрофосфат натрію двозаміщений, гідрофосфат калію одно заміщений, етиловий спирт, лаурилсаркозинат натрію, хлороформ, ізопропіловий спирт, ізоаміловий спирт, сечовина, β -меркаптоетанол, карбонат натрію, гідрокарбонат натрію, гідроксид натрію, гідрохлоридна кислота, сульфатна кислота, молібдат амонію, пероксид водню, реактив Фоліна, сульфат міді, трихлороцтова кислота (ТХО),

феназинметасульфат (ФМС), хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, цитрат натрію, сульфат амонію, сульфат заліза, ацетат кальцію, ацетат натрію, оцтова кислота, етилацетат, диметилсульфоксид) були вироблені в Україні та характеризувалися кваліфікацією «чистий для аналізу» та «хімічно чистий».

2.2. Обладнання

У всіх проведених експериментальних дослідженнях використовували наступні прилади: спектрофотометр (SmartSpec Plus, BioRad, США), мікропланшетний спектрофотометр (μ Quant BioTek Instruments, BioTek, США), автоматичний хемілюмінесцентний імуноаналізатор (Maglumi 1000, Snibe Co., Ltd., Китай), ампліфікатор Techne TC-412 (Techne, США), центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), центрифуга з охолодженням Sigma 1-15 K (Sigma, Франція), центрифуга CM-6M (ELMI, Латвія), центрифуга Allegra (Beckman Coulter, США).

Всі інші прилади (магнітні мішалки з підігрівом, струшувач лабораторний для пробірок, автоматичні піпетки-дозатори змінного та сталого об'єму, термостати, вібраційні лабораторні змішувачі тощо) належать до лабораторних виробів компаній, які дотримуються виготовлення продукції згідно стандарту якості ISO 9001. Лабораторне приладдя з пластику (склянки, лійки, мікропробірки типу Еппендорф, центрифужні конічні пробірки, ванни для піпеток-дозаторів, мікропланшети для імуноферментного аналізу (ІФА), контейнери для хімічних рактивів тощо) постачалося компанією Sente-Lab. Лабораторне приладдя зі скла (склянки, колби, віали, лійки, хімічні пробірки, циліндри, склянки для зважування, чаши Петрі, палички для змішування тощо) мало виробництво від компанії SIMAX Ukraine LTD (Чехія).

Всі прилади, які перебували в експлуатації при виконанні науково-дослідних експериментів, обов'язково підлягали контрольному вимірюванню метрологічних характеристик.

2.3. Умови проведення експерименту

Всі експериментальні дослідження проводились на людях-добровольцях. Всього в даному експерименті взяли участь 46 пацієнтів.

Всіх учасників даного дослідження було розділено на три групи, в кожній когорті середній вік пацієнтів був однаковим та складав 50 років.

Перша група була сформована з умовно здорових людей, їх кількість дорівнювала 15.

Друга група складалась з пацієнтів, що мали встановлений діагноз «остеоартрит колінних суглобів II–III ступеня». В даній експериментальній групі пацієнти обов'язково перевірялись на відсутність коронавірусної інфекції: проводився епідеміологічний анамнез для кожної людини та відсутність можливих контактів з пацієнтами, що хворіли на COVID-19. Кількість людей у даній групі складала 22 особи.

Третя експериментальна група формувалась із пацієнтів, яким був встановлений діагноз «остеоартрит колінних суглобів II–III ступеня» та які впродовж останніх 6–9 місяців перехворіли легкою або середньотяжкою формою COVID-19. Для таких пацієнтів підтвердження діагнозу COVID-19 базувалось на проведенні молекулярного аналізу (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) зразків мазків із носоглотки. Кількість людей у даній групі складала 14 осіб.

Всі пацієнти перебували на стаціонарному або амбулаторному етапах лікування в спеціалізованому ортопедичному медичному центрі «Ортоклініка» (м. Тернопіль, Україна). На етапі відбору усім хворим проводили збір анамнезу захворювання, повне фізикальне обстеження та виявлення потенційно діагностичних параметрів для підтвердження діагнозу «остеоартрит колінних суглобів II–III ступеня». Зокрема, кожному пацієнту були зроблені рентгенографічні дослідження колінних суглобів. Також із використанням

опитувальника, який містив 24 запитання, пацієнти самостійно оцінювали функціональний стан опорно-рухового апарату за такими параметрами: вираженість та тривалість больових відчуттів як у стані спокою, так і при роботі суглоба (5 питань), інтенсивність та тривалість скутості суглоба (2 питання) і відсутність достатньої функціональності суглобу у повсякденному житті (17 питань). На базі цих відповідей розраховували індекс WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index), який є інформативним показником оцінки стану суглобів [207].

Для документального підтвердження того, що учасники дослідження добровільно погодилися взяти участь у проведеному експериментальному дослідженні, було проведено ознайомлення та підписання ними відповідної форми інформованої згоди. Пацієнти отримали повну інформацію про характер запланованих експериментальних досліджень, в яких вони будуть приймати участь.

В усіх проведених експериментах було дотримано основних положень «Правил етичних принципів проведення наукових медичних досліджень за участю людини», затверджених Гельсінською декларацією (1964-2013 рр.), ІСН GCP (1996 р.), Директиви ЄЕС № 609 (від 24.11.1986 р.), наказів МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р., № 944 від 14.12.2009 р., № 616 від 03.08.2012 р. та схвалено Комітетом з етики спеціалізованого ортопедичного медичного центру «Ортоклініка» (м. Тернопіль, Україна). Повністю було дотримано всіх заходів безпеки, конфіденційності та захисту медичних даних пацієнтів.

Збирання біологічного матеріалу пацієнтів здійснювалось на базі спеціалізованого медичного закладу «Ортоклініка» у місті Тернопіль, Україна.

2.4. Отримання крові та її плазми

У всіх піддослідних, які брали участь в експерименті, у клініці натщесерце робили забір крові з ліктьової вени. Для цього використовували

одноразові системи з вакуумними пробірками VACUETTE, що відповідають усім встановленим світовим стандартам безпеки.

Для отримання з крові плазми було використано фізичний метод, який базується на процесі седиментації клітин крові, при цьому плазма залишається у верхній частині пробірки. Для цього нами було використано процес центрифугування пробірок, який тривав 15 хвилин при доцентровому прискоренні, що дорівнювало 2000 g.

2.5. Визначення концентрації С-реактивного білка

Для визначення у плазмі крові концентрації С-реактивного білка (СРБ) використовували кінетичний метод за умов фіксованого часу за відповідним стандартом [265].

Згідно використаної методики, частинки латексу, вкриті специфічним антилюдськими антитілами СРБ, аглютинуються при змішуванні зі зразками, що містять СРБ. Аглютинація викликає зміну поглинання залежно від концентрації СРБ у біологічному зразку пацієнта, яку можна кількісно визначити шляхом порівняння з калібратором СРБ з відомою концентрацією. Визначення екстинкції зразків проводили при довжині хвилі 540 нм.

Визначення концентрації СРБ ($C_{\text{СРБ}}$) проводили за концентрацію калібратора згідно представленої формули:

$$C_{\text{СРБ}} = \frac{(A_0 - A_1)_{\text{зразка}}}{(A_0 - A_1)_{\text{калібр}}} \times C_{\text{калібр}} \quad (2.1)$$

де A_0 – абсорбція через 3 с, A_1 – абсорбція через 120 с, $C_{\text{калібр}}$ – концентрація калібратора, одиниці.

У плазмі крові концентрацію С-реактивного білка представляли у $\text{мг} \times \text{л}^{-1}$.

2.6. Визначення концентрації молекул середньої молекулярної маси

Концентрацію молекул середньої молекулярної маси у плазмі крові визначали згідно методу [115] з певними модифікаціями. В основу методу покладено процес осадження високомолекулярних пептидів та білків крові за допомогою денатуруючого агента – ТХО, після чого проводиться кількісне вимірювання в надосадовій рідині молекул середньої молекулярної маси за поглинанням світла при оптичній довжині хвилі 254 нм.

На першому етапі у конічні пробірки вносили 1 мл плазми крові та додавали 0,5 мл 10 % розчину ТХО. Проби добре перемішували, після чого центрифугували упродовж 30 хвилин при доцентровому прискоренні 1500 g. Далі з пробірок відбирали 0,5 мл надосадової рідини та переносили у хімічні пробірки. Додавали до проб по 4,5 мл дистильованої води та добре перемішували вміст пробірок.

Після цього на спектрофотометрі визначали екстинкцію досліджуваних зразків при довжині хвилі (λ) 254 нм. В якості оптичного контролю використовували дистильовану воду. Концентрацію молекул середньої молекулярної маси виражали в ум. од. $\times \text{мг білка}^{-1}$.

2.7. Визначення концентрації цитокінів, матриксних металопротеїназ, тканинного інгібітору металопротеїнази-1 та хрящового олігомерного матриксного білка

Рівні окремих цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12 β , ФНП- α та ІФ- γ), матриксних металопротеїназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 і ММП-10), тканинного інгібітору металопротеїнази-1 (ТІМП-1) та хрящового

олігомерного матричного білка (COMP) вимірювали в плазмі крові за допомогою твердофазного імуоферментного аналізу (ІФА) відповідно до вказівок, вказаних виробником.

Досліджувані зразки плазми крові в об'ємі 0,1 мл у розведенні 1:10 буфером трис-НСl, рН 7,4, інкубували в 96-лункових планшетах для ІФА протягом 12 годин при температурі, що становила 4°C. Після промивання планшети блокували 5%-вим знежиреним сухим молоком і надалі інкубували протягом 1 год. при температурі, що дорівнювала 37°C, зі специфічними первинними поліклональними антитілами (Санта-Круз, Каліфорнія, США) проти цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12 β , ФНП- α та ІФ- γ), матричних металопротеїназ (ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 і ММП-10), ТІМП-1 та COMP.

Після цього планшети промивали та інкубували протягом 1 години при температурі 37°C з відповідними вторинними антитілами, які були кон'юговані з ферментом – пероксидазою хрому (Bio-Rad, Hercules, CA, США). Як субстрат для перебігу пероксидазної реакції було використано о-фенілендіамін / пероксид водню (Sigma Aldrich, США). Для зупинення реакції додавали 2,5 н сірчану кислоту.

На мікропланшетному спектрофотометрі проводили вимірювання поглинання світла проб на планшеті при довжині хвилі 492 нм (μ Quant™; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США).

Концентрацію досліджуваних показників виражали в ум. од. \times мл⁻¹.

2.8. Визначення вмісту супероксидного радикалу

Визначення вмісту супероксидного радикалу у плазмі крові проводили за накопиченням 2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксамід (ХТТ)-формазану [9]. Даний метод базується на спроможності супероксидних радикалів взаємодіяти із ХТТ, в результаті чого формується

розчинний забарвлений комплекс. Даний комплекс ХТТ-формазану характеризується максимумом у спектрі поглинання при 470 нм.

У хімічну пробірку вносили зразок крові (0,2 мг загального білка) та 0,15 М калій-фосфатний буферний розчин (рН = 7,4), у складі якого містився 0,2 мМ НАДН. Загальний об'єм проби дорівнював 1 мл. Далі до проби вносили 0,5 мл 10 мМ розчину ХТТ. Проби добре перемішували. Зразу ж після перемішування проводили визначення оптичної густини дослідних проб при довжині хвилі (λ) 470 нм. Потім три рази кожні 10 хвилин проводили повторне визначення екстинкції досліджуваних зразків. Як оптичний контроль використовували пробірку, в яку вносили лише 1 мл буферного розчину без біологічного зразка.

Після вимірювання екстинкцій проби проводили розрахунок різниці між вимірними показниками (ΔE). Обов'язково для визначення вмісту радикалів супероксиду при утворенні комплексу ХТТ-формазану до кожної проби вносили 100 U фермента супероксиддисмутази, розчиненого у відповідному буферному розчині.

Розрахунок вмісту комплексу ХТТ-формазан у досліджуваних зразках проводили згідно формули:

$$C = \frac{\Delta E}{\varepsilon \times a} , \quad (2.2)$$

де a – вміст загального білка у пробі, мг; ε – коефіцієнт мілімолярної екстинкції, що становить $2,16 \times 10^4 \text{ см}^{-1} \times \text{M}^{-1}$.

Результати вмісту супероксидного радикалу у пробі представляли у моль ХТТ-формазану \times мг білка⁻¹.

2.9. Визначення вмісту пероксиду водню

Визначення вмісту пероксиду водню у плазмі крові базується на здатності його молекули вступати в хімічну реакцію із сорбітолом. Продуктом

даної хімічної реакції є пероксильний радикал. Він здатний у кислому середовищі перетворювати двовалентне залізо (Fe^{2+}) у трьохвалентне залізо (Fe^{3+}). Тому в пробі при використанні кислого розчину (розчин сульфатної кислоти) утворені іони трьохвалентного заліза (Fe^{3+}) при взаємодії з барвником ксиленол помаранчевим здатні формувати забарвлений комплекс, що характеризується максимумом поглинання світла у діапазоні довжин хвиль від 540 до 580 нм [151].

Перед проведенням визначення (*ex tempore*) готували робочий реактив, який містив у складі розчин А (25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ на 2,5 М H_2SO_4) та розчин Б (100 мМ сорбітол + 125 мкМ ксиленол помаранчевий). Розчин А до розчину Б брали у співвідношенні 1:100, після цього готовий робочий реагент добре перемішували.

У хімічну пробірку вносили буферний розчин 50 мМ калій-фосфату (рН = 6,0), а також аліквоту плазми крові (0,3 мг загального білка). Загальний об'єм досліджуваної проби дорівнював 0,4 мл. Як контроль використовували буферний розчин загальним об'ємом 0,4 мл. Далі в кожену пробірку вносили 2 мл робочого розчину та добре перемішували. Після цього всі проби інкубували при кімнатній температурі упродовж 20 хв. Після припинення інкубації проводили визначення екстинції зразків при довжині хвилі (λ) від 540 до 580 нм.

Розрахунок вмісту пероксиду водню у пробі проводили з використанням калібрувального графіка. Вміст пероксиду водню в зразку виражали у мкмоль \times мг білка⁻¹.

2.10. Визначення концентрації дієнових кон'югатів та шиффових основ

Для приготування проби в скляний гомогенізатор Поттера вносили 0,1 мл плазми крові та 5 мл суміші гептан / ізопропанол у співвідношенні 1:1.

Після цього пробу обережно і ретельно гомогенізували упродовж 10 хв. На наступному етапі гомогенізовану суміш переносили у конічну скляну пробірку та закривали гумовою кришкою. Проби центрифугували при доцентровому прискоренні 1000 g упродовж 15 хв при кімнатній температурі.

У хімічні пробірки відбирали надосадову рідину та вносимо 0,5 мл дистильованої води. Проби інтенсивно перемішували. Відбувалося розділення між гептановою та ізопропіловою фазами. Обережно відбирали гептанову фазу, яка знаходилася у верхній частині пробірки. Використовували її для вимірювання вмісту шиффових основ у пробі. Визначення проводили на флуориметрі за наступних умов: довжина хвилі збудження дорівнювала 360 нм та довжина хвилі емісії – 420 нм [281].

Для розрахунку вмісту шиффових основ у зразку використовували формулу:

$$C = \frac{A}{a}, \quad C = \frac{A}{a} \quad (2.3)$$

де C – вміст шиффових основ, A – екстинкція проб, a – вміст білка в пробі, мг.

Вміст шиффових основ виражали в ум. од. \times л⁻¹.

Далі проводили вимірювання вмісту дієнових кон'югатів згідно методу [69]. Для цього брали хімічні пробірки, в які вносили 0,3 мл гептанової фази, що ми відібрали раніше. До неї додавали 1,5 мл 96 % етилового спирту. Суміш в пробірці добре перемішували.

На спектрофотометрі проводили визначення екстинкції проб в ультрафіолетовому спектрі при довжині хвилі $\lambda=233$ нм. Для розрахунку вмісту дієнових кон'югатів використовували значення молярного коефіцієнту екстинкції для спряжених дієнів, які утворюють поліненасичені жирні кислоти: $2,2 \times 10^5$ см⁻¹М⁻¹. Розрахунок вмісту дієнових кон'югатів у пробі проводили згідно формули:

$$C = \frac{A}{\varepsilon \times a} \quad (2.4)$$

де C – вміст дієнових кон'югатів, A – екстинкція проб, ε – молярний коефіцієнт екстинкції при $\lambda=233$ нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот, a – вміст білка в пробі, мг.

Концентрацію дієнових кон'югатів в зразку виражали в ммоль \times л⁻¹.

2.11. Визначення концентрації ТБК-активних продуктів

Визначення вмісту ТБК-активних продуктів проводили з використанням тіобарбітурової кислоти (ТБК) [262]. У хімічну пробурку вносили аліквоту плазми крові (0,5 мг загального білка) та додавали буферний розчин (25 мМ трис-НСl, 175 мМ КСl, рН=7,4). Для осадження білків біологічного зразка у пробірки додавали 0,2 мл 17 % ТХО. Пробірки добре перемішували та центрифугували при доцентровому прискоренні 1000 g упродовж 15 хвилин при кімнатній температурі. Після цього відбирали у нові хімічні пробірки над осадову рідину в об'ємі 0,5 мл та додаємо 0,25 мл 0,8 % ТБК. Вміст пробірок перемішували та ставили інкубуватися на водяній бані при температурі 100°C упродовж 15 хвилин.

Після інкубації проби охолоджували до кімнатної температури. Потім за допомогою спектрофотометра проводили вимірювання інтенсивності забарвлення розчинів у пробірках при довжині хвилі 532 нм.

Для розрахунку вмісту ТБК-активних продуктів використовували значення величини молярного коефіцієнта екстинкції комплексу маленового діальдегіду з ТБК, яке дорівнювало $1,56 \times 10^5$ моль⁻¹.

Потім згідно формули визначали вміст ТБК-активних продуктів у зразку:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{a_{\text{мг}} \times 1,56 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}} \quad (2.5)$$

$E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{досл}} \times 100 \times t \times a}$ де C – вміст ТБК-активних продуктів, $E_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної проби, a – вміст білка в пробі, мг.

Вміст ТБК-активних продуктів у зразку виражали в ммоль \times л⁻¹.

2.12. Визначення вмісту продуктів окисної модифікації білків

Вміст утворених окиснених білкових продуктів визначали згідно методу [219]. В основі методу – взаємодія між альдегідними і кетонними групами амінокислот білків та 2,4-динітрофенілгідразину (2,4-ДНФГ), що призводить до утворення похідних 2,4-ДНФГ, які можуть мати альдегідну або кетонну природу. Їх максимуми поглинання перебувають в наступних межах: 230–558 нм – нейтральні альдегідні похідні 2,4-ДНФГ, 428–530 нм – основні альдегідні похідні 2,4-ДНФГ, 363–367 нм – нейтральні кетонні похідні 2,4-ДНФГ, 524–535 нм – основні кетонні похідні 2,4-ДНФГ. За допомогою даних піків поглинання світла розчинами похідних 2,4-ДНФГ можна визначати окиснені білки у біологічних зразках.

У хімічну пробірку вносили аліквоту плазми крові (0,5 мг загального білка) та додавали розчин фосфатного буферу (рН = 7,4). Вміст пробірки перемішували та інкубували в термостаті при температурі 37°C упродовж 15 хвилин. Після завершення інкубації додавали 1 мл розчину 2,4-

динітрофенілгідразину. Проби перемішували та потім інкубували при температурі 37°C упродовж 45 хвилин.

На наступному етапі до проби додавали 1,5 мл 20 % розчину трихлороцтової кислоти. Далі проби центрифугували при доцентровому прискоренні 1000 g упродовж 15 хвилин. Надосадову рідину зливали та до осаду додаємо етанол-етилацетатну суміш у співвідношенні 1:1. Після промивання осади підсушували. Після цього осад розчиняли в 8 М розчині сечовини. Далі проби кип'ятили на бані упродовж 5 хвилин.

Визначення продуктів окисної модифікації білків проводили на спектрофотометрі при відповідних максимумах поглинання оптичної густини світла: при $\lambda = 356$ нм – альдегідні продукти нейтрального характеру, при $\lambda = 370$ нм – кетонні продукти нейтрального характеру, при $\lambda = 430$ нм – альдегідні продукти основного характеру та $\lambda = 530$ нм – кетонні продукти основного характеру.

Вміст продуктів окиснення білків виражали в ум. од. \times мг білка⁻¹.

2.13. Визначення концентрації загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних груп

Кількісна оцінка вмісту сульфгідрильних груп базується на методі, запропонованому Елманом [91]. В його основі взаємодія між 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБК) із білок-зв'язаними та вільними сульфгідрильними групами, що призводить до формування тіонітрофенільного аніону. Його вміст визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 412 нм, і він є пропорційним вмісту сульфгідрильних груп, які містяться у досліджуваному зразку.

При дослідженні загального вмісту сульфгідрильних груп у хімічну пробірку вносили 0,3 мл плазми крові, 2 мл 30 мМ буферного розчину трис-НСІ з 1 мМ ЕДТА (рН = 8,0) та 0,2 мл 1,25 % розчину ДСН. Проби перемішували та

інкубували при кімнатній температурі упродовж 15 хвилин. Далі до пробірки додавали 0,1 мл розчину ДТНБК. Проби перемішували та залишали при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин.

Після зазначеного періоду інкубації проводили визначення оптичної густини досліджуваних зразків на спектрофотометрі при довжині хвилі 412 нм. Як оптичний контроль використовували суміш наступного складу: 2,3 мл буферного розчину трис-НСІ з 1 мМ ЕДТА, 0,2 мл 0,1 % ДСН та 0,1 мл ДТНБК. Для визначення вмісту сульфгідрильних груп використовували калібрувальний графік. Вміст сульфгідрильних груп виражали в ммоль \times мг білка⁻¹.

При дослідженні вмісту небілкових SH-груп до хімічної пробірки додавали 0,3 мл плазми крові та 0,1 мл 10,5 % розчину ТХО. Вміст пробірки перемішували та інкубували при кімнатній температурі впродовж 10 хвилин. Після цього досліджувані проби центрифугували при доцентровому прискоренні 1000 g упродовж 15 хвилин.

У нові хімічні пробірки відбирали надосадову рідину та додавали 1М розчин NaOH для нейтралізації проби. Потім до проби додавали 2,1 мл 30 мМ буферного розчину трис-НСІ з 1 мМ ЕДТА (рН = 8,0) та 0,1 мл розчину ДТНБК. Проводили визначення оптичної густини досліджуваних зразків при довжині хвилі 412 нм.

Визначення концентрації білок-зв'язаних сульфгідрильних груп здійснювали за формулою:

$$C_{\text{білкові}} = C_{\text{загальні}} - C_{\text{небілкові}} \quad (2.6)$$

Концентрація білок-зв'язаних SH-груп виражали в мкмоль \times мг білка⁻¹.

2.14. Визначення супероксиддисмутазної активності

Визначення супероксиддисмутазної активності у плазмі крові проводили згідно методу [88]. Він ґрунтується на тому, що фермент супероксиддисмутаза здатна конкурувати з молекулою нітросинього тетразолію (НСТ) за супероксидні радикали. Утворення супероксидних радикалів відбувається при аеробній взаємодії між НАДН та феназинметасульфатом (ФМС). Внаслідок перебігу даної хімічної реакції відбувається відновлення НСТ та утворення гідразинтетразолію. За умов наявності у пробі ферменту супероксиддисмутази спостерігається зменшення відсотків відновлення НСТ.

У хімічну пробірку вносили 0,05 мл плазми крові (0,5 мг загального білка) та 2 мл реагенту I, який містив: 57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буферному розчині з ЕДТА, рН=7,8).

На спектрофотометрі проводили визначення екстинкції досліджуваних зразків при довжині хвилі 540 нм. Після вимірювань екстинкції у пробу вносили 0,1 мл реагенту II, що містив: 98,5 мкМ НАДН на буферному розчині трис-ЕДТА, рН=8,0. На наступному етапі досліджувані проби інкубували при температурі 30°C 10 хвилин. Після інкубації на спектрофотометрі знову проводили визначення оптичної густини досліджуваних зразків при довжині хвилі 540 нм.

Значення супероксиддисмутазної активності розраховували згідно формули:

$$E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{досл}} \times 100 \times t \times a}, \quad E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{досл}} \times 100 \times t \times a} \quad (2.7)$$

$E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{досл}} \times 100 \times t \times a}$ де E – супероксиддисмутазна активність, $\Delta E_{\text{нул}}$ – нульова екстинція проби – до додавання реагенту II, $\Delta E_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної проби

після додавання реагенту II, 50/100 – 50 % інгібування реакції процесу відновлення НСТ, a – вміст білка в пробі, мг, t – час інкубації 10 хвилин.

Супероксиддисуатазну активність виражали в ум. од. \times хв⁻¹ \times мг білка⁻¹.

2.15. Визначення каталазної активності

Визначення каталазної активності проводили згідно методу [113]. Даний метод ґрунтується на здатності фермента каталази перетворювати такий субстрат як пероксид водню на молекулу води та кисень. Якщо у розчині залишається нерозщеплений каталазою субстрат (пероксид водню), він вступає у хімічну реакцію з солями молібдену, що призводить до утворення забарвленого комплексу, що має стійке забарвлення.

У першу хімічну пробірку (дослідна проба) вносили 2 мл 0,03 % розчину пероксиду водню та додаємо 0,1 мл плазми крові. У другу хімічну пробірку (холоста проба) вносили 2 мл 0,03 % розчину пероксиду водню та додаємо 0,1 мл дистильованої води.

У третю хімічну пробірку (оптичний контроль) вносили 2,1 мл дистильованої води. Всі проби інкубували при кімнатній температурі впродовж 10 хвилин. Після цього вносили в кожную пробірку 1 мл 4 % молібдату амонію для зупинки реакції між каталазою та пероксидом водню. Після цього проводили визначення оптичної густини проб на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм.

Значення каталазної активності розраховували згідно формули:

$$E = \frac{A_{хол} - A_{досл}}{a \times t \times K} \quad (2.8)$$

де E – каталазна активність, $A_{\text{хол}}$ – екстинція холостої проби, $A_{\text{досл}}$ – екстинція дослідної проби, a – вміст білка в пробі, мг, t – час інкубації, 10 хв., K – коефіцієнт мілімолярної екстинції пероксиду водню: $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

Каталазну активність виражали в $\text{мкмоль} \times \text{хв}^{-1} \times \text{мг білка}^{-1}$.

2.16. Визначення концентрації білка

Концентрацію білка у плазмі крові визначали згідно методу Лоурі [196]. Даний метод ґрунтується на перебігу двох хімічних реакцій: перша реакція – взаємодія ароматичних амінокислот з реагентом Фоліна, що призводить до утворення забарвлених продуктів; друга реакція – біуретова реакція на пептидні зв'язки у первинній структурі білка.

У хімічну пробірку (дослідна проба) вносили 0,4 мл плазми крові (попередньо розведеної в 20 разів) та 2 мл реактиву С, який готували *ex tempore*. Реактив С складався з двох реагентів: 10 мл реактиву А (1 г Na_2CO_3 + 200 мг NaOH на 50 мл дистильованої води) та 0,2 мл реактиву В (250 мг $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ на 50 мл дистильованої води). У хімічну пробірку (контрольна проба) вносили 0,4 мл дистильованої води та 2 мл реактиву С. Всі проби добре перемішували та термостатували при кімнатній температурі 10 хвилин.

На наступному етапі до кожної проби вносили 0,2 мкл реактиву Фоліна та знову проби добре перемішували. Проби термостатували при кімнатній температурі 30 хв. Після цього на спектрофотометрі вимірювали екстинкцію проб при довжині хвилі 750 нм.

Для розрахунку концентрації білка у пробі використовували попередньо побудований калібрувальний графік. Концентрацію білка виражали в $\text{мкг} \times \text{мл}^{-1}$.

2.17. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

2.17.1. Виділення загальної РНК

Із клітин крові проводили виділення РНК згідно методу [63].

У мікропробірку типу Еппендорф вносили 0,2 мл цільної крові (обов'язково з антикоагулянтом) та додавали 1 мл розчину D, що містив наступні компоненти: гуанідин ізотіоціанат, β -меркаптоетанол, лаурилсаркозинат натрію. Пробі добре перемішуємо.

На наступному етапі мікропробірки переносимо на лід та до кожної пробі вносимо 0,1 мл 2 М розчину ацетату натрію. Пробі добре перемішували. До кожної пробі додавали по 1 мл фенолу та перемішували суміш. Потім до проб вносили 0,2 мл суміші хлороформ : ізоаміловий спирт у співвідношенні 1:1. Пробі добре перемішували. Далі проводили інкубацію проб на льоду впродовж 15 хвилин.

На наступному етапі пробі центрифугували при доцентровому прискоренні 10000 g впродовж 20 хвилин. В нові мікропробірки дуже обережно відбирали надосадову рідину та вносили 1 мл ізопропілового спирту. Пробі добре перемішували. Проводили інкубацію проб при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 1 години.

На наступному етапі проводили центрифугування проб при доцентровому прискоренні 10000 g впродовж 20 хвилин. Далі надосадову рідину зливали, а осад, що залишився, розчиняли в 0,3 мл розчину D. Після цього вносили в суміш 0,3 мл ізопропілового спирту. Інкубували пробі при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 1 години. Проводили центрифугування проб при доцентровому прискоренні 10000 g впродовж 20 хвилин. Надосадову рідину зливали.

До осаду в мікропробірці обережно вносили 2 мл 70 % етилового спирту. Пробі добре перемішували. Проводили центрифугування проб при доцентровому прискоренні 10000 g впродовж 2 хвилини.

На наступному етапі надосадову рідину зливали. До осаду в мікропробірці обережно вносили 2 мл 96 % етилового спирту. Проби добре перемішували. Проводили центрифугування проб при доцентровому прискоренні 10000 g впродовж 2 хвилин. Надосадову рідину зливали.

Мікропробірки типу Еппендорф залишали з відкритими кришечками на 5 хвилин для підсушування отриманих осадів, що містять РНК. Після цього загальну РНК, що ми отримали, розчиняли в 0,1 мл автоклавованої охолодженої дистильованої води. Далі вносимли у пробу 0,25 мл 96 % етилового спирту та перемішували. Отримані проби з виділеною загальною РНК зберігали у морозильній камері при температурі -20°C .

2.17.2. Оцінка рівнів експресії генів

Нами було проведено синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) з використанням комерційної тест-системи «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва). У роботі було використано: 0,4 мкмоль/л кожного праймера та 2 мкл виділеної РНК, що становило 2 мкг. Для проведення визначення експресії генів ми використовували наступні умови (рекомендації від фірми-виробника):

1. При синтезі кДНК – використовували температуру 50°C та тривалість процесу 30 хвилин.
2. Ініціююча денатурація – використовували температуру 95°C та тривалість процесу 15 хвилин.
3. Наступні 40 циклів: денатурації ДНК використовували температуру 95°C та тривалість процесу 15 секунд.
4. Гібридизація праймерів – використовували температуру 50°C та тривалість процесу 35 секунд.

5. Добудова ланцюга – використовували температуру 72 °C та тривалість процесу 30 секунд.

6. Елонгація ампліфікатів – використовували температуру 72 °C та тривалість процесу 5 хвилин.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів:

для *COMP*: прямий – AAGTGGGCTACATCA-GGGTG та зворотний – GTGTCATTGCAGC-GGTAACG;

для *FOXO1*: прямий – GGCGGGCTGGAAGAATTCAAT та зворотний – CTCTTGCCACCSTCTGGATTGA;

для *LRP1*: прямий – TGGCACAGACCGGAAGATTG та зворотний – CGTTCCAAGCGGTAGACACT;

для *NFKB1*: прямий – TGGGAAGGCCTGAACAAATG та зворотний – TGAAGGTATGGGCCATCTGT;

для *NOS2*: прямий – GTGTTCCACCAGGAGATGTTG та зворотний – CTCCTGCCCCACTGACTTCGTC;

для *OLR1*: прямий – GTGACTGCTTCACTCTCTCATTT та зворотний – GGCACCACCATGGAGAGTAA;

для *PTGS2*: прямий – TGCTGTTCCAACCCATGTCA та зворотний – TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT;

для *TGFB1*: прямий – TTGAGCCGTGGAGGGGAAATT та зворотний – AGGCCGGTTCATGCCATGAAT;

для *ACTB* (ген β-актину, що використовується для нормалізації досліджень молекулярної експресії через його високу збереженість як ендогенного гена господарювання. Використовували як внутрішній контроль реакції завдяки конститутивній експресії): прямий – STTCCAGCTCCTCCCTGGAG та зворотний – CCACAGGACTCCATGCCCCAG.

Для оцінки прецизійності результатів Real-time PCR були проведені випробовування в паралельних експериментальних дослідах, з повторенням qRT-PCR на взірцях РНК хворих, з використанням 3 разів кожного праймеру.

За умов завершення циклів ампліфікації було проведено зчитування флуоресценції інтеркалюючого барвника SYBR Green I. Виконували побудову кривих плавлення вслід за проходженням qRT-PCR, щоб перевірити утворення димерів праймерів і встановлення специфічності перебіг реакції.

Підрахунок рівня експресії генів проводили з використанням порівняльного C_T методу « $\Delta\Delta C_T$ Method» [189].

Визначення ефективності ампліфікації вираховували за допомогою формули:

$$E_x = 10^{-\frac{1}{slope}} - 1 \quad (2.9)$$

де E_x – ефективність ампліфікації, slope (схил) – швидкість змінювання виходу при зміні входу, що демонструє наскільки ефективно ампліфікатор підсилює вхідний сигнал.

Виявлено, що ефективність ампліфікації була однаковою та дорівнювала 83 % (slope = -3,8). Нами було проведено унормовування відносного рівня експресії досліджуваних генів до рівня експресії *ACTB*.

2.18. Статистична обробка результатів дослідження

Для аналізу та інтерпретації отриманих нами даних у ході проведених експериментів було проведено статистичну обробку одержаних результатів. Було використано методи варіаційної статистики та застосовано комп'ютерні програми, такі як OriginLab Origin Pro 9.1 та «GraphPad Prism 8.4.3» («GraphPad Software Inc.», США).

Одержані результати були протестовані на нормальний розподіл за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Було встановлено, що усі групи донорів підпорядковуються закону нормального розподілу, тому відмінності між вибірками обраховували із застосуванням one-way ANOVA (однофакторного дисперсійного аналізу) із пост-тестом Тукея. Отримані дані представлено як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення (SD). Результати вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка ступеню запалення у крові пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли SARS-CoV2-інфекцією

Найважливішою загрозою для здоров'я людства нашої планети у 2019 році стала нова коронавірусна хвороба [187]. Серед людей, що заразилися SARS-CoV-2, найбільш уразливу групу складають пацієнти, які вже мають різні хронічні захворювання. Серед таких патологій, розповсюдженими є хвороби опорно-рухової системи, зокрема остеоартрити, на які хворіє велика частина населення. Згідно світових статистичних даних, які представляє ВООЗ, біля 70–80 % людей старше 65 років мають суглоби з рентгенологічними ознаками остеоартриту. Ця хвороба у 55–60 % таких пацієнтів характеризується клінічною симптоматикою [34, 41]. Крім фізіологічного процесу старіння, розвиток остеоартритів провокують метаболічні порушення (метаболічний синдром, ожиріння, інсулінорезистентність), інфекційні захворювання та різні травми опорно-рухового апарату [152, 218].

У наш час тригером, що може спровокувати порушення роботи опорно-рухового апарату або погіршення стану пацієнтів з остеоартритом, виявилася коронавірусна хвороба, викликана вірусом SARS-CoV-2 [94, 176, 233, 275]. У результаті перебіг остеоартриту у таких пацієнтів може стати більш серйозним та важким, що може спричинити розвиток ускладнень.

Остеоартрит належить до хвороб суглобів, що має хронічний перебіг та супроводжується поступовими дегенеративними змінами та запальними процесами в структурах суглобу. Клінічно такі пацієнти страждають на такі симптоми, як больові відчуття, набряк та обмеження рухливості суглобу, а також розвиток запальних явищ в організмі в цілому, що погіршує загальний стан. Найбільш серйозними наслідками прогресування остеоартриту є

поступова втрата рухливості суглобу, що призводить до розвитку інвалідності, депресивних станів у таких пацієнтів та їх соціальної ізоляції [331].

Запалення є важливою частиною комплексної патофізіології остеоартритів. Запальні процеси при остеоартриті характеризуються складною взаємодією між різними тканинами та міжмолекулярними шляхами всього організму. Усі тканини суглоба можуть виробляти прозапальні медіатори, сприяючи таким чином поширенню запалення низького ступеня, пов'язаного з остеоартритом. Так, зумовлюють розвиток запалення цитокіни, хемокіни та інші медіатори запальної відповіді, що синтезуються синовієм та клітинами хондроцитами. При остеоартриті хондроцити, а також клітини в синовіальній оболонці та інших суглобових тканинах стають активованими через дію аномальних впливів навколишнього середовища, у тому числі високого механічного стресу, запальних цитокінів або зміненої кількості або організації матриксних білків, включаючи продукти деградації. Активація індукованих стресом і запаленням сигнальних, транскрипційних і посттранскрипційних подій може спричинити фенотипічний зсув, апоптоз і аномальну експресію пов'язаних із запаленням генів, включаючи катаболічні гени, що спричинює руйнування структури тканин суглобу [186, 268]. Тому дослідження показників запалення є важливою складовою для оцінки інтенсивності перебігу остеоартриту.

3.1.1. Концентрація С-реактивного білка у плазмі крові

СРБ є прототипом сироваткового білка гострої фази, який швидко підвищується у відповідь на запалення. СРБ є інформативним параметром інтенсивності запальних процесів, який зв'язується з ліпідом фосфатидилхоліном і спорідненими молекулами мікроорганізмів та відіграє важливу роль у захисті організму. Рівень СРБ у крові зростає у відповідь на інфекцію, включаючи шлях комплементу, апоптоз, фагоцитоз, вивільнення

монооксиду азоту та продукування цитокінів, зокрема таких як інтерлейкін-1, інтерлейкін-6 та фактора некрозу пухлини- α [230, 260].

Відомо, що СРБ синтезується головним чином у клітинах печінки, але при цьому може продукуватись і клітинами гладеньких м'язів, макрофагами, лімфоцитами, ендотеліальними та жировими клітинами. Він утворюється у вигляді нативного СРБ, представленого гомопентамерним білоком, здатним необоротно дисоціювати в запальних та інфікованих ділянках на п'ять окремих мономерів. Тоді СРБ перетворюється на так званий мономерний СРБ (мСРБ) [293].

Літературний аналіз показує здатність мСРБ виконувати потужну прозапальну дію на клітини ендотелію та його попередники, лейкоцити та тромбоцити, та інтенсифікувати запальну відповідь [337]. У багатьох дослідженнях було показано роль СРБ як маркера гострого запалення, але також є дані, які асоціюють цей показник з розвитком хронічного запального процесу [129, 153, 162, 273]. Отже, концентрація СРБ у крові є наслідком динамічного та безперервного запального процесу, тому визначення даного показника є важливим маркером запалення в організмі.

Нами було проведено визначення концентрації СРБ у плазмі крові пацієнтів усіх експериментальних груп. Показано, що у групі пацієнтів, що мали діагноз остеоартриту колінних суглобів II-III ступеню, концентрація СРБ збільшувалась в 2 рази порівняно з групою умовно здорових людей (рис. 3.1). Виявлено, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, які переохворіли COVID-19, концентрація СРБ у плазмі крові зростала в 3,4 рази відносно контрольної групи, та в 1,7 рази порівняно групи з групою хворих на остеоартрит (рис. 3.1).

Встановлене зростання рівня С-реактивного білка у плазмі крові пацієнтів, що мали хронічне захворювання остеоартрит, є свідченням розвитку запальних процесів в організмі хворих при даній патології. Літературні дані свідчать про участь СРБ у патофізіологічних процесах формування остеоартриту у людини [129].

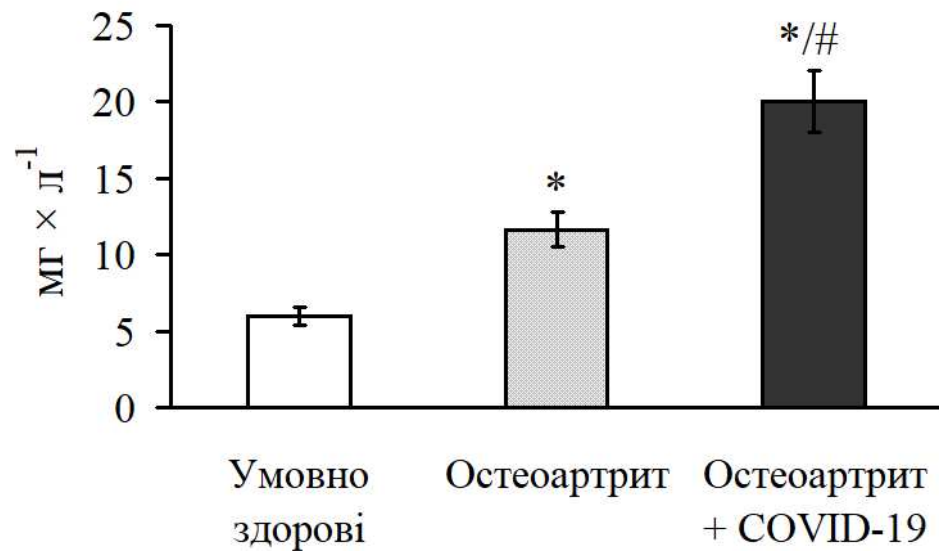


Рис. 3.1. Концентрація С-реактивного білка у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Зокрема, показано, що у пацієнтів з діагнозом остеоартрит у крові відзначались більш високі концентрації СРБ у порівнянні зі здоровими людьми; крім того, цей параметр корелював зі ступенем важкості захворювання: клінічними симптомами та ступенем ураження суглобу на рентгенівських знімках [273]. Проведені Kerkhof та співавторами популяційні дослідження [162] дозволили засвідчити дані висновки. Також дослідники висунули припущення, що рівні СРБ можна використовувати як прогностичний маркер на ранніх стадіях формування остеоартриту, який допоможе визначати ступінь важкості перебігу хвороби. Інші вчені показали у проведеному метааналізі, що рівні показника СРБ мають пряму залежність із розвитком больового синдрому та зниженням фізичної активності хворих, але не з рентгенограмою суглобів [153]. Отже, у пацієнтів, які мали прогресуючий остеоартрит, саме системні рівні СРБ відображають наскільки інтенсивно розвивається місцеве запалення суглобів. Саме концентрація СРБ у крові визначала ці зміни в суглобі, що передувало рентгенологічно-встановленому прогресуванню остеоартриту.

Виявлене нами більш інтенсивне зростання концентрації СРБ у плазмі крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит, що одужали від COVID-19, відносно групи осіб, хворих на остеоартрит, є свідченням сильнішого та інтенсивнішого запалення в організмі за умов дії інфекційного агента SARS-CoV-2.

3.1.2. Концентрація молекул середньої молекулярної маси у плазмі крові

За умов сценарію порушення перебігу метаболізму в організмі важливим біохімічним параметром, який пов'язаний з прогресією запальних процесів, є розвиток ендогенної інтоксикації. Показником інтенсивності таких порушень виступають молекули середньої молекулярної маси (від 500 до 5000 дальтон), що належать до проміжних та кінцевих продуктів метаболізму, які можуть бути токсичними для організму. За їх рівнем у біологічних рідинах та клітинах організму можна оцінювати інтенсивність таких розладів. Молекули середньої молекулярної маси складаються зі спектру гетерогенних хімічних молекул. Серед них можуть бути виявлені такі речовини, як пептиди, аміноцукри, нуклеопептиди, ендорфіни, поліаміни, багатоатомні спирти, глікопептиди, ряд регуляторів гуморальної системи (інсулін, глюкагон, вазопресин, окситоцин, адренкортикотропний гормон, ангіотензин, кальцитонін, ліпофусцин, окиснені форми ліпопротеїнів, а також певні вітаміни, олігосахариди, нуклеотиди, похідні глюкуронових кислот та інші молекули. Більша частина молекул середньої молекулярної маси ($\approx 80\%$) належать до продуктів порушеного обміну білків та деструктивних процесів, що відбуваються в тканинах. Такі речовини мають негативну дію на метаболічні процеси в організмі людини. Так, відомо, що більша частина таких молекул характеризується нейротоксичною активністю, має гальмівний ефект на процеси анаболізму, інгібує активність низки ферментів, блокує дію різних рецепторів, може роз'єднувати процеси окиснення і фосфорилування, змінювати мембранний

транспорт іонів, еритропоез, фагоцитоз, мікроциркуляцію, лімфодінаміку, а також спричинювати вторинну імунодепресію [282]. Отже, ендотоксичні сполуки, що утворюються в організмі, характеризуються високою біологічною активністю, здатністю викликати патологічні зсуви всіх функціональних систем в організмі, що в цілому буде ускладнювати перебіг основної хвороби. Таким чином, концентрацію молекул середньої молекулярної маси у крові можна використовувати як маркер інтенсивності інтоксикації різного походження, який допоможе краще оцінити тяжкість перебігу певного патологічного процесу.

Проведені нами наукові дослідження, допомогли встановити, що у пацієнтів хворих на остеоартрит колінних суглобів, у плазмі крові концентрація молекул середньої молекулярної маси збільшувалась у 1,3 раза відносно відповідних значень показників групи умовно здорових людей (рис. 3.2). Нами було показано зростання даного параметра в 1,5 раза у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом, що перенесли коронавірусну хворобу порівняно зі здоровими пацієнтами та збільшення в 1,2 раза відносно групи пацієнтів з остеоартритом (рис. 3.2).

Отримані експериментальні дані по концентрації в крові молекул середньої молекулярної маси свідчать про розвиток синдрому ендогенної інтоксикації у хворих на остеоартрит. Надмірна кількість утворених молекул середньої молекулярної маси має токсичний вплив на стан організму та може слугувати показником для визначення інтенсивності запалення. Встановлене більш інтенсивне накопичення сполук середньої молекулярної маси у плазмі крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит, які перехворіли COVID-19, свідчить про більш глибокий метаболічний дисбаланс між процесами синтезу та виведенням з організму продуктів фізіологічного обміну (пептиди, аміноцукри, гормони, нуклеотиди тощо), а також сполук порушеного метаболізму (фрагменти колагену, токсичні АФК, продукти окиснення білкових та ліпідних молекул, продукти деградації фібриногену тощо).

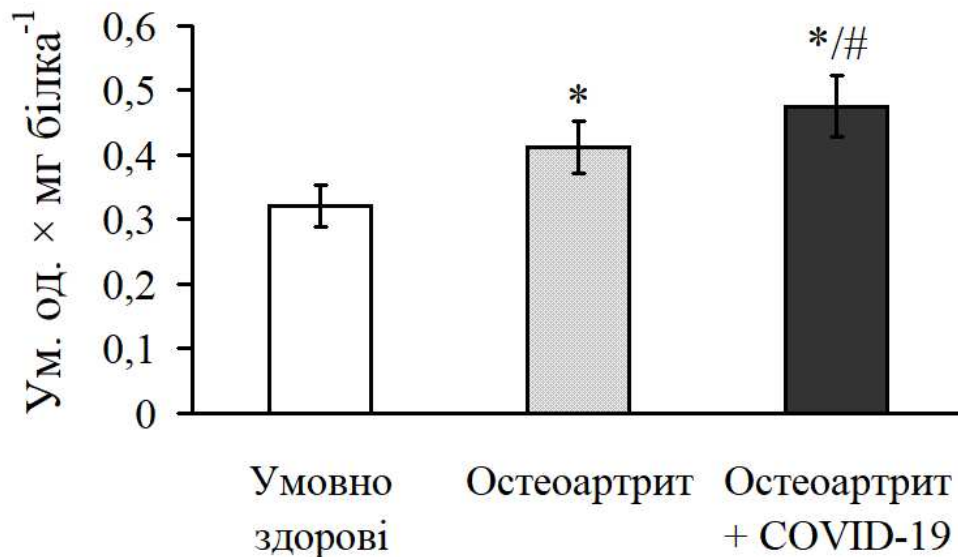


Рис. 3.2. Концентрація молекул середньої молекулярної маси та у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Наслідком накопичення надмірних концентрацій молекул середньої молекулярної маси може призвести до серйозних порушень клітинного метаболізму та порушення гомеостазу в цілому в організмі. Значною мірою це помітно проявляється при запальних процесах різної локалізації, що спричинює формування ендотоксикозу та значні порушення метаболізму в організмі [329].

3.1.3. Концентрація цитокінів у плазмі крові

Прозапальні цитокіни, включаючи ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8 і фактор некрозу пухлини альфа (ФНП- α), відіграють важливе значення у формуванні та прогресуванні остеоартритів. Вони індукують каскад запальних і катаболічних подій, включаючи експресію ММП, залучених як у розвиток запальної відповіді, так і у деградацію хряща. Процеси, що відбуваються всередині суглоба, включають не тільки катаболічні ефекти, але й протизапальні анаболічні події, які також постійно відбуваються в суглобі. Протизапальні

цитокіни (ІЛ-4 та ІЛ-10) можуть модулювати запальну відповідь та захищати тканини суглоба. Сучасні наукові дослідження спрямовані на виявлення тригерів і розуміння механізмів регуляції запалення під час виникнення та прогресування остеоартриту [332].

У важких випадках COVID-19 SARS-CoV-2 може надмірно стимулювати імунну відповідь, що призводить до синдрому вивільнення цитокінів (cytokine release syndrome), цитокінового шторму та Т-клітинної лімфопенії. Системне запалення та надмірна стимуляція імунної відповіді можуть спричинити у пацієнтів із COVID-19 зміни, подібні до остеоартриту, за відсутності такої патології [176]. В науково-медичній літературі описуються випадки розвитку тривалого ковідного синдрому, або пост-COVID-синдрому, при якому клінічні симптоми у пацієнтів зберігаються понад 12 тижнів, і відсутні інші причини для їх пояснення [175]. Патофізіологія постковідного синдрому та віддалені наслідки інфекції, спричиненої SARS-CoV-2, для здоров'я залишаються невідомими. Докази свідчать про те, що тривалі запальні процеси виконують ключове значення у патофізіології багатьох проявів постковідного синдрому [202]. Вірусна інфекція може спричинити ураження опорно-рухового апарату, що сприятиме формуванню нейропатій, міопатій, артралгій, міалгій, частота яких у період після COVID (протягом першого року після інфікування) становить у середньому 16 %, а також може спричинити потенційне пошкодження кісток і суглобів [286]. Існує думка, що провідним механізмом у формуванні больових симптомів кістково-м'язової системи в умовах постковідного синдрому є так зване «тліюче» запалення, яке розвивається внаслідок можливої тривалої персистенції вірусу SARS-CoV-2 в організмі, лімфопенія, а також підвищення рівня СРБ та ІЛ-6.

Слід зазначити, що ІЛ-6 представляє собою один із важливих медіаторів запалення при COVID-19, оскільки його рівні корелюють із вірусним навантаженням SARS-CoV-2 [332]. Дослідження механізмів порушення цитокінової регуляції запалення у хворих на остеоартрит при інфекції SARS-CoV-2, особливо у віддалених наслідках, сприятиме більш чіткому розумінню

патогенетичного зв'язку між патологіями скелетно-м'язевої системи та коронавірусною хворобою. Це, у свою чергу, дасть змогу визначити нові ефективні терапевтичні стратегії для попередження розвитку серйозних ускладнень вищевказаних патологічних станів.

Отже, наступним етапом наших досліджень стало проаналізувати рівні прозапальних: ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12 β , ФНП- α та інтерферон-гамма (ІФ- γ) та протизапальних цитокінів: ІЛ-4 та ІЛ-10 у плазмі крові осіб з остеоартритом після SARS-CoV-2 інфекції та порівняти їх із такими у здорових людей. Показано, що у плазмі крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит рівень потужного запального цитокіну ІЛ-1 β був збільшений в 1,2 раза відносно показника контрольної групи (рис. 3.3). Встановлено, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, які перехворіли COVID-19, у плазмі крові вміст ІЛ-1 β збільшувався в 1,3 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові та збільшувалась в 1,2 раза у порівнянні з показником групи осіб з діагнозом остеоартрит (рис. 3.3).

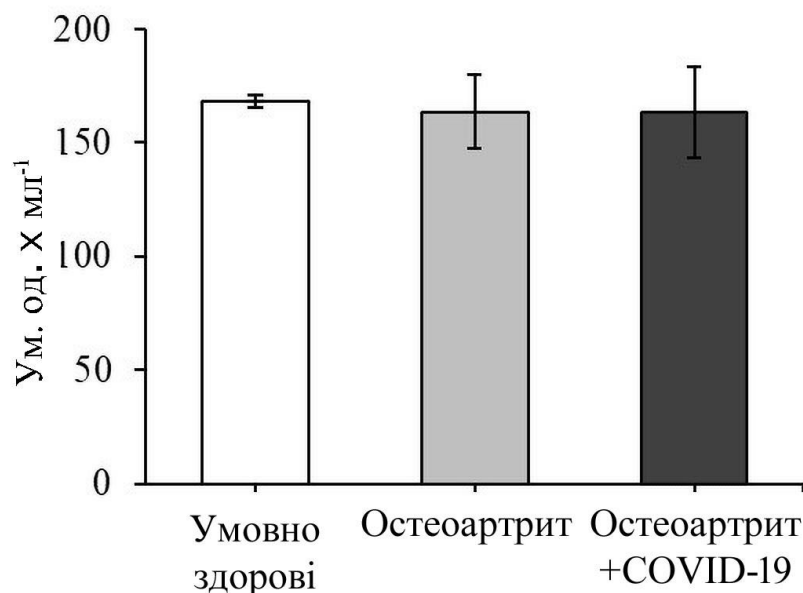


Рис. 3.3. Рівень ІЛ-1 β у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Оцінювання рівнів ІЛ-6 у плазмі крові осіб з остеоартритом показало, що значення даного показника залишалися в межах значень контролю. Подібні дані було отримано і в групі пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли коронавірусною інфекцією: не виявлено статистичних відмінностей від показників групи осіб, що були умовно здорові (рис. 3.4).

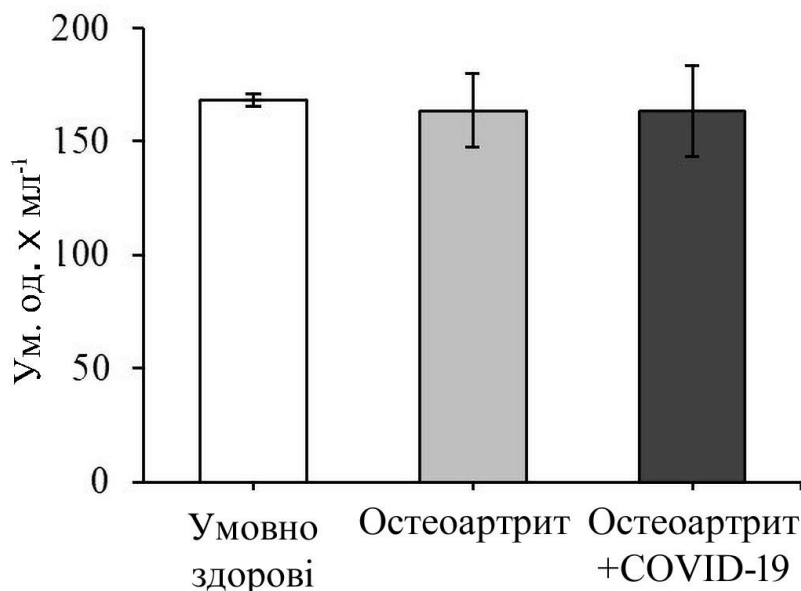


Рис. 3.4. Рівень ІЛ-6 у плазмі крові дослідних груп

Показано, що у групі осіб з діагнозом остеоартрит колінних суглобів, у плазмі крові концентрація прозапального цитокіну – ІЛ-8 знижувався в 1,6 раза відносно показників групи людей, що склали контроль (рис. 3.5).

Нами було встановлено подібні зміни даного показника у плазмі крові групи осіб з діагнозом остеоартрит, які перенесли COVID-19, порівняно з умовно здоровими людьми (рис. 3.5).

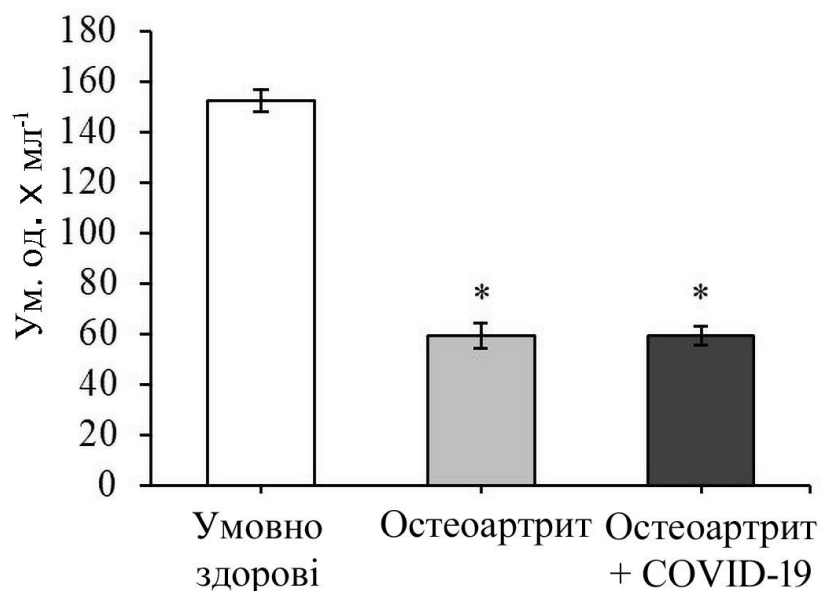


Рис. 3.5. Рівень ІЛ-8 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Наші подальші дослідження показали, що у групі пацієнтів, що мали діагноз остеоартриту колінних суглобів II-III ступеню, рівень ІЛ-12 β знижувався в 1,2 раза порівняно з групою осіб, що були умовно здорові (рис. 3.6).

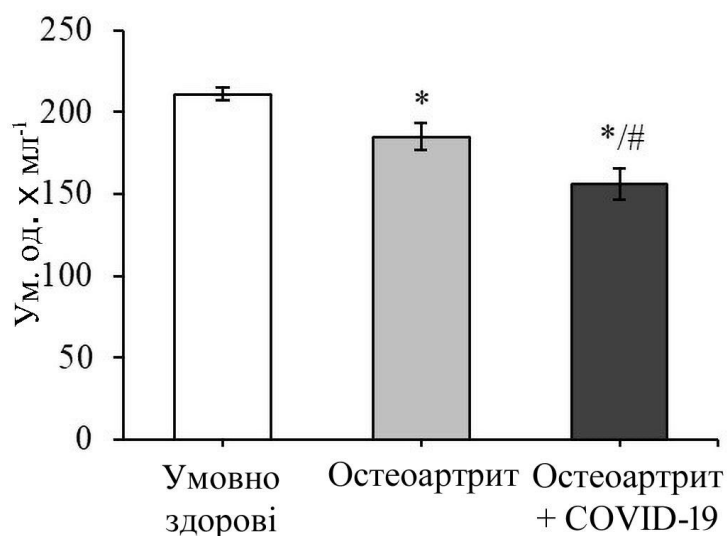


Рис. 3.6. Рівень ІЛ-12 β у плазмі крові дослідних груп; * – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Виявлено, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, що перенесли COVID-19, у плазмі крові концентрація ІЛ-12 β була знижена в 1,4 раза у порівнянні з групою осіб, що були умовно здорові та зменшувалась в 1,2 раза щодо групи людей з діагнозом остеоартрит (рис. 3.6).

Подальше виконання нами експериментів, допомогло встановити, що у групі осіб, у яких виявлене захворювання остеоартрит, у плазмі крові концентрація ФНП- α зменшувалася в 1,3 раза щодо показника групи контролю (рис. 3.7).

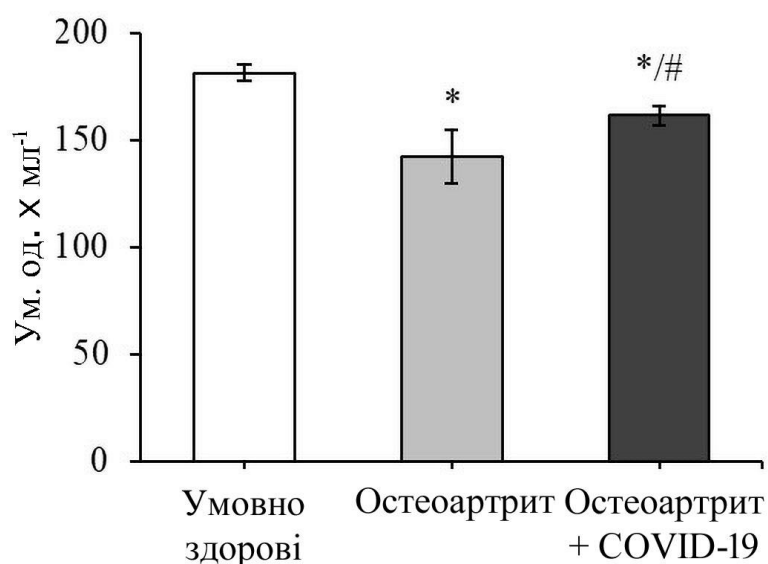


Рис. 3.7. Рівень ФНП- α у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Нами було показано падіння рівня даного параметра в 1,2 раза у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом, що перенесли коронавірусну хворобу порівняно зі здоровими пацієнтами та достовірне зростання відносно групи пацієнтів з остеоартритом (рис. 3.7).

Дослідницькі експерименти показали, що у групі пацієнтів з діагнозом остеоартрит колінних суглобів II-III ступеню, у плазмі крові рівень ІФ- γ знижувався в 1,4 раза порівняно з групою людей, що були умовно здорові (рис. 3.8). Зауважимо, що у групі з пацієнтами, що мали остеоартрит та зазнали

хвороби COVID-19, у плазмі крові рівень ІФ- γ був також зниженим в 1,4 раза порівняно з групою осіб, що були умовно здорові (рис. 3.8).

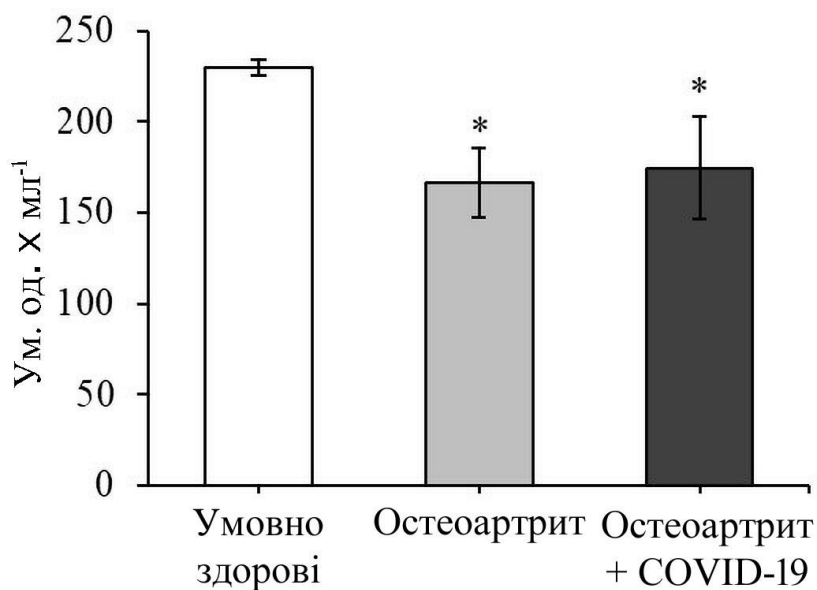


Рис. 3.8. Рівень ІФ- γ у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей

Треба відзначити, що наступні параметри, які ми визначали, це були протизапальні цитокіни – ІЛ-4 та ІЛ-10 (рис. 3.9).

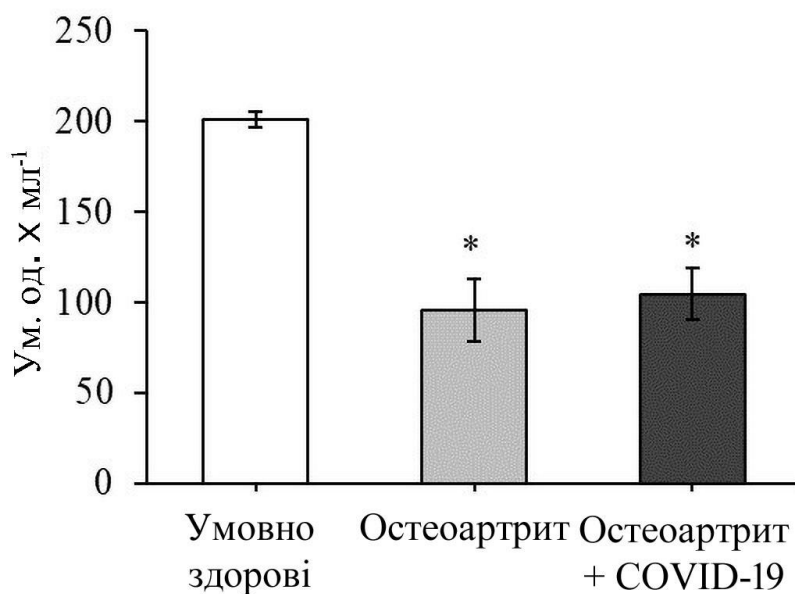


Рис. 3.9. Рівень ІЛ-4 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей

Нами зазначено зниження концентрації ІЛ-4 в 1,5 раза у плазмі крові людей з остеоартритом порівняно з показниками у групі контрольних осіб (рис. 3.9). Подібні результати ми спостерігали і в групі осіб з діагнозом остеоартрит, що перехворіли коронавірусною інфекцією (рис. 3.9).

Проведені експерименти показали, що у групі осіб з патологією колінних суглобів концентрація ІЛ-10 знижувалася в 1,5 раза у порівнянні з такими показниками контрольної групи (рис. 3.10). Встановлено, що у пацієнтів, що мали остеоартрит та зазнали хвороби COVID-19, концентрація ІЛ-10 у плазмі крові також була знижена в 1,3 раза при порівнянні з групою осіб, що були умовно здорові та відносно групи з остеоартритом даний параметр зростав в 1,2 раза (рис. 3.10).

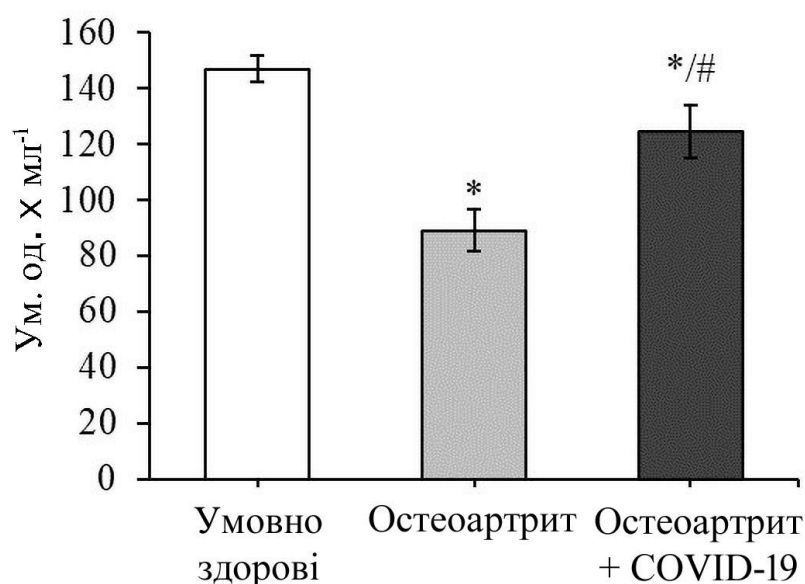


Рис. 3.10. Рівень ІЛ-10 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Отже, треба зазначити, що досліджувані нами пацієнти з діагнозом остеоартрит, які одужали від COVID-19 за 6–9 місяців до цього, мали зміни плазмових рівнів прозапальних і протизапальних цитокінів, які були односпрямованими зі змінами таких параметрів за відсутності вірусного

ураження. Порівняно зі здоровими пацієнтами у осіб з остеоартритом, що згодом перенесли SARS-CoV-2-інфекцією, у плазмі крові спостерігалось підвищення рівня ІЛ-1 β , а також зниження рівнів ІЛ-8, ІЛ-12 β , ФНП- α та ІФ- γ . Водночас концентрація прозапального цитокіну ІЛ-6 у плазмі крові суттєво не відзначалися від величини даного параметра групи контролю. Рівень протизапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-10 за аналогічних умов також значно знижувався порівняно з показниками групи контролю. Проте рівні ФНП- α та ІЛ-10 у плазмі крові осіб, що хворіли на остеоартрит, у постковідний період підвищилися відносно рівня даного показника в осіб із остеоартритом за відсутності коронавірусної інфекції, але не досягли контрольних значень. COVID-19 більш суттєво впливав на плазмові рівні прозапальних цитокінів ІЛ-1 β та ІЛ-12 β у осіб, що мали остеоартрит, у них спостерігалось більш значне підвищення рівня ІЛ-1 β та зниження ІЛ-12 β порівняно з пацієнтами, які не хворіли на COVID-19.

Відомо, що клінічні наслідки інфекції, спричиненої SARS-CoV-2, надзвичайно різноманітні: від легкої до швидко прогресуючої форми захворювання, що може спричинити загибель людини протягом 2–3 тижнів після появи перших клінічних симптомів захворювання. Крім того, у постковідний період у таких осіб більшим стає ризик розвитку постгострих наслідків SARS-CoV-2-інфекції – хронічний стан захворювання (long COVID), пов'язаний з даною вірусною інфекцією, який спричиняє інвалідність у деяких людей [119, 241]. Також наслідками COVID-19 для пацієнтів може стати загострення хронічних захворювань, зокрема остеоартритів [18, 50, 176].

Наші дані експериментально засвідчують те, що у групи осіб з діагностованим остеоартритом, що одужали від COVID-19 за 6–9 місяців до цього, мали високу системну цитокінову дерегуляцію прозапальної ланки, включаючи підвищений рівень ІЛ-1 β у плазмі та знижений рівень ІЛ-8, ІЛ-12 β , ФНП- α та ІФ- γ . Відомо, що ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ФНП- α є цитокінами, що виробляються клітинами вродженого імунітету, такими як макрофаги та моноцити, і в основному пов'язані з тривалим перебігом COVID-19 [276]

встановили, що рівні цих трьох цитокінів підвищуються на різних стадіях вірусної інфекції. Збільшення ІЛ-1 β спостерігалось під час легкої інфекції SARS-CoV-2, але цей цитокін мав пізній пік через два-три місяці після інфікування. З іншого боку, рівні ІЛ-6 і ФНП- α залишалися постійними під час і після інфікування. Навпаки, інші дослідження на чолі з Fathi [95] показали, що плазмові рівні прозапальних цитокінів ІЛ-1 α , ІЛ-6 і ФНП- α були знижені під час одужання, за винятком рівня ІЛ-1 β . За даними літератури, ІЛ-1 β є одним з основних медіаторів запальних реакцій, який стимулює катаболічні процеси в матриксі суглобового хряща, індукує збільшення синтезу ММП, особливо колагенази, та пригнічує синтез гіалуронової кислоти [325]. У пацієнтів із пошкодженням суглобового хряща колінного суглоба рівень ІЛ-1 β зростав у синовії, хрящовій тканині, субхондральному шарі кістки та у сироватці крові, ніж у контрольній групі [326].

Кілька попередніх досліджень пов'язували зміни рівня ІЛ-6 або ФНП- α як у синовії, так і в сироватці крові з локальним хронічним запаленням колінного суглоба та прогресуванням остеоартриту [223]. Рівні таких цитокінів, як ІЛ-6 і ФНП- α , змінюються залежно від стадії остеоартриту, та їх показники можна визначати в синовіальній рідині та крові пацієнтів із захворюваннями суглобів [192]. Встановлено, що ІЛ-6 є плейотропним цитокіном, який здійснює свою біологічну діяльність за допомогою різних механізмів. Він відіграє складну роль у патогенезі остеоартриту, ініціюючи запальну реакцію, таку як вироблення інгібіторів тканинної металопротеїнази, які можуть діяти через негативний зворотний зв'язок, щоб обмежити руйнування хряща або запобігти йому на ранній стадії захворювання [223]. Під час COVID-19 підвищення рівня ІЛ-6 позитивно корелює з тяжкістю захворювання. Він особливо добре ідентифікується у пацієнтів із прогресуючими більш важкими стадіями хвороби [269]. Ми встановили, що рівень ІЛ-6 у плазмі пацієнтів з остеоартритом, які одужали від COVID-19, а також за відсутності в анамнезі SARS-CoV-2-інфекції, не показав суттєвої різниці порівняно з умовно здоровими особами контролю. Це свідчить про можливість відсутності імунопатологічних проявів

вірусного захворювання та відносну ремісію суглобової патології внаслідок проведених лікувальних заходів. Подібні результати спостерігалися в останніх дослідженнях [211], які вказують на відсутність статистично значущих відмінностей у концентрації ІЛ-6 у сироватці крові між пацієнтами контрольної групи та тими, хто одужали від COVID-19.

Інші дослідники повідомили про схожість прозапальних біомаркерів (СРБ, D-димер, ІЛ-6, імуноглобулін CD2, кількість нейтрофілів і лімфоцитів) у випадках COVID-19 зі стійкими симптомами та без них [348]. Такі розбіжності можуть бути наслідком різних методів дослідження (різні зразки, терміни вимірювання, збір даних і аналізи) або гетерогенного і рецидивуючого характеру перебігу COVID-19 [201, 348]. Дійсно, навіть рівні імунних та прозапальних маркерів при хронічних запальних і аутоімунних захворюваннях можуть коливатися. ІЛ-1 і ФНП- α також діють на макрофаги та ендотеліальні клітини, індукуючи експресію ІЛ-8, який відіграє ключову роль у рекрутуванні та активації нейтрофілів у процесі запалення. Зростаючі рівні ІЛ-8 у сироватці крові асоціюються з більшою тривалістю хвороби у пацієнтів із тяжкою або критичною формою COVID-19 [200]. Кілька досліджень повідомляють, що ІЛ-8 є чутливим біомаркером у пацієнтів з легкою чи важкою формою COVID-19, які мали більш високі рівні цього цитокіну в крові порівняно зі здоровими контрольними особами [183]. Підвищені рівні ІЛ-8 були виявлені в крові та у синовію осіб з остеоартритом, що корелювало із тяжкістю захворювання. Однак місцеве запалення більше відповідало клінічній тяжкості, ніж системне запалення [108]. У тканині суглоба ІЛ-8 експресується головним чином макрофагами, хондроцитами та фібробластоподібними синовіоцитами. Його участь у формуванні остеоартриту пов'язана з хемотаксисом нейтрофілів та активацією лейкоцитів і міграцією до суглоба, впливом на гіпертрофію і диференціювання хондроцитів та вивільненням матриксних металопротеїназ.

Отримані нами дані демонструють значно знижений рівень ІЛ-8 у плазмі крові пацієнтів, які перенесли інфекцію SARS-CoV-2 6-9 місяців тому на фоні остеоартриту. Зниження рівня ІЛ-8 у осіб з діагностованим остеоартритом в

період реконвалесценції після перенесеного COVID-19 може бути результатом компенсаторної реакції на гіперактивацію імунної системи під час гострої фази вірусного захворювання, яка характеризувалася надмірною продукцією прозапальних медіаторів. Крім того, зниження продукції ІЛ-8 корелювало зі зниженням рівня ФНП- α , який є важливим його індуктором. Такі зміни в цитокіновому профілі можуть свідчити про структурну перебудову імунної відповіді в антизапальному напрямку. Разом зі зниженням рівня прозапальних цитокінів ІЛ-8 та ФНП- α у реконвалесцентних хворих на COVID-19 з остеоартритом спостерігалось зниження ІЛ-12. Згідно даних літератури, ІЛ-12 синергізує з різними цитокінами та індукує продукцію ІФ- γ та прозапальних цитокінів. З іншого боку, продукція ІФ- γ , індукована ІЛ-12, знижується за дії ІЛ-4 та ІЛ-10 [163]. ІФ- γ секретується декількома імунними клітинами, включаючи макрофаги, НК-клітини (natural killer cells, природні кілери), Т-клітини у відповідь на вірусну або внутрішньоклітинну бактеріальну інфекцію, і відіграє роль у прямій стимуляції головних ефекторних клітин запалення [163].

Треба зазначити, що ІФ- γ важко класифікувати як про- або протизапальний цитокін, враховуючи його складні та різноманітні функції. Він відіграє важливу роль у патогенезі ревматоїдного артриту, тоді як дані щодо остеоартриту є суперечливими [349]. У наших дослідженнях зафіксовано, що концентрація ІФ- γ у пацієнтів з діагностованим остеоартритом після одужання від COVID-19, а також у тих, хто не був уражений вірусом SARS-CoV-2, була знижена. Встановлений ефект може бути пов'язаний зі зменшенням кількості Т-клітин, їх функціональним виснаженням, спричиненим вірусною інфекцією, та зміною імуномодулюючої функції [81]. Отримані експериментальні дані можна порівняти з результатами інших досліджень, проведених Merza зі співавторами, які продемонстрували значно нижчі рівні ІФ- γ та ІЛ-4 у пацієнтів, які одужали від COVID-19, порівняно зі здоровими людьми [211]. Протизапальні цитокіни, включаючи ІЛ-4 та ІЛ-10, є задіяними у патогенез остеоартриту, можуть пригнічувати дію прозапальних цитокінів, знижувати

рівні експресії ММП, пригнічувати запальну відповідь і лізис суглобових хондроцитів, сприяти синтезу протеогліканів хондроцитів і колагену II типу. Такі біологічні ефекти ІЛ-4 та ІЛ-10 сприятимуть пригніченню прогресування остеоартриту [192].

На противагу ряду наукових досліджень [198, 211], в яких спостерігалось підвищення рівня ІЛ-10 у крові як осіб з COVID-19, так і пацієнтів, які одужували, і це було пов'язано з певними захисними механізмами ІЛ-10, нами було виявлено незначне зниження рівня цього протизапального цитокіну в плазмі крові пацієнтів з COVID-19, що мали діагноз остеоартриту. У пацієнтів із остеоартритом, що не хворіли SARS-CoV-2-інфекцією, рівень ІЛ-10 був знижений у більшій мірі, що може бути пов'язано з компенсаторною активацією протизапальної системи при остеоартриті на фоні COVID-19. Більшість цитокінів, за винятком ІЛ-1 та ІЛ-4, діють переважно локально, завдяки чому їх концентрація в синовіальній рідині значно перевищує рівень крові, але при неможливості місцевих захисних реакцій ці цитокіни вивільняються в систему кровообігу для прояву свого впливу на системному рівні.

Таким чином, отримані результати свідчать про дисбаланс про- та протизапальних цитокінів у плазмі осіб з діагнозом остеоартрит впродовж тривалого періоду після COVID-19. Зміни рівнів медіаторів запалення вказують на наявність різних імунорегуляторних механізмів, залучених у патогенез як патології суглобів, так і системних розладів, спричинених SARS-CoV-2-інфекцією.

3.1.4. Рівні експресії генів *PTGS2*, *NOS2*, *NFKB1* у клітинах крові

Наступні наші дослідження особливостей розвитку запалення в організмі людей з остеоартритом та після одужання від COVID-19 ми акцентували на вивченні показників на молекулярно-генетичному рівні: в

клітинах крові рівні експресії генів *PTGS2* (циклооксигеназа 2), *NOS2* (індуцибельна NO-синтаза) та *NFKB1* (ядерний фактор κB).

Ген *PTGS2* кодує фермент – простагландин-ендопероксидсинтазу 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *PTGS2*), який також відомий під назвою циклооксигеназа 2 (cyclooxygenase-2, *COX2*). Це головний фермент у біосинтезі простагландинів, що залучається у перетворення арахідонової кислоти на простагландин H₂ (попередник простацикліну). Його експресія збільшується при запаленні. *COX2* при фізіологічному стані не синтезується та не виявляється в тканинах та біологічних рідинах організму, але за умов розвитку запальних процесів, рівень даного ферменту починає суттєво зростати. *COX2* є мішенню для дії нестероїдних протизапальних препаратів, що застосовують при лікуванні запальних процесів при захворюваннях суглобів [100, 296].

Треба відмітити, що при виконанні наших досліджень було виявлено, що у групи осіб з остеоартритом у клітинах крові рівень експресії гена *PTGS2* зростав у 2,3 раза порівняно з групою людей, що складала контроль (рис. 3.11). Нами також продемонстровано, що у клітинах крові пацієнтів з остеоартритом, що одужали від COVID-19, рівень експресії цього гена *PTGS2* збільшувався в 2,6 раза відносно значення даного параметра контрольної групи та в 1,3 раза, якщо порівнювати з групою осіб, у яких діагностовано остеоартрит (рис. 3.11).

Результати, що були нами встановлені є відображенням інтенсифікації по функціонуванню експресії гену *PTGS2* у клітинах крові осіб, у яких діагностовано остеоартрит та які одужали після хвороби COVID-19. Це може свідчити, про подальшу активацію продукції простагландину H₂, який потім перетворюється на простагландин E₂ (медіатор запалення). Його біологічні ефекти будуть здійснюватись за рахунок таких біологічних механізмів: розширення та зростання проникності мікросудин, формування запальної гіперемії, пригнічення функціонування лімфоцитів і поліморфоядерних лейкоцитів та інгібування агрегації тромбоцитів. Ці всі процеси будуть сприяти нарощуванню проникності мікросудин та розвитку набрякальних явищ. До того ж простагландин E₂ буде робити чутливими закінчення больових нервів, що

відповідають за біль, до дії алгезуючих сполук, серед яких важливе місце займають гістамін та брадикінін [225, 241].

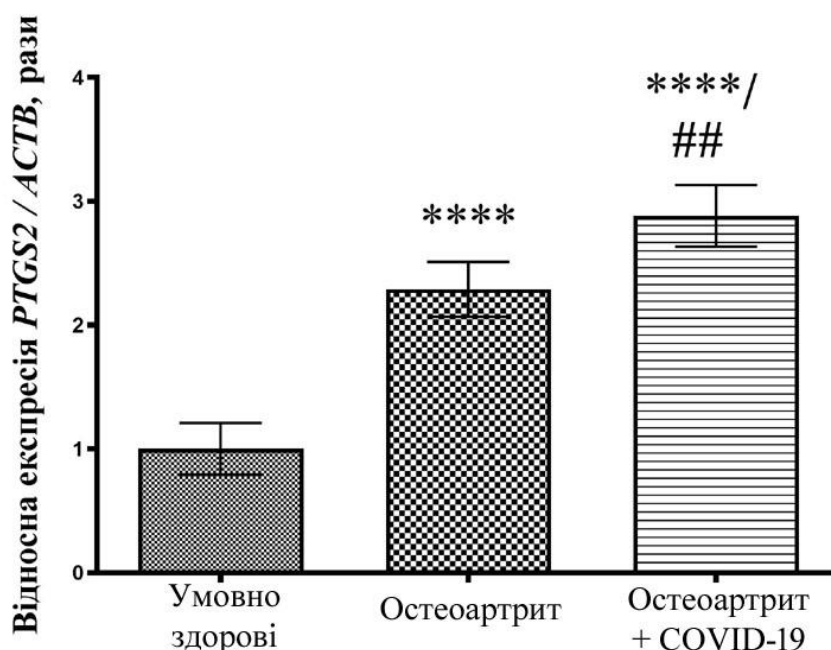


Рис. 3.11. Рівень експресії гена *PTGS2* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; ## – $p \leq 0,01$ відносно групи людей з остеоартритом

Описані вище події (синтез великої кількості простагландину E2) згодом призведуть до серії запальних реакцій.

Ген *NOS2* кодує фермент синтазу оксиду азоту 2 (*NOS2*), відомий також як індукцйбельна синтаза оксиду азоту (*iNOS*), який є відповідальним за вироблення монооксиду азоту у відповідь на запальні подразники. Індукцйбельна синтаза монооксиду азоту відіграє центральну роль у запальних реакціях, що виникають після інфекції або пошкодження тканин. Також цей ензим виконує важливе значення у опосередкуванні клітинної проліферації, апоптозу та окисного стресу. *NOS2* була виявлена практично в кожному типі клітин, і NO, який вона виробляє, може виконувати як корисні, так і шкідливі дії [59, 221]. Так, ендогенний NO, що продукується у невеликих кількостях конститутивною синтазою оксиду азоту, насамперед в ендотеліальних клітинах

(ендотеліальна синтаза оксиду азоту, eNOS), регулює базальний вазомоторний тонус і підтримує ендотелій у стані спокою. Навпаки, NO, що продукується iNOS в надлишку під час септичного шоку, може викликати небезпечні для життя вазоплегію (паралітичне розширення судин) та гіпотензію (низький кров'яний тиск) [159, 232].

Накопичені дані інформують нас проте те, що NO вважається одним із головних медіаторів запалення при остеоартриті та викликає багато патологічних змін під час його розвитку та прогресування. Надмірне вироблення NO у хондроцитах сприяє руйнуванню хряща та пошкодженню клітин. Синтез NO у хондроцитах каталізується NOS2, тому даний показник є важливим параметром оцінки вільнорадикальних і запальних процесів у хрящі, а також привабливою мішенню для проведення терапії остеоартритних патологій [14, 234]

Аналіз результатів наших експериментів показав, що у групі осіб з остеоартритом рівень експресії гена *NOS2* збільшувався в 2,5 раза по відношенню до значення цього показника в контрольній групі людей (рис. 3.12). Було зазначено, що у групі пацієнтів з остеоартритом, що одужали від COVID-19, цей показник зростав у 2,8 раза у порівнянні з цим показником групи контролю та в 1,3 раза відносно групи осіб, що мали діагноз остеоартриту (рис. 3.12).

Дані, що були нами встановлені по інтенсифікації експресії гена *NOS2* у клітинах крові осіб з остеоартритом після SARS-CoV-2-інфекції пов'язані з впливом прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ФНП- α , ІФ- γ (досліджених нами на попередньому етапі), а також прямого впливу самого вірусу. Якщо активність індукбельної NO-синтази буде збільшуватись, то це може спричинити більш активний синтез молекул NO, які в свою чергу виконують функцію запальних медіаторів. Завдяки його дії відбувається продукування та вивільнення різних прозапальних цитокінів (інтерлейкінів: ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-6, а також хемокінів, лейкотрієнів). Ці синтезовані молекули спричинюють стимуляцію руху лейкоцитів у вогнище запалення. Треба відмітити, що індукбельна NO-синтаза

має контроль над продукцією таких інтерлейкінів, як ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11 та ІЛ-13, що є представниками протизапальних цитокінів [135].

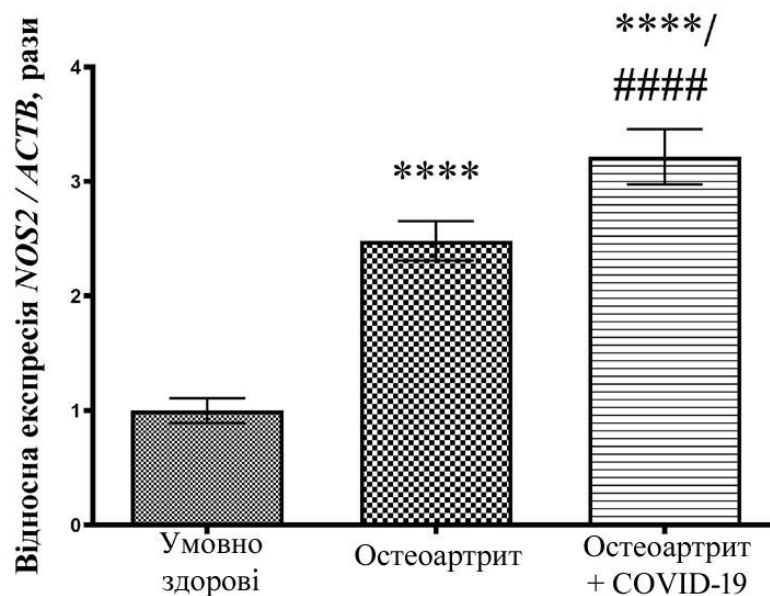


Рис. 3.12. Рівень експресії гена *NOS2* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; #### – $p \leq 0,0001$ відносно групи людей з остеоартритом

Крім того надмірна концентрація молекул NO бути сприяти інтенсифікації вільнорадикальних явищ та розвитку окисного стресу. Це буде відбуватися, зокрема, внаслідок перебігу дифузійно-контрольованих реакцій оксиду азоту з супероксидних радикалом продуктом чого стане формування одних з найбільш біологічно вразливих окисних радикалів – молекул пероксинітриту. Його молекула є ендогенним токсикантом, що за своїми цитотоксичними ефектами переважає інші вільні радикали. Таким чином, молекула монооксиду азоту може переключатися зі своєї фізіологічної функції протимікробного захисту на генерацію реакційноздатних вторинних радикалів, які ініціюють радикальні ланцюгові реакції, такі як перекисне окиснення ліпідів, і посилюють процеси окиснення біологічних молекул в організмі [237]. Отримані результати свідчать, що надмірне зростання рівня експресії гена *NOS2* у клітинах крові осіб з групи хворих на остеоартрит, що перенесли хворобу COVID-19, може спричинити опосередковане окисником порушення

окисно-відновного гомеостазу, окисне пошкодження клітин і тканин та прогресію запалення в організмі таких пацієнтів.

Родина транскрипційних факторів ядерного фактора κВ (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) відіграє вирішальну роль в імунній регуляції та запаленні через індукцію великого набору різних генів, продукти яких включають цитокіни, хемокіни, молекули адгезії та інші ефектори. Він приймає участь у регуляції процесів в організмі як в нормі (імунна відповідь, клітинний цикл, апоптоз тощо), так і при патології (рак, аутоімунітет, хронічне запалення тощо). NF-κB регулює експресію великої кількості генів і тісно пов'язаний із клітинною реакцією запальної відповіді. Серед таких генів багато тих, які задіяні у кодування цитокінів (ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-12, ФНП-α), хемокінів (ІЛ-8, MIP1, RANTES і еотоксину), білків гострої фази, молекул адгезії, індукцибельних ефекторів ферментів (наприклад, iNOS, COX-2) [49, 181]. В цілому, представники сімейства NF-κB є відповідальними за керування експресією великої кількості генів-мішеней (>150) шляхом зв'язування зі специфічними елементами ДНК, відомими разом як сайти κВ, які містяться в промоторах/підсилювачах цільових генів [124].

Білки NF-κB зазвичай існують як компоненти неактивних цитоплазматичних комплексів, зв'язаних членами родини інгібіторів κВ (IκB). Коли клітина перебуває у G₀-фазі (стані спокою), то NF-κB накопичується та зберігається в неактивному стані за рахунок інгібування протеїном IκB. Дія певного стимулу призводить до ряду послідовних подій з протеїном IκB: фосфорилювання, убіквітинуювання та деградація. Це створює умови для транслокації NF-κB в клітинне ядро, в подальшому це дає йому можливість брати участь у регуляції експресії генів-мішеней. Виявлено існування механізму зворотного зв'язку IκB: він проникає в ядро клітини, вилучає NF-κB з певних зон зв'язування з ДНК, а потім його переносить у цитоплазму клітини, де NF-κB знову буде знаходитись в неактивному стані [49].

Отже, вище зазначені функції транскрипційного фактору NF-κB показують його важливість у контролі численних аспектів вроджених і

адаптивних імунних процесів і його ролі як основного медіатора запальних реакцій. NF-κB індукує експресію різних прозапальних генів, у тому числі тих, що кодують цитокіни та хемокіни, а також координують запалення. Виявлено вирішальну роль NF-κB у регулюванні виживання, активації та диференціації клітин вродженого імунітету та запальних Т-клітин. Згідно даних літератури NF-κB-сигналінг є одним із провідних механізмів, що активується при патогенезі захворювань, пов'язаних із запаленням, зокрема, при остеоартриті [58, 62]. Показано, що при остеоартриті відбувається гіперекспресія NF-κB у суглобовому хрящі та синовіальній тканині.

Його активація пов'язана з дією прозапальних цитокінів (IL-1β) та продуктів деградації позаклітинного матриксу, надалі вже активований NF-κB індукує експресію великої кількості запальних генів, включаючи ті, що кодують ФНП-α, IL-1β, IL-6, IL-12p40, циклооксигеназу-2, хемокіни і матриксні металопротеїнази (ММП-13 тощо). В результаті NF-κB виконує ключову роль медіатора індукції прозапальних генів, що спричинює стимуляцію запалення та деструкційних процесів у суглобах при остеоартриті [58, 62, 64].

Таким чином, транскрипційний фактор NF-κB задіяний у формування та регулювання молекулярних механізмів між різними ланками запального процесу, що вказує на необхідність вивчення даного гену при хронічному запальному процесі суглобів (остеоартриті) та вірусному запаленні, спричиненому SARS-CoV-2 [350]. З'ясування вірогідної дії NF-κB, може надати нові можливості для розуміння розвитку як самого патогенезу захворювання, так і створення відповідних терапевтичних стратегій.

При визначенні експресії гена *NFKB1* у клітинах крові осіб з діагнозом остеоартрит зазначено його збільшення в 1,8 раза у порівнянні з показниками групи контролю, що є умовно здоровими (рис. 3.13). В експериментах продемонстровано, що у осіб з остеоартритом, які вилікувались від COVID-19, рівень експресії гена *NFKB1* був збільшеним в 2,2 раза відносно показників групи контролю та в 1,2 раза порівняно з групою осіб з діагнозом остеоартрит (рис. 3.13).

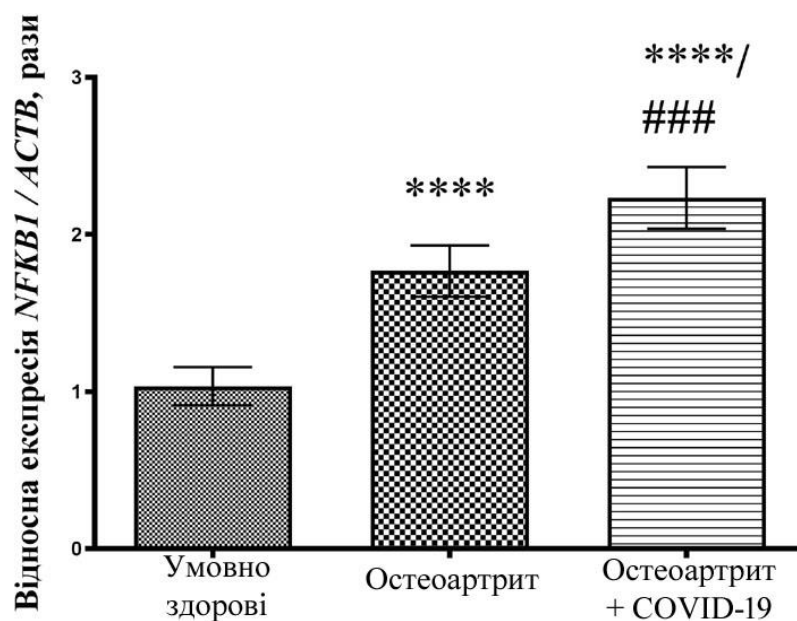


Рис. 3.13. Рівень експресії гена *NFKB1* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; ### – $p \leq 0,001$ відносно групи людей з остеоартритом

Наші експерименти показали, що ріст інтенсивності експресії гена *NFKB1* у клітинах крові осіб з остеоартритом пов'язаний з розвитком запальних процесів в організмі. Отже, транскрипційний фактор NF-кВ є значним прозапальним чинником у патофізіології остеоартриту. Більшою мірою його прозапальна роль зростає у людей з остеоартритом, що перехворіли на COVID-19.

Підсумовуючи отримані нами результати по оцінці ступеню запалення в організмі в цілому на рівні його сполучної тканини – крові, у осіб з діагнозом остеоартрит, які зазнали дії вірусу SARS-CoV2, треба зазначити, що такі пацієнти характеризуються розвитком більш інтенсивних запальних процесів порівняно з людьми, що страждають лише на остеоартрит. Відомо, що через збільшення продукції прозапальних цитокінів у пацієнтів із COVID-19 відбувається ураження багатьох органів, у тому числі, включаючи суглоби [86, 298]. Їх виробництво може бути пов'язано з боротьбою організму з вірусом або при розвитку «цитокінового шторму», що може погіршити стан пацієнтів [34, 290]. Також експресія та розподіл у тканинах ACE-2 може пояснити

спостереження ознак і симптомів COVID-19 за межами дихальних шляхів [315], зокрема в кишечнику, тонких кровоносних судинах, м'язах та синовіальній тканині суглобів [184]. Припускається, що у хворих на коронавірусну інфекцію, можуть розвиватися симптоми артриту, що пов'язано з механізмом патогенетичного впливу вірусу на людський організм. Є відомим, що SARS-CoV-2 потрапляє в клітину через ACE-2 та сприймається рецептором TLR-7 (Toll-like receptor-7, TLR-7). Згідно біоінформаційних оцінювань [220] було зазначено такі результати: геном SARS-CoV-2 містить велику кількість фрагментів, які розпізнаються TLR-7. На додаток до його експресії в імунологічних клітинах, TLR-7 експресується переважно в легенях і бронхах, що дозволяє SARS-CoV-2 бути високорозпізнаним у регіонах його тропізму. Активація TLR-7 призводить до активації N-кінцевої кінази c-Jun та передачі сигналів транскрипційного фактора NF-κB. Це в свою чергу спричинює продукцію інших прозапальних цитокінів та розвитку більш важкого та інтенсивного запалення у осіб з діагнозом остеоартрит, які були уражені вірусом SARS-CoV-2 та одужали після COVID-19.

3.2. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції

Одну з провідних ролей у формуванні та прогресуванні остеоартритів відіграють процеси вільнорадикального окиснення, які при надмірному утворенні вільних радикалів сприяють розвитку окисного стресу [191]. Відомо, що порушення окисно-антиоксидантної рівноваги за остеоартриту виникає при надмірному виробництві вільних радикалів та/або недостатньої активності системи антиоксидантного захисту, що порушує тонкий баланс між оксидантами та антиоксидантами, що призводить до окисного стресу. Наслідком таких зсувів буде розвиток у суглобі синовіального запалення та дисфункції субхондральної кістки. Наслідком надмірного утворення АФК на

біохімічному рівні є ушкодження біологічних молекул: білків, ліпідів та нуклеїнових кислот [21]. В результаті порушується окисно-антиоксидантна рівновага, що буде спричинювати розвиток окисного стресу.

У наших дослідженнях інтенсивність вільнорадикальних процесів ми оцінювали у плазмі крові всіх дослідних груп за концентрацією активних форм кисню (супероксидного радикалу та пероксиду водню), продуктів окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук і шиффових основ) та білків (альдегідних і кетонних продуктів нейтрального та основного характеру), сульфгідрильних груп (білкових, небілкових і загальних) та активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази і каталази).

3.2.1. Вміст активних форм кисню у плазмі крові

Активні форми кисню (АФК) приймають участь у значній кількості фізіологічних процесів, таких як диференціація, проліферація, некроз, аутофагія та апоптоз, діючи як сигнальні молекули або регулятори факторів транскрипції. Вони є високореакційними хімічними молекулами, отриманими завдяки здатності молекули O_2 приймати електрони, утворюючи наступні нестабільні молекули, такі як супероксид-аніон, пероксид водню, гідроксильний радикал і синглетний кисень, що виробляються всіма типами клітин [283]. Фізіологічні рівні АФК притаманні нормальному функціонуванню клітин, виконуючи функції клітинної сигналізації та гомеостазу: регулювання клітинного сигналіngu, старіння та апоптозу хондроцитів, синтез і деградація позаклітинного матриксу. З іншого боку, коли АФК виробляються в надлишку або коли клітинний захист не в змозі метаболізувати їх, відбувається формування окисного стресу, що сприяє розвитку синовіального запалення та дисфункції субхондральної кістки [21].

Супероксидний радикал є первинним радикалом кисню, який утворюється, коли молекула кисню отримує один електрон. В організмі в

середині клітин при перебігу різних біохімічних реакцій (окиснення тіолів, флавінів, хінонів, катехоламінів, метаболізм ксенобіотиків) супероксидний радикал утворюється як проміжна сполука. Треба зазначити, що головними місцями, де він продукується, є певні ферментативні системи в клітині. Серед них головними є НАДФН-оксидаза фагоцитів, ксантинооксидаза, цитохром-с-оксидаза мітохондрій, монооксигенази мікросом тощо. Треба відмітити, що НАДФН-оксидази найбільш експресуються у клітинах, що задіяні у реакції запалення: нейтрофілах та макрофагах [314].

Пероксид водню є найстабільнішою молекулою серед АФК. Основним джерелом пероксиду водню є супероксидна дисмутація, яка каталізується ферментами, але вона також може бути результатом двоелектронного відновлення кисню в реакціях, що каталізуються оксидазами, такими як ксантинооксидаза, глюкозооксидаза, оксидаза амінокислот, уратоксидаза та інші. У ссавців, з точки зору редокс сигналізації та регуляції, H_2O_2 є ендogenous окиснювачем. Його дія на організм є амбівалентною та залежить від кількості: за низької концентрації буде діяти як сигнальна молекула, а за високого вмісту – проявляти цитотоксичну оксидантну дію [39, 146].

Таким чином, за фізіологічного стану АФК виконують важливу роль у багатьох біохімічних процесах, проте збільшена генерація АФК може спричинити пошкодження структурних біомолекул суглоба, і, діючи як внутрішньоклітинний сигнальний компонент, АФК пов'язані з різними запальними реакціями. Активуючи кілька сигнальних шляхів, АФК мають життєво важливе значення в патофізіології остеоартритів.

При оцінці концентрації АФК нами було виявлено, що концентрація супероксидного радикалу у плазмі крові групи осіб з діагнозом остеоартрит була збільшена в 1,7 раза порівняно з групою контролю, яка складалась з умовно здорових осіб (рис. 3.14).

Нами показано, що концентрація даного показника у плазмі крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит, які перехворіли COVID-19, збільшувалася в

2,1 раза відносно даного показника контролю та в 1,4 раза порівняно з цим параметром у групі осіб, що мали діагноз остеоартриту (рис. 3.14).

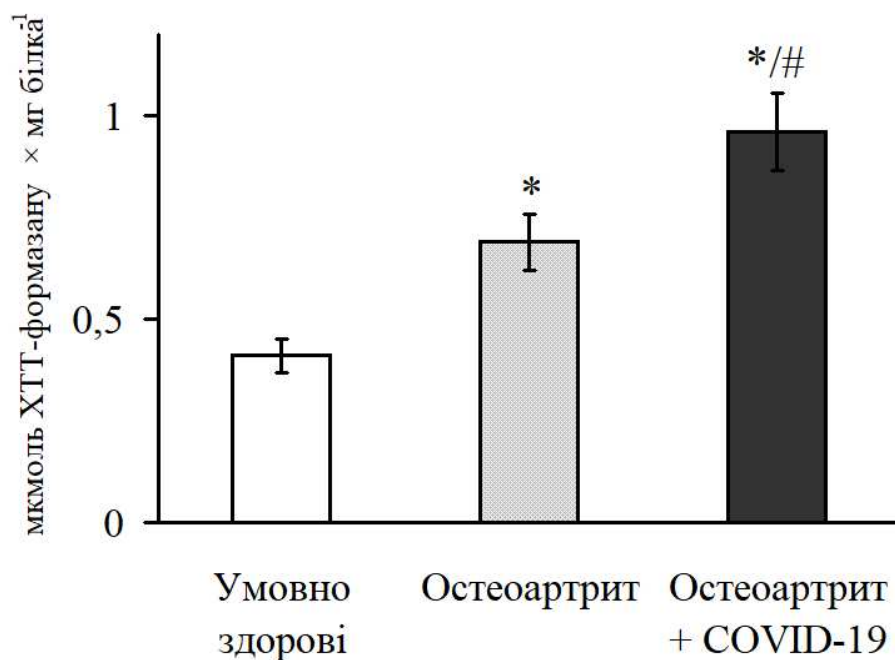


Рис. 3.14. Концентрація супероксидного радикалу у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Продемонстровано в наших експериментах, що в плазмі крові осіб, які хворіли на остеоартрит, концентрація пероксиду водню зростала в 1,5 раза відносно даного показника у здорових людей (рис. 3.15).

Під час проведення даних досліджень виявлено, що у плазмі крові осіб з остеоартритом, які перенесли COVID-19, концентрація пероксиду водню збільшується в 1,8 раза порівняно з даним параметром у контрольній групі та в 1,3 раза відносно показника групи пацієнтів з остеоартритом (рис. 3.15).

Підсумовуючи наші результати по вивченню інтенсивності утворення ряду молекул АФК, можна констатувати надпродукцію вільних радикалів – супероксидного радикалу та пероксиду водню, які є реакційно здатними сполуками, що належать до АФК. Біологічні ефекти вільних радикалів є концентраційно-залежними: за низьких концентрацій вони проявляють себе як

сигнальні молекули (наприклад, пероксид водню), а за високих – як цитотоксичний оксидант [179, 283].

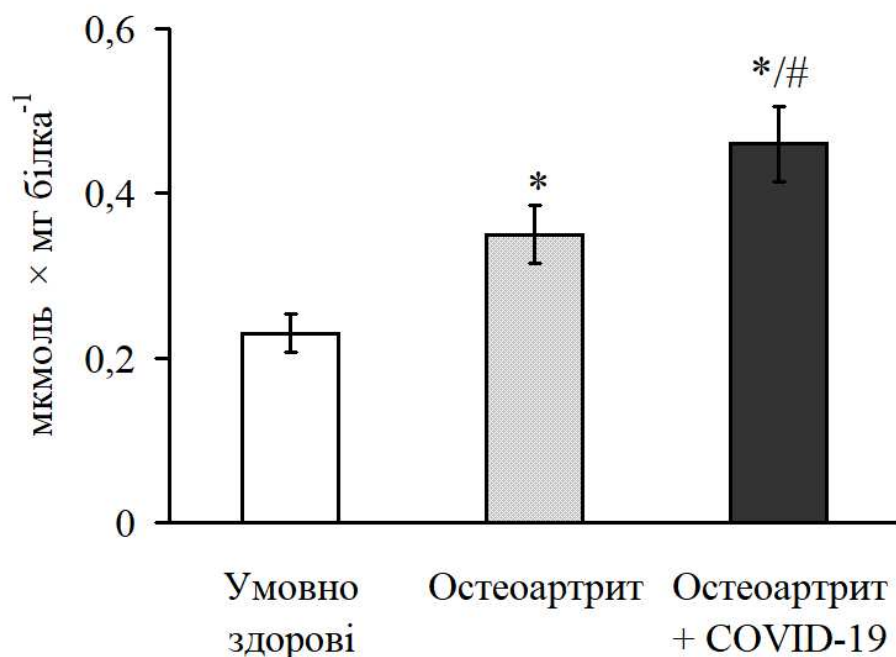


Рис. 3.15. Концентрація перексиду водню у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Біологічна дія досліджуваних представників АФК буде проявлятися в організмі через надмірне окиснення біологічних молекул (ліпідів, білків, нуклеїнових кислот). Зокрема, АФК можуть прямо чи опосередковано пошкоджувати основні суглобові складові та призводити до клінічних проявів запального артрити. Так, молекула перексиду водню, яка добре дифузує, легко пригнічує синтез протеогліканів хряща. Це може відбуватися декількома шляхами: за рахунок втручання в синтез АТФ, частково шляхом інгібування гліколітичного ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази в хондроцитах, посилюючи ефекти протеолітичної та опосередкованої вільними радикалами деградації хряща. Крім власної ушкоджуючої дії, супероксидний радикал та пероксид водню беруть участь у формуванні продукту трьохелектронного відновлення кисню, що є потужним окиснювачем – гідроксильного радикалу, що активно уражує різні біологічні молекули. Зокрема, у суглобах гідроксильні

радикали розкладають ізольовані протеоглікани та фрагментують колаген, які складають основу сполучної тканини організму (хрящ, кістка, сухожилля тощо) та забезпечують її стабільність, міцність і еластичність. Таким чином, в ураженому суглобі вільні радикали сприяють прогресуванню ушкодження суглобу [191, 274].

3.2.2. Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові

Наслідком надмірної продукції АФК на біохімічному рівні є ушкодження біологічних молекул: білків, ліпідів та нуклеїнових кислот. Серед них, продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) можуть слугувати маркером інтенсивності вільнорадикальних процесів в досліджуваному органі. Продукти окиснення ліпідів є статичними маркерами наслідків інтенсифікації вільнорадикальних процесів. До основних продуктів ПОЛ належать дієнові кон'югати (первинні продукти), ТБК-активні сполуки (вторинні продукти) та шиффові основи (кінцеві продукти). Дієнові кон'югати формуються в процесі окиснення такої поліненасиченої жирної кислоти, як арахідонова (відбувається відривання гідрогену в α -положенні по відношенню до подвійного зв'язка в молекулі жирної кислоти). Ці продукти належать до нестійких сполук, які надалі перетворюються на нові молекули – ненасичені альдегіди, серед яких більше всього утворюється малонового діальдегіду (70 %). В нормі утворення малонового діальдегіду необхідно для подальшого його використання у синтезі ряду сполук (простагландинів, стероїдів тощо), але при надмірному продукуванні його молекула бере участь у зшиванні молекул ліпідів, білків, нуклеїнових кислот. Це призводить до структурно-функціональних змін клітинних структур: зростає жорсткість та знижується плинність мембран, змінюється активність ферментів, утворюються ДНК-аддукти, що спричинює мутації, порушуються процеси фагоцитозу, піноцитозу, клітинної міграції та ін. [10].

Шиффові основи, як представники кінцевих продуктів ПОЛ, формуються в процесі контакту між карбонільними групами альдегідів чи кетонів та вільними аміногрупами біологічних молекул. У складі їх молекули обов'язковим є наявність подвійного зв'язку вуглець-азот, де азот сполучений з арильною чи алкільною групою. Через утворення шиффових основ будуть спостерігатися різні порушення клітинних процесів: зміна активності ферментів, перебудова структурних білків, деформація мембранних каналів, зміна проникності мембран тощо. Якщо взяти в цілому, то продукти перекисного окиснення ліпідів мають значні цитотоксичні властивості на клітини, що порушує функціонування біохімічних метаболічних шляхів (гліколіз, окисне фосфорилування тощо), іннактивують мембранні ферменти та синтетичні процеси різних фізіологічних біомолекул [295, 303].

У ході проведених експериментів нами було досліджено вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові людей, а саме: первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів, проміжних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук, головним з яких є малоновий діалдегід, та кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ.

В процесі проведених нами експериментів було виявлено, що у групі осіб з остеоартритом, у плазмі крові концентрація первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів збільшувалась в 1,9 раза порівняно з показником контролю (рис. 3.16).

При визначення даного параметра у плазмі крові групи пацієнтів з діагнозом остеоартрит, які перехворіли COVID-19, концентрація дієнових кон'югатів зростала в 2,4 раза порівняно з контрольною групою умовно здорових осіб та в 1,5 раза відносно показника групи пацієнтів з діагнозом остеоартрит (рис. 3.16).

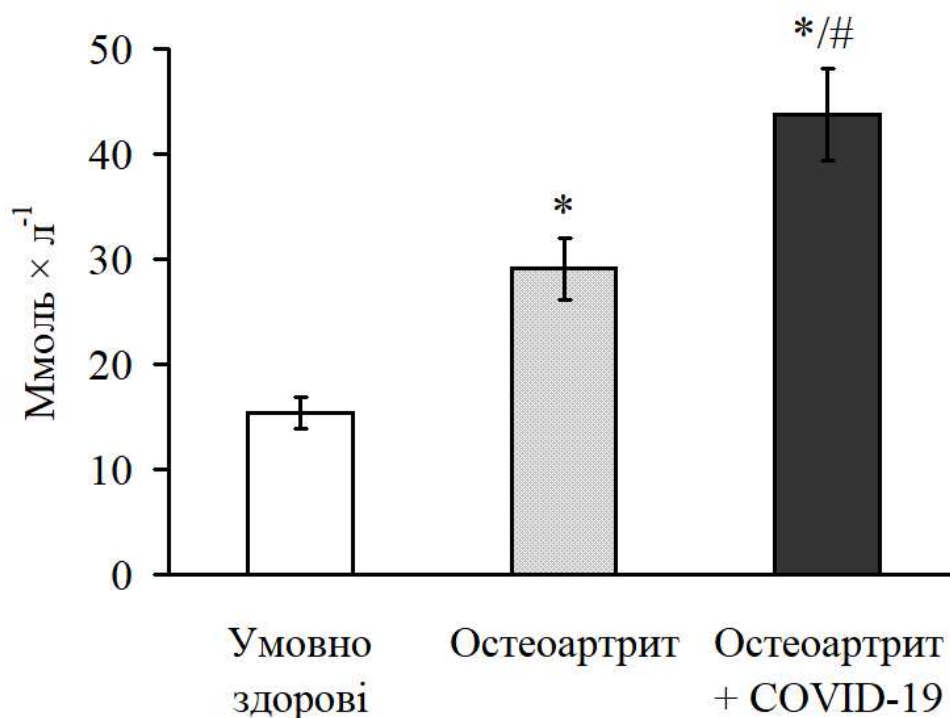


Рис. 3.16. Концентрація дієнових кон'югатів у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Нами було зафіксовано, що у плазмі крові хворих на остеоартрит концентрація вторинних продуктів ПОЛ – ТБК-активних сполук зростала в 2,1 раза по відношенню до контрольної групи (рис. 3.17).

При вивченні концентрації досліджуваного показника у плазмі крові осіб з діагнозом остеоартрит, які перенесли хворобу COVID-19, концентрація ТБК-активних сполук збільшувалась в 2,5 раза у порівнянні із значенням даного параметру контрольної групи та в 1,4 раза відносно групи пацієнтів з діагнозом остеоартрит (рис. 3.17).

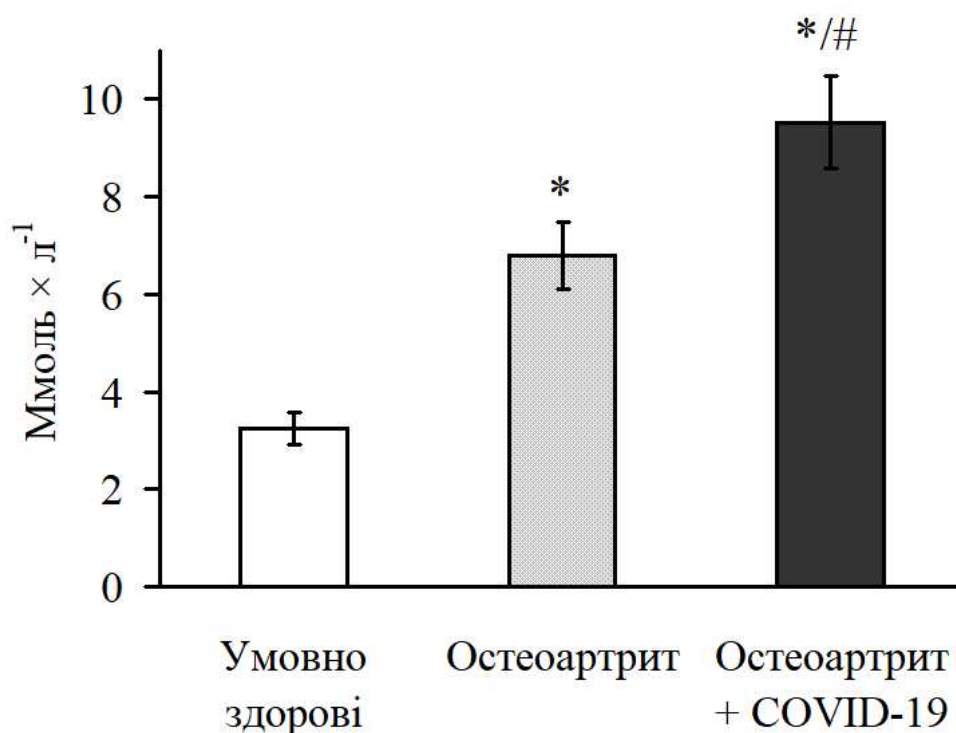


Рис. 3.17. Концентрація ТБК-активних сполук у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Наступні наші експерименти показали, що концентрація кінцевих продуктів ПОЛ – шиффових основ у плазмі крові групи осіб з діагнозом остеоартрит збільшувалася в 2,4 раза відносно даного показника умовно здорових людей (рис. 3.18).

Визначено, що концентрація шиффових основ у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли коронавірусною інфекцією, зростала в 2,7 раза порівняно з контролем та в 1,3 раза відносно групи хворих лише на остеоартрит (рис. 3.18).

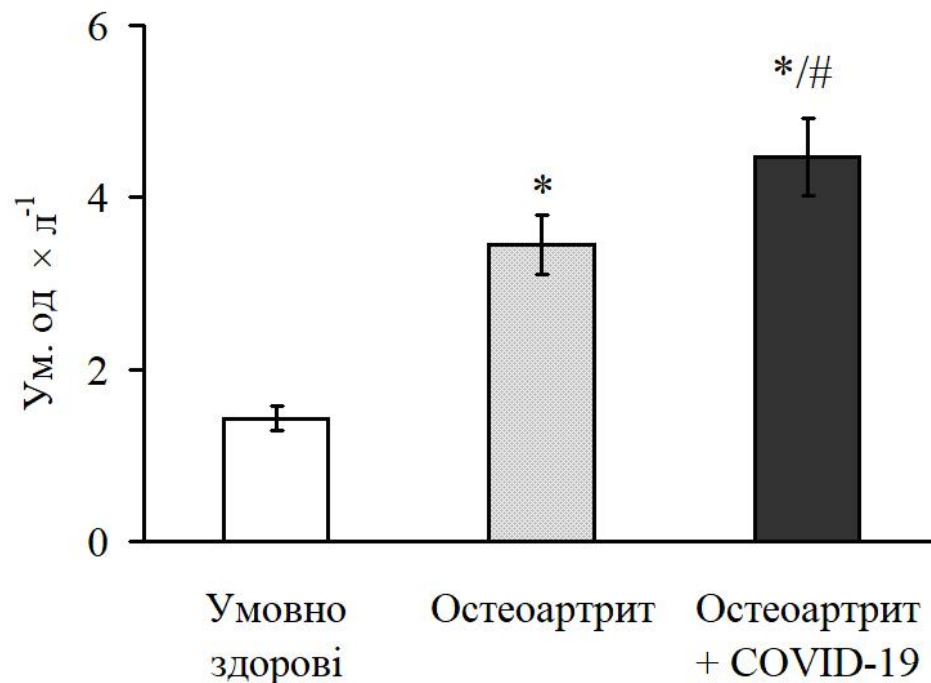


Рис. 3.18. Концентрація шиффових основ у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Одержані нами результати є свідченням накопичення продуктів ліпідної пероксидації у плазмі крові осіб з діагнозом остеоартрит. Треба зазначити, що спостерігаються більш інтенсивні процеси ПОЛ в організмі пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли COVID-19, що підтверджує більш глибокі порушення окисно-антиоксидантної рівноваги. Це вказує на превалювання вільнорадикальних процесів та розвиток окисного стресу в організмі. З одного боку, утворені продукти ПОЛ спричиняють накопичення токсичних сполук (альдегідів, кетонів тощо) та подальше ушкодження інших біомолекул (ліпідів, білків, нуклеїнових кислот). Зокрема, вторинний продукт ПОЛ – малоновий діальдегід здатний взаємодіяти з ДНК, в результаті чого формуються ДНК-аддукти. Крім того за рахунок взаємодії з ϵ -NH₂-групами лізину або N-кінцевими амінокислотами білків, з NH₂-групами фосфоліпідів та глікозамінів малоновий діальдегід формує містки всередині молекул та між ними з утворенням шиффових основ. Наслідком цього є патологічні зміни структурно-функціонального стану біомолекул [156]. Так, у дослідженнях канадських

вчених, які працювали на моделі *in vitro*, виявили окисну дію малонового альдегіду на білки матриксу хрящової тканини, що вплинуло на її фізико-хімічні властивості [10].

Процеси формування окисного стресу у синовії колінних суглобів пацієнтів з діагнозом остеоартрит, був показаний рядом дослідників [235, 335]. Ними встановлено, підвищення продукції АФК (H_2O_2 , NO^*) та інтенсифікація процесів ПОЛ (збільшення вмісту малонового діальдегіду). При цьому вони виявили пригнічення активності ферментів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-S-трансферази, глутатіонпероксидази) на фоні того, що концентрація відновленого глутатіону зменшувалася. Вираженість патологічного процесу перебігу остеоартриту, тяжкість оперативного втручання при артроскопії були на пряму пов'язані зі зростанням прооксидантних процесів у синовії суглобів. Інтенсифікація вільнорадикальних процесів провокувала більш сильні деструктивно-дистрофічні зміни суглобового хряща, яке супроводжувалося загибеллю хондроцитів.

Якщо подивитися на дію ліпідних радикалів з іншого боку, то вони посилюють розвиток запальних процесів: збільшують набрякові явища та продукцію простагландинів. Є вже відомим фактом провідна роль простагландинів у розвитку вазодилатації, екстравазації рідини та болю в синовіальних тканинах, концентрація яких зростає у синовіальній рідині та синовіальній оболонці. Більше того, з'являється все більше доказів того, що простагландини (особливо простагландин E2) є медіаторами, що беруть участь у складних взаємодіях, що призводять до розвитку ерозій суглобового хряща та навколосуглобової кістки [71]. Саме тому інгібітори синтезу простагландинів (інгібітори циклооксигенази-2 та нестероїдні протизапальні препарати) широко використовуються при лікуванні артритів.

Отже, окисний стрес відіграє важливу роль при розвитку остеоартриту, викликаючи запалення та деградацію хрящового матриксу у суглобах. Продукція АФК та подальші процеси ПОЛ пов'язані з порушенням

антиоксидантного захисту хондроцитів, що відіграє вагомую роль у деградації хрящової тканини та загибелі хондроцитів [328, 335].

Таким чином, наші результати дають нам змогу стверджувати про накопичення продуктів ліпідної пероксидації у плазмі крові осіб, що мали діагноз остеоартриту колінних суглобів. При цьому спостерігаються більш інтенсивні процеси ПОЛ в організмі пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли COVID-19, що підтверджує більш глибокі порушення окисно-антиоксидантної рівноваги. Це вказує на превалювання вільнорадикальних процесів, зниження здатності біологічних систем детоксикувати ці реактивні продукти, що сприяє формуванню окисного стресу в організмі таких пацієнтів.

3.2.3. Вміст продуктів окисної модифікації білків у плазмі крові

Значущою мішенню для АФК є білкові молекули живих організмів. Вільні радикали та їх похідні здатні атакувати білкові структури вздовж всього поліпептидного ланцюга, що спричинює порушення структурної організації: можуть спостерігатися процеси агрегації або фрагментації молекули білків. Амінокислотний склад білків буде впливати на процеси інтенсивності їх окисної модифікації. До акцепторних груп білків, які спроможні перехоплювати електрони та реагувати з АФК належать дисульфідні, сульфгідрильні, карбонільні, карбоксильні та аміногрупи цих молекул.

В процесі окиснення та відповідного перетворення білкових молекул спостерігаються наступні модифікації: зростання гідрофільності бічного ланцюга, фрагментація бічного та основного ланцюга структури молекули, агрегація в результаті утворення ковалентних поперечних зв'язків або гідрофобних взаємодій, денатурація молекули білка та її конформаційні зміни. Такі модифіковані білки, при утворенні їх в надмірній кількості, не будуть виконувати свої фізіологічні функції та будуть спричинювати формування різних патологічних процесів, в тому числі і остеоартритів [134, 160].

У наших експериментах ми проводили вивчення окисної модифікації білків плазми крові за концентрацією альдо- та кетопохідних продуктів нейтрального та основного характеру. Проведені нами експерименти показали, що у групі пацієнтів хворих з діагнозом остеоартрит колінних суглобів, у плазмі крові збільшувалася концентрація модифікованих білкових молекул: виявлено збільшення рівня нейтральних альдегідних продуктів ($E_{max} = 356$ нм) – в 2,4 раза порівняно з контрольною групою (рис. 3.19). У плазмі крові осіб з остеоартритом, які перенесли COVID-19, концентрація нейтральних альдегідних продуктів зростала в 2,7 раза відносно контролю та в 1,3 раза у порівнянні з показниками групи осіб з діагнозом остеоартрит (рис. 3.19).

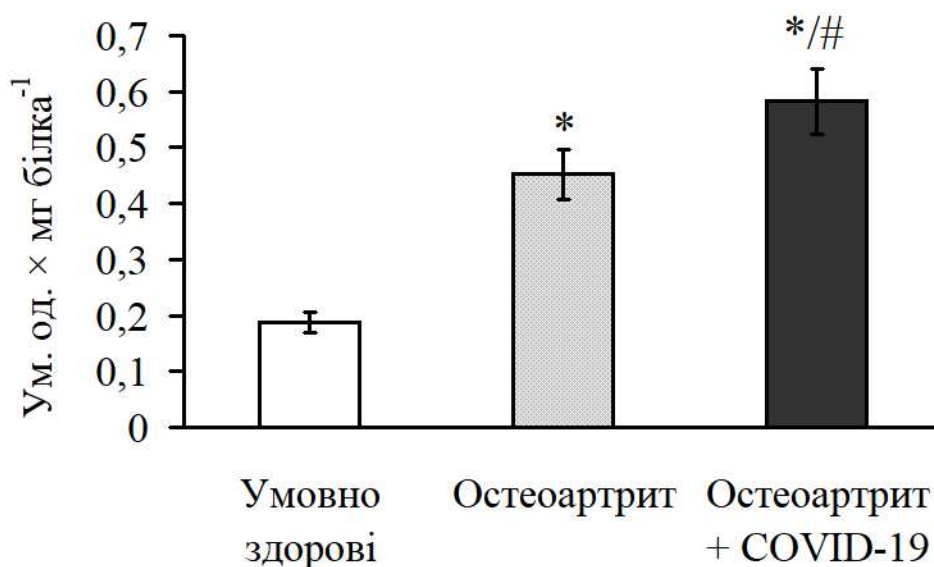


Рис. 3.19. Концентрація нейтральних альдегідних окиснених продуктів білків ($E_{max} = 356$ нм) у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Нами було продемонстровано, що в плазмі крові осіб з діагнозом остеоартрит концентрація нейтральних кетонних білкових продуктів ($E_{max} = 370$ нм) зростала в 1,8 раза відносно показників групи контролю, який складали умовно здорові особи (рис. 3.20). У плазмі крові осіб, у яких встановлено

діагноз остеоартриту та які перенесли COVID-19, концентрація нейтральних кетонних продуктів збільшувалась в 2,2 раза порівняно з контролем та в 1,4 раза відносно даного параметра групи осіб з діагнозом остеоартрит (рис. 3.20).

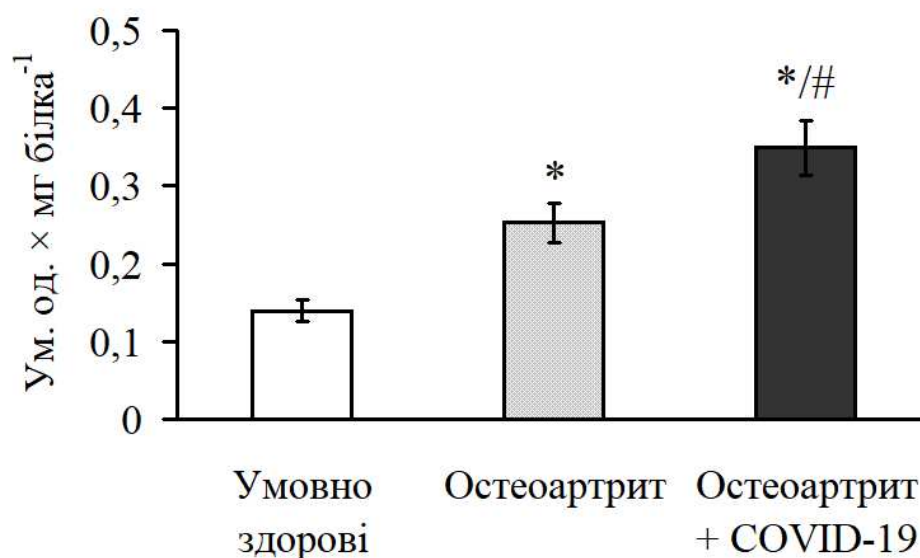


Рис. 3.20. Концентрація нейтральних кетонних окиснених продуктів білків ($E_{\text{max}} = 370 \text{ нм}$) у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

При дослідженні продуктів окиснення білків основного характеру виявлено, що у плазмі крові осіб, що мали діагноз остеоартрит, концентрація альдопохідних ($E_{\text{max}} = 430 \text{ нм}$) збільшувалась в 2,1 раза порівняно з контрольними показниками (рис. 3.21).

Зафіксовано, що у плазмі крові осіб з остеоартритом, які перенесли COVID-19, концентрація основних альдегідних продуктів збільшувалася в 2,6 раза відносно контрольних значень та в 1,5 раза порівняно з показниками групи хворих на остеоартрит (рис. 3.21).

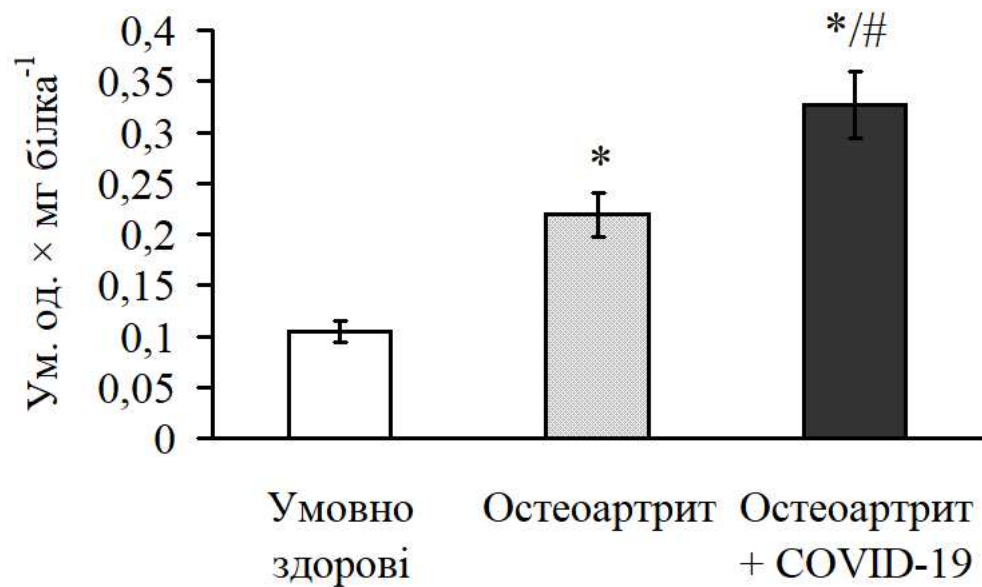


Рис. 3.21. Концентрація основних альдегідних окиснених продуктів білків ($E_{\max} = 430$ нм) у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

У плазмі крові пацієнтів з патологією суглобів нами також було встановлено зростання концентрації в 1,6 раза окисно модифікованих білків основного характеру, що належать до кетопохідних ($E_{\max} = 530$ нм) відносно показників групи умовно здорових людей (рис. 3.22).

Отримані нами дані показали, що у пацієнтів з діагнозом остеоартрит, які одужали від COVID-19 за 6-9 місяців до цього, концентрація основних кетонних продуктів збільшувалась в 1,9 раза порівняно з контролем та в 1,3 раза порівняно зі значенням даного показника у групі осіб, що мали діагноз остеоартрит (рис. 3.22).

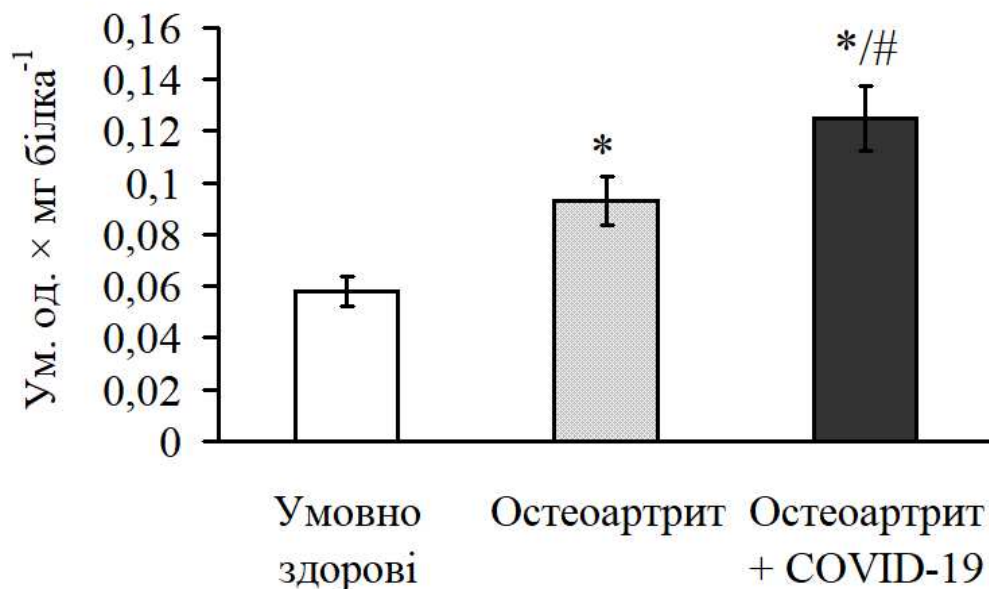


Рис. 3.22. Концентрація нейтральних альдегідних окиснених продуктів білків ($E_{max} = 356 \text{ nm}$) у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Виявлені нами необоротні перебудови молекул білків у плазмі крові осіб з встановленим діагнозом остеоартрит свідчить про активацію вільнорадикальних процесів та зсув окисно-антиоксидантної рівноваги у прооксидантний бік. Такі перебудови в білкових молекулах (агрегація, полімеризація, зміна сумарного заряду, гідрофобності/гідрофільності, розгортання тощо) можуть спричинити втрату їх структурно-функціональної активності, що вплине на їх функції як рецепторів, ферментів, переносників або структурних білків [76]. Такі модифіковані білкові молекули можуть накопичуватися в клітині та порушувати їх функціонування [161].

Окисний стрес може стати причиною процесів карбонілювання білкових молекул, що відбувається внаслідок прямого впливу АФК або може бути ініційоване металами окисні перебудови у бічних ланцюгах ряду амінокислот, таких як пролін, лізин, треонін та аргінін. За рахунок механізму α -амідування або при окисненні бічних ланцюгів N-кінцевих глутамільних залишків з утворенням α -кетоацильного похідного можуть бути сформовані карбонільні

похідні білків. Непрямий шлях карбонілювання білкових молекул відбувається за рахунок карбонілювання таких амінокислот, як лізин, гістидин та цистеїн, що відбувається завдяки їхньої реакції з реакційноактивними карбонільними групами, які будуть утворюватися при окисненні ліпідів (4-гідрокси-транс-2-ноненалу, малонового діальдегіду або акролеїну) та вуглеводів (гліюксалу, метилгліюксалу тощо) [126].

При порівнянні наших результатів при оцінці окисної модифікації білків, необхідно зазначити більш інтенсивне їх утворення в крові осіб з встановленим діагнозом остеоартрит та які потім перенесли хворобу COVID-19. Такі результати можуть бути наслідком безпосередньо прямої дії вірусу SARS-CoV-2, як інфекційного агента на організм, що провокує синтез прозапальних цитокінів та інтенсифікує запальні процеси.

3.2.4. Рівні експресії генів *LRP1* та *OLR1* у клітинах крові

Нами була проведена оцінка впливу коронавірусної хвороби на пацієнтів, яким встановили діагноз остеоартриту, на молекулярно-генетичному рівні за рівнем експресії генів, залучених у регуляцію ліпідного метаболізму. Було визначено рівні експресії генів *LRP1* (кодує білок 1, подібний до рецептора ліпопротеїнів низької щільності (або рецептор для $\alpha 2$ -мікроглобуліну, або рецептор аполіпопротеїну E (*LRP-1*)) та *OLR1* (кодує рецептор окиснених ліпопротеїнів низької щільності (ox-LDL), що є представником надродини лектинів С-типу – LOX-1 (lectin-type oxidized LDL receptor 1 (рецептор 1-го типу для окиснених ліпопротеїдів низької щільності)) у клітинах крові осіб з встановленим діагнозом остеоартрит та хворих на дане захворювання, що перенесли COVID-19.

Встановлено, що у крові групи осіб, що мали остеоартрит рівень експресії гена *LRP1* знижувався в 1,7 раза відносно показника контролю (рис. 3.23).

Показано, що у групі пацієнтів з встановленим діагнозом остеоартрит та які хворіли на COVID-19, рівень експресії гена *LRP1* зменшувався в 2,3 раза порівняно з контрольною групою людей та в 1,4 раза відносно даного показника групи осіб з остеоартритом (рис. 3.23).

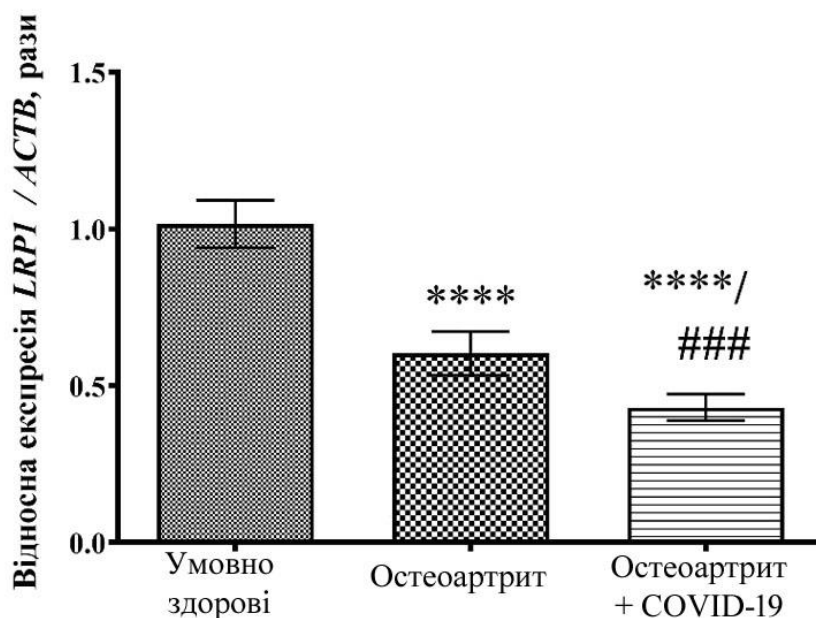


Рис. 3.23. Рівень експресії гена *LRP1* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; ### – $p \leq 0,001$ відносно групи людей з остеоартритом

На наступному етапі було визначено рівень експресії гена *OLR1* у клітинах крові дослідних груп. Зафіксовано, що даний параметр у крові осіб з встановленим діагнозом остеоартрит збільшувався в 1,9 раза відносно контролю (рис. 3.24).

Показано, що у крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит, що перехворіли COVID-19, рівень експресії гена *OLR1* збільшувався в 2,4 раза відносно показника контрольної групи людей та в 1,3 раза порівняно з групою осіб з виявленою патологією суглобів – остеоартритом (рис. 3.24).

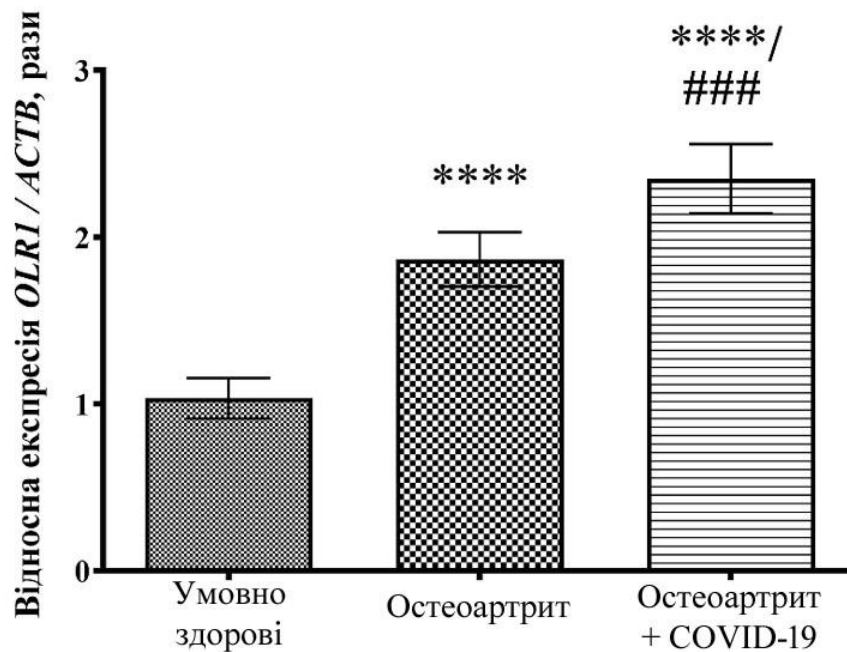


Рис. 3.24. Рівень експресії гена *OLR1* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; ### – $p \leq 0,001$ відносно групи людей з остеоартритом

Згідно даних літератури [82, 238, 339] відомо, що *LRP1* представляє собою багатофункціональний рецептор, що регулює різні фізіологічні процеси: метаболізм ліпопротеїнів, активацію лізосомальних ферментів, деградацію протеаз, потрапляння токсинів бактерій і вірусів в середину клітини, дозрівання та рециркуляції інтегринів, регулювання тонуусу та проникності судин, росту, міграції та апоптозу.

Важливу системну функцію виконує в організмі *LRP1*, тому що він здатний розпізнавати більше 100 лігандів: глікопротеїни позаклітинного матриксу, ліпопротеїни, цитокіни, фактори росту тощо. До цього ж *LRP1* спроможний взаємодіяти та з'єднуватися з багатьма адапторними білками у цитоплазмі клітин. Також особливістю *LRP1* є спроможність з'єднуватися з такими трансмембранними рецепторами, як рецепторні тирозинкінази, інтегрини, рецептори кісткового морфогенетичного білка II типу, рецептори $TGF\beta 1$, а також може змінювати функціональність ряду трансмембранних рецепторів [93, 224, 287, 339].

Вазопротекторна функція LRP1 у легеневій артерії була показана дослідниками на чолі з Calvier [45]. Через наявність багатьох лігандів LRP1 може бути терапевтичною мішенню за умов підтримання судинного гомеостазу та брати участь у зменшенні макроглобулін-залежних сигналів при запаленні, що розвивається при ряді важких патологій. Визначено різні агоністи LRP1, до них належать природний α_2 -, α_1 -антитрипсин, антитромбін III, а також синтетичний SP16. Проведена позитивна оцінка декількох агоністів LRP1 з використанням доклінічних експериментальних моделей ішемії-реперфузії. З них два агоністи (α_1 -антитрипсин і SP16) досліджувались вже у клінічних випробуваннях при гострому інфаркті міокарда. Є інформація про лікарські препарати, що можуть впливати на активність рецептору LRP1. Частина з цих фармацевтичних засобів проходить тестування у дослідженнях на рівні клінічних випробувань для корекції захворювань серцево-судинної системи [45]. Згідно літературних даних відомо, що LRP1 може модулювати гомеостаз судин завдяки механізмам регуляції вазоактивними речовинами та специфічними сигнальними шляхами всередині клітини: шлях інгібітора активатора плазміногену 1, шлях тромбоцитарного фактора росту, трансформуючий фактор росту β сигнальний шлях, а також шлях фактора росту ендотелію судин [45].

Встановлено, що LRP-1 бере участь катаболізмі білка агрекану хрящового матриксу як в нормі, так і при патологічних станах. Поза межами клітини він виконує роль основного модулятора активності адамалізін-подібної металопротеїнази з тромбоспондиновими мотивами 5 (metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 5, ADAMTS-5). Цей фермент знаходиться у позаклітинному матриксі та є ключовим ферментом (агреканаза), що приймає участь у розщепленні агрекану, основного протеоглікану хряща [320].

LOX-1 є рецепторним білком надродини лектинів С-типу. Експресія гену LOX-1 регулюється за рахунок сигнального шляху циклічного АМФ. Його функція пов'язана зі зв'язуванням, інтерналізацією та розщепленням окисненого ліпопротеїну низької щільності. Відомо, що система LOX-1/ox-LDL

залучені у механізми формування артриту. Встановлено, що система LOX-1/ox-LDL має певне значення у поступовому руйнуванні хряща. Японські дослідники на чолі з Nakagawa вперше показали, що при артриті, індукованому зимозаном, виявляється експресія LOX-1 та наявність ox-LDL у хондроцитах суглобу [228]. Ці дослідники зазначили, що у базальному культуральному середовищі щурячі суглобові хондроцити здійснювали експресію LOX-1, а ox-LDL, який зв'язує LOX-1, призводив до зниження життєздатності культивованих хондроцитів [228].

Інші вчені показали, що у людей ox-LDL наявний у синовіальній рідині суглобу та при остеоартриті у хрящі людини виявляється спільна експресія LOX-1 та ox-LDL [15, 284].

За даними дослідників у біологічних рідинах організму (крові та синовії) хворих з діагнозом ревматоїдний артрит наявний розчинний лектиноподібний рецептор 1 окисненого ліпопротеїну низької щільності (sLOX-1) [145]. Показано, що збільшення вмісту ФНП- α зумовлює не тільки розвиток ревматоїдного артриту, але також формуванню ендотеліальної дисфункції за рахунок зростання у судинах концентрації окиснених ЛПНЩ та активації шляху LOX-1/NF κ B/Arg2. Це викликає зменшення біодоступності оксиду азоту та зниження рівня циклічного ГМФ. При проведенні терапії з використанням анти-ФНП- α спостерігається зменшення клінічних суглобових симптомів, а також відновлення функціонування ендотелію в результаті зменшення концентрації LOX-1, судинних окиснених ліпопротеїнів низької щільності (oxLDL) та аргінази 2 (Arg2) [16]. Рівень sLOX-1 може бути застосований в якості біологічного маркеру для оцінювання ступеню клінічної ремісії та інтенсивності перебігу хвороби у пацієнтів, що мали діагноз ревматоїдний артрит.

У ряді досліджень показано, що лектиноподібний рецептор ox-LDL-1 (LOX-1) виконує функцію значущого рецептору для ox-ЛПНЩ, які були отримані шляхом клонування з культивованих ендотеліальних клітин аорти, одержані з великої рогатої худоби. Також зазначена їх експресія в великій

кількості різноманітних типах клітин: ендотеліальні клітини, клітини гладенької мускулатури судин, макрофаги та хондроцити [16, 133]. Американські вчені визначили значення ролі LOX-1 у розвитку серцево-судинних захворювань. Ними було встановлено, що при формуванні запалення спостерігається індукція рецептора окиснених ЛПНЩ, LOX-1. За умов гострого коронарного синдрому цей рецептор бере участь в утворенні атеросклеротичних бляшок. В більшості випадках експресія LOX-1 на ендотеліальних клітинах є низькою, але при дії ряду атеросклеротичних стимулів (наприклад, ФНП- α , окиснених ЛПНЩ тощо) буде набагато зростати експресія лектиноподібного рецептора LOX-1 [268]. Показано, що при таких патологіях, як атеросклероз та ризик інфаркту міокарда, спостерігаються мутації гена OLR1.

Проведені дослідження на чолі з Hashimoto показали залученість у патофізіологію артриту лектиноподібної окисненої системи ліпопротеїнів низької щільності (ox-LDL) рецептор-1 (LOX-1)/ox-LDL. Вважається, що LOX-1-позитивні синовіальні клітини та хондроцити можуть бути використані в якості потенційних мішеней для профілактики та лікування артриту [133].

Отже, літературні джерела свідчать, що *LRP1* та *OLR1* виконують в нашому організмі роль багатофункціональних рецепторів, які беруть участь у клітинній сигналізації, процесах транспортування ліпопротеїнів, а також задіяні у формування різних патологічних станів: запальних процесів, окисного стресу тощо.

Проведені нами експерименти показали, що у хворих з діагнозом остеоартрит у клітинах крові зменшувалася експресія гену *LRP1* та збільшувалася експресія гену *OLR1* відносно показників контролю. Подібні зміни нами були зафіксовані і в крові групи пацієнтів з остеоартритом після одужання від COVID-19, але їх інтенсивність була більш виражена, що свідчить про можливі більш серйозні порушення експресії даних генів.

3.2.5. Концентрація білкових та небілкових сульфгідрильних груп у плазмі крові

Сульфгідрильні групи біологічних молекул можуть бути використані в якості значущих маркерів стану окисно-антиоксидантної рівноваги в організмі. Сірка, що входить до складу тіолової групи молекули, надає їй певні специфічні та надзвичайні властивості. За рахунок цих унікальних властивостей біологічні молекули здатні виконувати цілий спектр багатогранних функцій. Перш за все, основний мобільний пул сполук, що мають у своїй структурі сульфгідрильні групи, утворюють молекули глутатіону, який є трипептидом (L- γ -глутаміл-L-цистеїніл-гліцин) та належить до низькомолекулярних тіолових сполук. Молекули глутатіону приймають участь в детоксикаційних процесах для нейтралізації різних ксенобіотиків та сполук, що можуть утворюватися в організмі в процесі метаболізму. Крім того молекула відновленого глутатіону виконує антиоксидантну функцію, включаючи захист від активних форм кисню та азоту [112].

Таким чином, будучи носієм активної тіолової групи у формі залишку цистеїну, глутатіон діє як антиоксидант або безпосередньо, взаємодіючи з активними формами кисню/азоту та електрофілами, або діючи як кофактор для різних ферментів [180]. В цілому, відновлений глутатіон має важливе значення у регуляції та підтримці окисно-відновного статусу клітин, їх захисту від окисного ушкодження та дії токсичних ксенобіотиків [60].

Крім того сульфгідрильні групи є складовими функціональних груп білкових молекул (так звані білок-зв'язані SH-групи). В основному, в білкових молекулах висококонсервативні цистеїни у своїй більшості займають позиції у структурно-функціонально значущих ділянках. Там вони виконують цілий ряд важливих функцій: стабілізація білкової молекули, участь у каталізі, зв'язуючі метали та/або окисно-відновні регулюючі елементи [11, 310]. Таким чином, тіоли, як низькомолекулярної маси, так і цистеїнові тіоли білків, задіяні у виконання цілого спектру біохімічних реакцій: захист біологічних молекул від

окиснювальних та ксенобіотичних стресорних чинників, підтримка окисно-відновного гомеостазу та участь у клітинних сигнальних шляхах в організмі.

У наших експериментах ми визначили концентрацію небілкових, білкових та загальних SH-груп у плазмі крові пацієнтів. Встановлено, що у плазмі крові людей, у яких встановлений діагноз остеоартрит, концентрація небілкових SH-груп знижувалася в 1,4 раза порівняно з контрольною групою (рис. 3.25).

Нами показано, що значення даного параметра у плазмі крові осіб, що мали діагноз остеоартриту та які перехворіли COVID-19, знижувалася в 1,7 раза відносно даного показника умовно здорових людей та в 1,3 раза порівняно з групою осіб, у яких встановлений діагноз остеоартрит (рис. 3.25).

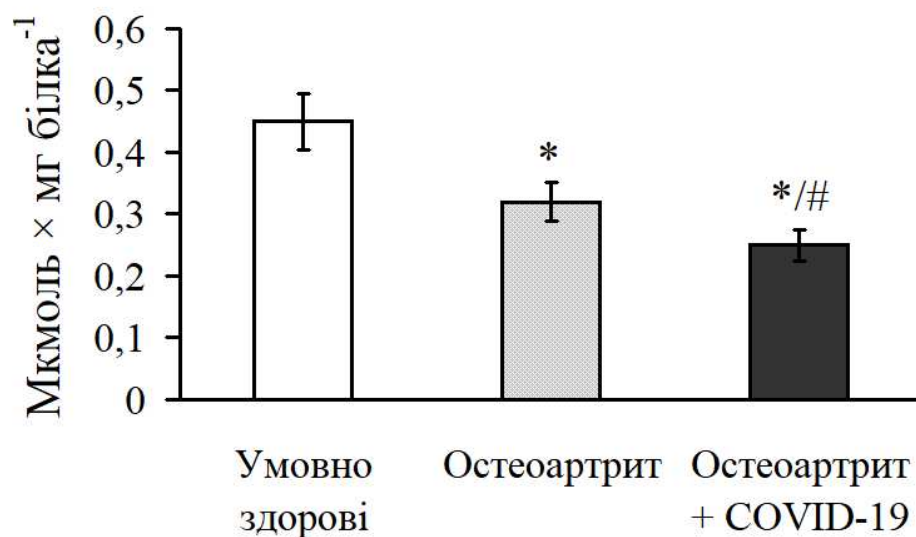


Рис. 3.25. Концентрація небілкових SH-груп у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Визначено, що у плазмі крові людей з діагнозом остеоартрит, концентрація білкових SH-груп знижувалася в 1,5 раза відносно показника групи умовно здорових людей (рис. 3.26).

Продемонстровано, що концентрація білкових SH-груп у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли COVID-19, знижувалася в 1,8 раза порівняно з показником контрольної групи та в 1,3 раза порівняно з групою осіб з патологією суглобів – остеоартрит (рис. 3.26).

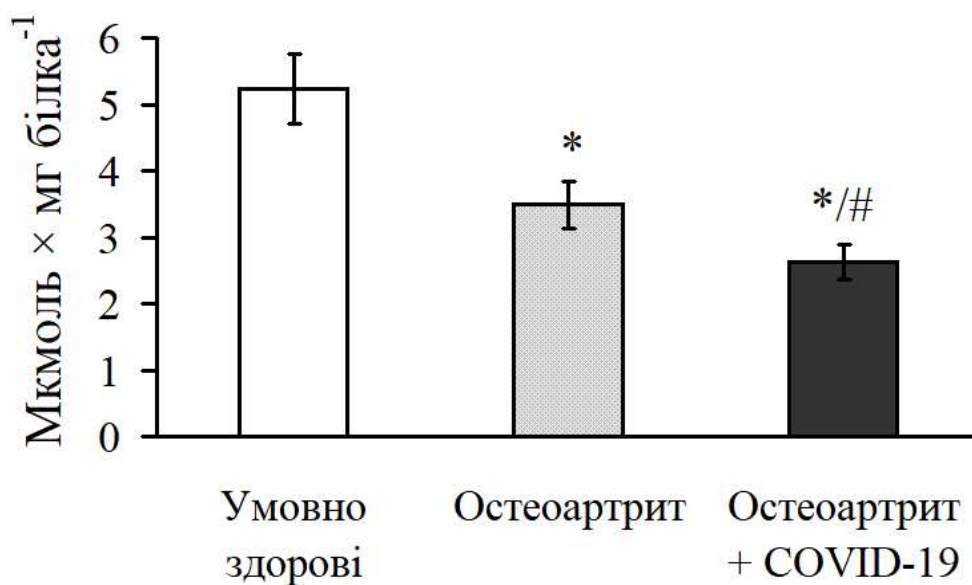


Рис. 3.26. Концентрація білкових SH-груп у плазмі крові дослідних груп
* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Нами було розраховано концентрацію загальних SH-груп у плазмі крові всіх дослідних груп. Встановлено, що у плазмі крові людей, хворих на остеоартрит, концентрація загальних SH-груп знижувалася в 1,5 раза порівняно з контрольною групою (рис. 3.27).

Показано, що значення даного параметра у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли COVID-19, знижувалася в 1,7 раза відносно даного показника контрольної групи людей та в 1,3 раза порівняно з групою осіб, що мали встановлений діагноз остеоартрит (рис. 3.27).

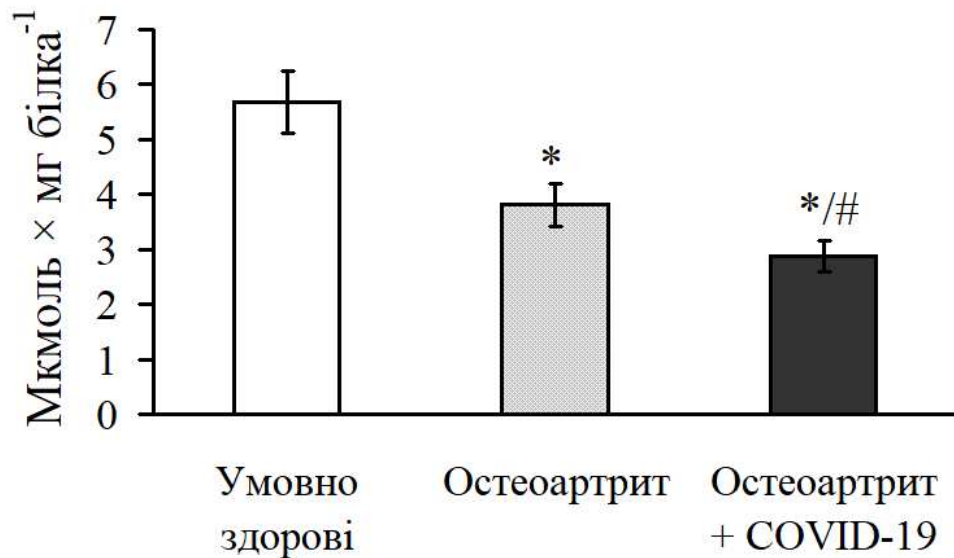


Рис. 3.27. Концентрація загальних SH-груп у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Проведені нами дослідження виявили зниження концентрації сполук, які містили у своєму складі небілкові сульфгідрильні групи, у плазмі крові хворих з діагнозом остеоартрит. Більш низький рівень небілкових SH-груп зафіксовано у групі людей з патологією суглобів, що перехворіли COVID-19. Отримані результати можуть бути пов'язані зі зниженням пулу відновленого глутатіону. Його нестача в організмі свідчить про зниження роботи антиоксидантної системи організму, що може провокувати порушення клітинних процесів та розвиток патологічних станів [172]. Відомо, що молекула глутатіону виконує функцію медіатора стійкості хряща до окисного стресу, а його недостатня кількість супроводжує розвиток остеоартритів [359].

Виявлене у наших експериментах зниження концентрації білкових сульфгідрильних груп (цистеїнових та метіонінових залишків) вірогідно пов'язано з окисними процесами та інтенсифікацією вільнорадикальних процесів, що було показано нами в попередніх дослідженнях. Надмірна кількість АФК призводить до окиснення білкових молекул та їх модифікації, які можуть бути необоротними та оборотними. Зокрема, при взаємодії

пероксиду водню з депротонованим цистеїнілтіолом білкових молекул буде призводити до утворення окисненого тіолу або сульфенової кислоти (R-SOH). Далі ця сульфенова кислота може зазнавати наступного окиснення та перетворення на гіперокиснений цистеїнсульфінової кислоти (R-SO₂H). За умов наявності ще більшої кількості вільних радикалів цистеїни далі можуть окиснюватись до цистеїнсульфонової кислоти (R-SO₃H). Процес формування сульфенових кислот є ферментативно оборотним та здійснюється за допомогою ферментних систем глутатіону та тіоредоксину. В свою чергу утворені цистеїнсульфінові кислоти можуть бути відновлені за допомогою ферментів лише в певних білкових молекулах. Саме модифікація білків до цистеїнсульфонової кислоти є необоротним процесом, який призводить до структурних перебудов білкових молекул, що порушує їх функціонування [48, 308].

Надмірна кількість модифікованих білків робить їх більш сприйнятливими до протеолізу, що ще збільшує інтенсивність подальших деструктивних процесів. Білкові молекули, що зазнали окиснення, самі стають джерелом вільних радикалів, вони зменшують антиоксидантні резерви клітин (глутатіон, аскорбінова кислота). Також такі окиснені білки сприяють подальшому ушкодженню інших біологічних молекул, що при остеоартриті буде сприяти розвитку синовіального запалення, руйнуванню хрящової та кісткової тканини [134, 160].

Таким чином, наші дані показали, що у плазмі крові хворих на остеоартрит інтенсифікуються вільнорадикальні процеси, які спричиняють окиснення сульфгідрильних груп білків та виснажують запаси небілкових молекул, що містять SH-групи, перш за все рівень низькомолекулярного антиоксиданту – відновленого глутатіону, який є носієм активної тіолової групи у формі залишку цистеїну. Пацієнти з остеоартритом, що одужали після COVID-19, мали більше порушення у плазмі крові балансу білкових та небілкових сульфгідрильних груп, що пов'язано з більшою інтенсивністю вільнорадикальних процесів в організмі таких хворих.

3.2.6. Активності ферментів антиоксидантного захисту у плазмі крові

Ферментативні антиоксиданти діють, розщеплюючи та видаляючи вільні радикали з організму. До антиоксидантних ферментів належать супероксиддисмутаза та каталаза, які є першою захисною ланкою від АФК. Супероксиддисмутазою каталізується реакція дисмутації одного з найшкідливіших видів окиснювачів – супероксидного радикалу ($O_2^{\bullet-}$) до пероксиду водню (H_2O_2). Завдяки даному антирадикальному ферменту концентрація супероксидного радикалу залишається на достатньо низькому рівні, що не дає йому проявляти свою токсичну дію на біологічні молекули. Другий антиоксидантний фермент – каталаза, яка приймає участь у розщепленні гідроген пероксиду на молекулу води та молекулярний кисень. Відомо, що молекула пероксиду водню у низьких концентраціях функціонує як сигнальний агент, особливо у вищих організмах. Він виконує функцію внутрішньо- та міжклітинного месенджера для передавання сигналів при стресових і нестресових реакціях. З іншого боку, у надмірній кількості пероксид водню бере участь в окисненні багатьох біологічних молекул [191]. Тому дуже важливим пристосуванням організмів від надмірної кількості вільних радикалів є злагоджене функціонування таких антиоксидантних ферментів як супероксиддисмутаза та каталаза. Активність цих ферментів є важливими маркерами для оцінки окисно-антиоксидантного статусу організму [353].

Проведені нами експерименти по визначенню активності антиоксидантних ферментів, допомогли встановити, що у пацієнтів хворих на остеоартрит колінних суглобів, у плазмі крові супероксиддисмутазна активність зменшувався в 1,4 раза відносно показників групи умовно здорових людей (рис. 3.28).

Нами було зазначене зниження активності даного ферменту у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом, що перенесли коронавірусну хворобу в 1,7 раза порівняно зі здоровими пацієнтами та в 1,3 раза відносно групи пацієнтів з остеоартритом (рис. 3.28).

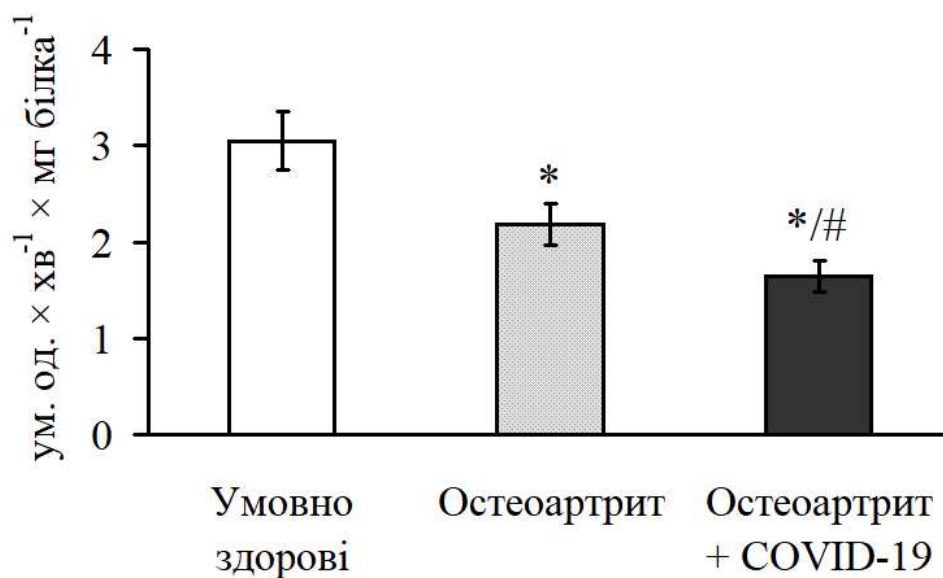


Рис. 3.28. Супероксиддисмутазна активність у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Експериментальні дослідження показали, що у групі пацієнтів з діагнозом остеоартрит колінних суглобів II-III ступеню, у плазмі крові каталазна активність знижувалася в 1,6 раза порівняно з пацієнтами умовно здорових людей (рис. 3.29).

Встановлено, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, які перехворіли COVID-19, у плазмі крові каталазна активність була знижена в 2 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові та в 1,4 раза відносно групи пацієнтів з остеоартритом (рис. 3.29).

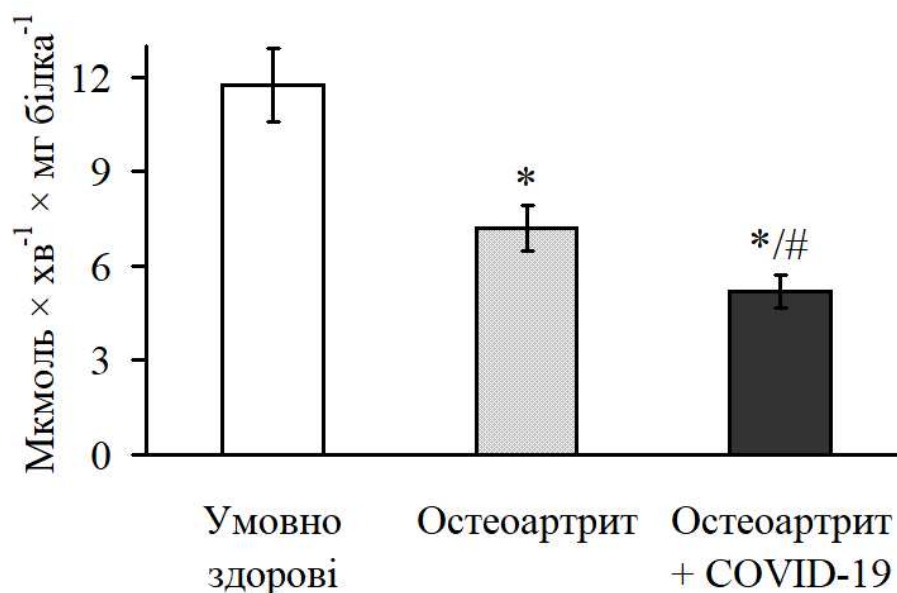


Рис. 3.29. Каталазна активність у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Виявлене нами в експерименті зниження активності ферментів антиоксидантного захисту у плазмі крові хворих на остеоартрит свідчить про виснаження антиоксидантного резерву організму та надмірну продукцію вільних радикалів. Зменшення супероксиддисмтазної та каталазної активності – ферментів першої лінії антиоксидантного захисту від АФК, буде сприяти більш інтенсивному окисненню біологічних молекул. Згідно даних літератури, при остеоартриті АФК спроможні спричинювати руйнування хряща в результаті розщеплення його білків (колагену, агрекану) та активації матриксних металопротеїназ, які мають ключове значення у деструкції хряща. Також, АФК можуть впливати опосередкованим шляхом через модулювання чутливих до редокс-статусу сигнальних шляхів, які приймають участь у регулюванні експресії генів, що залучаються у патофізіологію остеоартриту [39, 359]. Нами встановлено більше виснаження активності антиоксидантних ферментів у крові пацієнтів з остеоартритом, які перехворіли COVID-19, що свідчить про більше радикальне навантаження на організм таких пацієнтів та розвиток більш глибокого окисного стресу.

Таким чином, проведене нами вивчення вільнорадикальних процесів у крові хворих з діагнозом остеоартрит показало зміщення окисно-антиоксидантної рівноваги у бік активації прооксидантних механізмів та порушення роботи першої ланки антиоксидантної системи, про що свідчило надмірна продукція АФК, продуктів окиснення білкових та ліпідних молекул, зміна експресії генів *LRP1* та *OLR1*, що залучені у окисні та запальні процеси, а також зниження активності антиоксидантних ферментів. Нами були зафіксовані односпрямовані зміни досліджуваних параметрів у пацієнтів з остеоартритом, що не інфікувалися SARS-CoV2, так і тих, що одужали після COVID-19. Більшою мірою виявлений розвиток окисного стресу у пацієнтів з діагнозом остеоартрит, що перехворіли COVID-19.

3.3. Маркери метаболізму хрящової тканини у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції

3.3.1. Рівень матриксних металопротеїназ у плазмі крові

Матриксні металопротеїнази (ММП) являють собою велику родину кальцій- та цинк-залежних протеолітичних ферментів, які широко експресуються в багатьох тканинах організму та беруть участь у багатьох біологічних процесах, які регулюються гормонами, факторами росту та цитокінами [157]. Основною функцією ММП є деградація всіх компонентів екстрацелюлярного матриксу (extracellular matrix, ECM). Ці молекули сприяють росту клітин, проліферації, ремоделюванню, ангиогенезу, запаленню, модулюючи синтез та вивільнення цитокінів і хемокинів [30]. Індивідуальні ММП регулюють специфічні імунні процеси, такі як приплив і міграція лейкоцитів, антимікробну активність, активацію макрофагів і відновлення бар'єрної функції, як правило, шляхом обробки низки нематриксних білкових субстратів [190]. Протеолітична активність ММП суворо регулюється на

кількох рівнях, включаючи активацію проферменту до активної форми, експресію мРНК, взаємодію зі специфічними компонентами ЕСМ та інгібування багатьма ендogenous молекулами, такими як тканинні інгібітори металопротеїназ (ТІМП). ТІМП включає багатофункціональну родину з чотирьох білків (ТІМП-1, -2, -3 і ТІМП-4), які зв'язуються з каталітичним сайтом матриксних металопротеїназ. Тканинні інгібітори металопротеїназ також мають функції, незалежні від інгібування ММП, за допомогою чого вони безпосередньо зв'язують рецептори клітинної поверхні для посередництва внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. ТІМП-1, який секретується більшістю клітин організму, здатний специфічно пригнічувати активні форми майже всіх типів ММП, за винятком ММП-14, ММП-16, ММП-18 та ММП-19 [44]. Надмірна експресія ММП в результаті дисбалансу між активністю протеолітичних ферментів і тканинними інгібіторами металопротеїназ може призводити до порушення гомеостазу тканин і розвитку різних патологій, таких як рак, ожиріння, діабет, фіброзні розлади, аутоімунні та серцево-судинні захворювання тощо.

Деградація ЕСМ, у тому числі колагенів і протеогліканів, під час розвитку остеоартриту, що супроводжується прогресуючою деструкцією суглобового хряща, склерозом субхондральної кістки та хронічним запаленням навколишніх тканин [301]. Відомо, що щонайменше сім ММП експресуються в тканинах суглобового хряща, включаючи ММП-1, ММП-2, ММП-13 та ММП-14, які беруть участь у тканинному метаболізмі, їхні рівні зростають лише за аномальних умов. Експресія ММП-3, ММП-8 і ММП-9 в хрящі є винятковою характеристикою патологічних станів [215]. Слід зазначити, що особи з вищезазначеними патологічними станами (тобто супутніми захворюваннями) найбільш сприйнятливі до інфікування SARS-CoV-2 та тяжкого перебігу захворювання COVID-19, пандемія якого стала глобальним викликом для суспільства.

Ряд публікацій описують участь деяких ММП при COVID-19 [99]. Зокрема, у крові пацієнтів, інфікованих SARS-CoV-2, виявлено зміни рівня та

активності ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-7 та ММП-9, що корелювало з тяжкістю та тривалістю захворювання [57, 79, 276, 282]. У той час як механізми гострої фази COVID-19 і методи її лікування активно вивчаються, тяжкість і ступінь віддалених наслідків інфекції SARS-CoV-2 залишаються до кінця не вивченими, особливо за наявності супутніх патологій. З'являється все більше доказів того, що люди, які перенесли COVID-19, можуть відчувати постійні симптоми, що вражають різні системи органів після гострої фази інфекції, що називається «тривалим COVID-синдромом» («long COVID syndrome») або постковідним синдромом (post-acute COVID-19 syndrome, PACS) [83, 128].

Крім того, ризик тривалого COVID-19 буде вищим із збільшенням віку, що критично для багатьох людей старше 60 років із певною тяжкістю остеоартриту [258]. Пацієнти з остеоартритом в анамнезі та попереднім діагнозом COVID-19, які мають стійкі симптоми болю в суглобах або м'язах, становлять серйозну проблему для клініцистів. Остеоартрит характеризується втратою хряща, який ініціює активацію хондроцитів і колагенази, такі як матриксні металопротеїнази та фактори запалення, що вивільняються з матриксу [167]. Цей процес призводить до локальної активації запальної відповіді [87, 168, 169]. Незважаючи на значну кількість досліджень щодо ММП як у нормальних фізіологічних станах, так і при захворюваннях, включаючи остеоартрит суглобів, їх функціонування при COVID-19 та супутніх захворюваннях залишається нез'ясованим. Повне розуміння різних факторів і біохімічних шляхів, пов'язаних з активністю матриксних металопротеїназ, допоможе з'ясувати патофізіологічні механізми SARS-CoV-2 і може представляти інтерес для розробки потенційних методів лікування, в тому числі супутніх захворювань. Тому нашим наступним завданням було визначити рівні ММП та ТІМП-1 у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом після SARS-CoV-2-інфекції.

ММП повсюдно поширені в тканинах і біологічних рідинах та продукуються різними клітинами, включаючи макрофаги, фібробласти, хондроцити, ендотеліальні та альвеолярні епітеліальні клітини. Дослідження

показують, що матриксні металопротеїнази можуть брати участь у різних фізіологічних і патологічних процесах, пов'язаних з регуляцією запальних та імунних реакцій [280].

За фізіологічних умов активність ММП жорстко регулюється. При розвитку патологій тканинний і циркулюючий рівень протеолітичних ферментів підвищується за рахунок стимулюючої дії цитокінів, зокрема ІЛ-1 β та ФНП- α . Матриксні металопротеїнази значно поширюють вірусну інфекцію та реконструюють тканини дихальних шляхів та викликають фіброз тканин [74].

Більшість матриксних металопротеїназ, включаючи ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 і ММП-10, вважаються основними ферментами, відповідальними за деградацію білкових компонентів ЕСМ у суглобовому хрящі при остеоартриті. Дослідження показали підвищення рівня експресії матриксних металопротеїназ у всіх суглобових тканинах, синовіальній рідині та крові пацієнтів з остеоартритом, що, ймовірно, має значні наслідки для прогресування даного захворювання [215].

Отже, значна дегенерація суглобового хряща є основною подією в патогенезі остеоартриту. Ключовим ферментом, відповідальним за ці дегенеративні зміни в хрящі, є матриксні металопротеїнази. Тому наступним етапом наших досліджень була оцінка рівней матриксних металопротеїназ та тканинного інгібітора металопротеїнази-1 у плазмі крові осіб з діагнозом остеоартрит та після інфікування SARS-CoV-2.

Проведені експерименти показали відсутність змін у плазмі крові рівня ММП-1 як у групі пацієнтів з діагнозом остеоартрит, так і групі осіб з діагнозом остеоартрит, що одужали від 6 до 9 місяців після COVID-19 порівняно з групою контролю, яку складали умовно здорові особи (рис. 3.30).

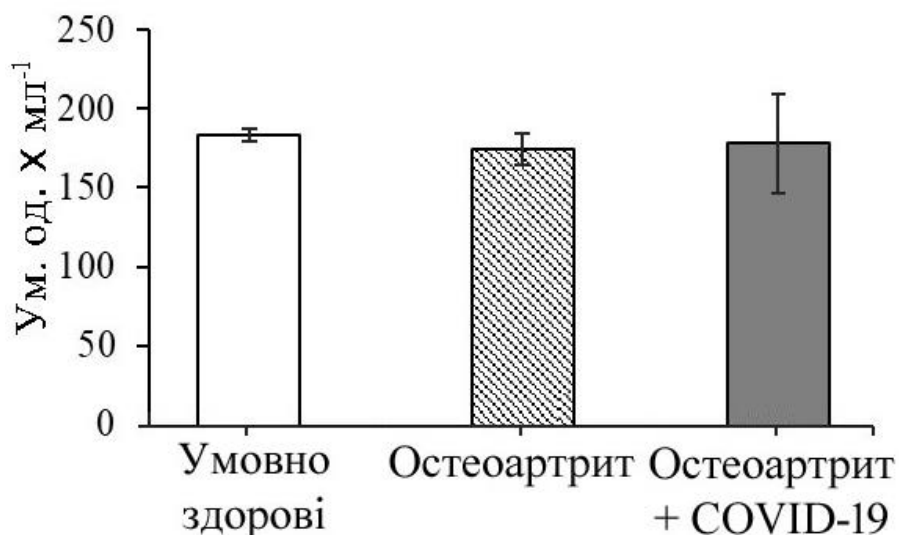


Рис. 3.30. Рівень MMP-1 у плазмі крові дослідних груп

Виявлено, що у плазмі крові групи осіб, що мали діагноз остеоартрит рівень MMP-2 зростав в 1,3 раза порівняно з групою контролю, яку склали умовно здорові люди (рис. 3.31). Нами показано, що рівень даного показника у плазмі крові пацієнтів, яким поставлено діагноз остеоартрит та які одужали після хвороби COVID-19, збільшувалася в 1,5 раза відносно даного показника контролю та в 1,2 раза порівняно з даним параметром у групі осіб з остеоартритом (рис. 3.31).

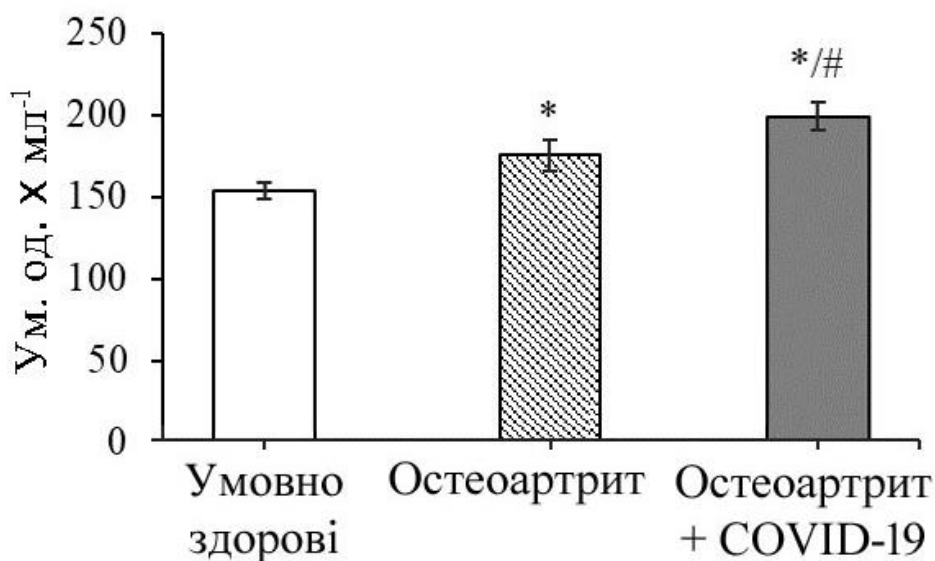


Рис. 3.31. Рівень MMP-2 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Експериментальні дослідження показали, що у групі пацієнтів з діагнозом остеоартрит, у плазмі крові рівень ММП-3 підвищувався в 1,4 раза порівняно з пацієнтами контрольної групи людей (рис. 3.32). Встановлено, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, що хворіли на COVID-19, у плазмі крові рівень ММП-3 був підвищеним також в 1,4 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові (рис. 3.32).

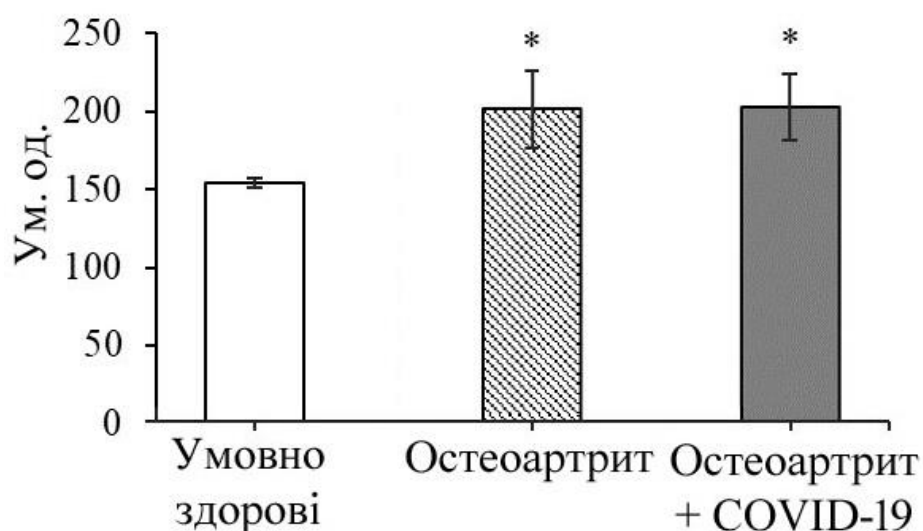


Рис. 3.32. Рівень ММП-3 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей

Встановлено, що у групі осіб з діагнозом остеоартрит, у плазмі крові рівень ММП-8 знижувався в 1,4 раза відносно контролю (рис. 3.33). Показано, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, які зазнали дії COVID-19, у плазмі крові рівень ММП-8 підвищувався в 1,2 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові та в 1,6 раза порівняно даним показником у групі хворих на остеоартрит (рис. 3.33).

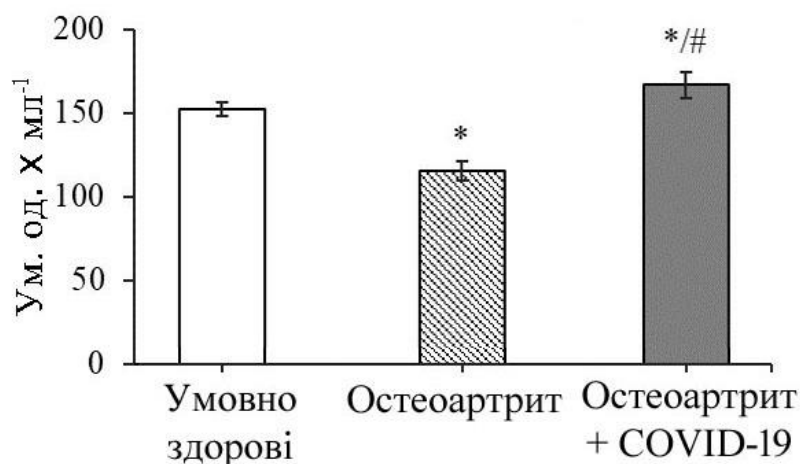


Рис. 3.33. Рівень ММП-8 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Продемонстровано, що у плазмі крові пацієнтів з встановленим діагнозом остеоартрит рівень ММП-9 зростав в 1,6 раза порівняно з контролем (рис. 3.34). Група осіб з діагнозом остеоартрит, які одужали після хвороби COVID-19, у плазмі крові рівень ММП-9 збільшувався в 1,4 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові та зменшувався в 1,2 раза порівняно з показником групи осіб з діагнозом остеоартрит (рис. 3.34).

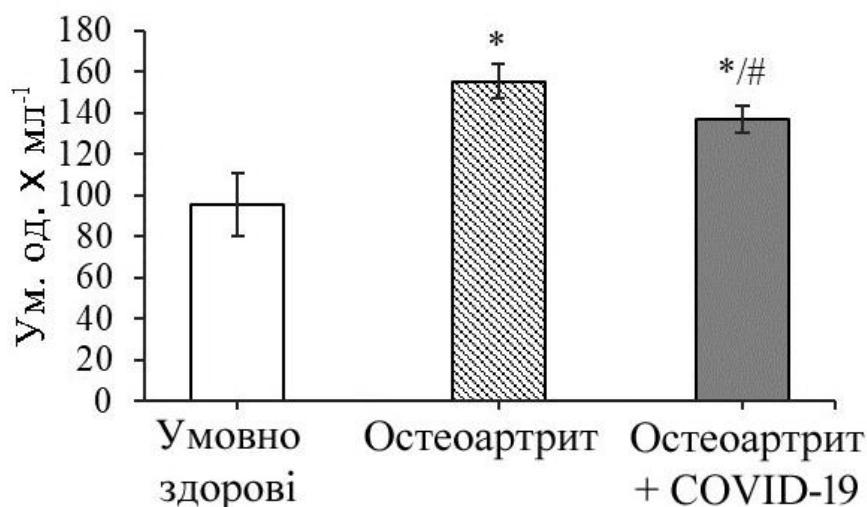


Рис. 3.34. Рівень ММП-9 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Проведені експерименти показали, що у групі пацієнтів з діагнозом остеоартрит, у плазмі крові рівень ММП-10 знижувався в 1,4 раза порівняно з показником групи осіб контролю (рис. 3.35).

Подібні результати були отримані у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, які одужали від хвороби COVID-19: у плазмі крові рівень ММП-10 знижувався в 1,4 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові (рис. 3.35).

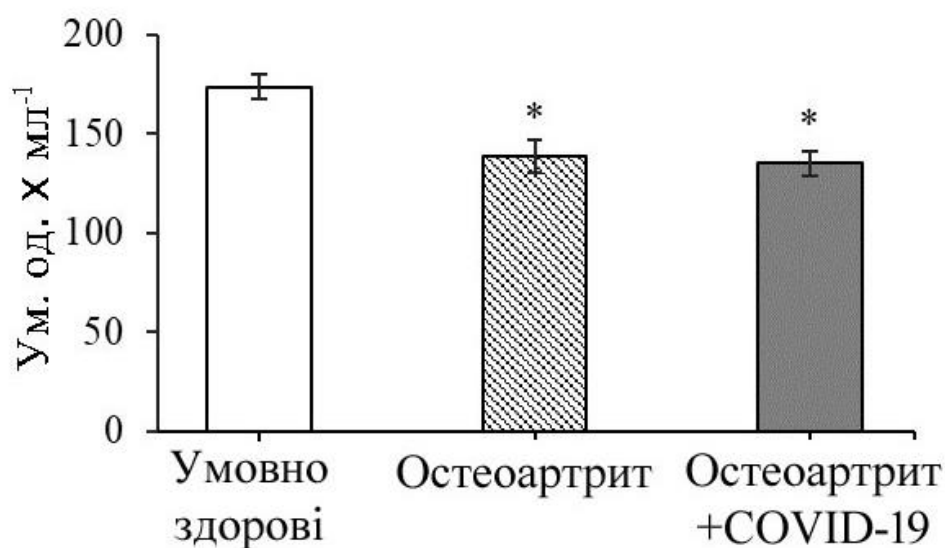


Рис. 3.35. Рівень ММП-10 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей

Продемонстровано в наших дослідках, що у групі осіб з діагнозом остеоартрит, рівень ТІМП-1 знижувався в 1,3 раза у порівнянні з контрольними показниками осіб, що були здорові (рис. 3.36).

Зазначено, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит та які одужали після хвороби COVID-19, у плазмі крові рівень ТІМП-1 також був зниженим в 1,3 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові (рис. 3.36).

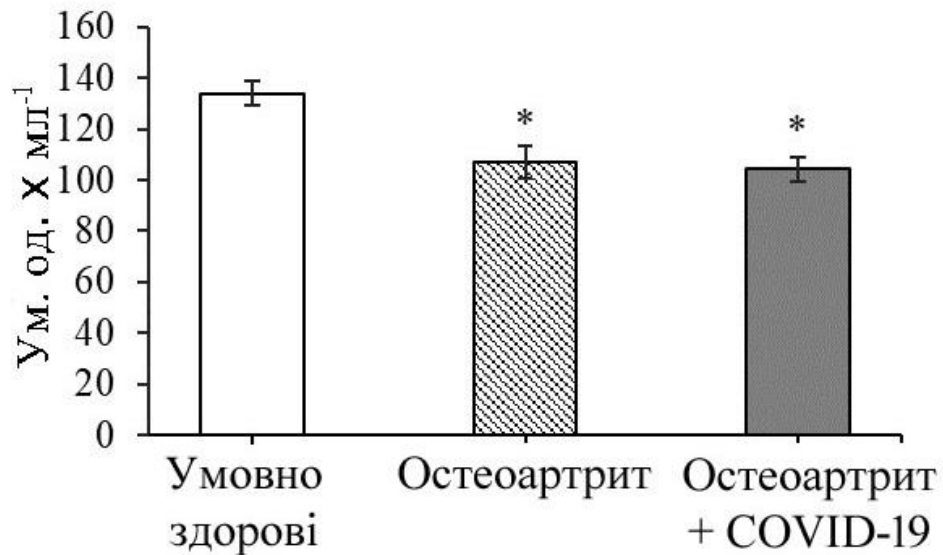


Рис. 3.36. Рівень ТІМП-1 у плазмі крові дослідних груп

* – $p \leq 0,05$ відносно групи умовно здорових людей

Дані нашого дослідження узгоджуються з даними інших дослідників щодо підвищення рівня ММП в експериментальних моделях остеоартриту на фоні дегенеративно-дистрофічного процесу в суглобі. Так, японські дослідники показали, що рівні експресії білків ММП-2, ММП-3 і ММП-9 корелювали з розвитком остеоартриту [226]. Слід зазначити, що ММП-2 і ММП-9, які належать до білків-желатиназ, впливають на інші мішені, включаючи позаклітинний матрикс, фактори росту, хемокіни та цитокіни, що спричинює вивільнення цих лігандів, які, у свою чергу, активують основні сигнальні шляхи, що беруть участь у процесах запалення та ангіогенезу [354]. Ці желатинази найбільш відомі своєю участю в легеневій, міокардальній та пухлинній патології, але вони також є важливими протеазами, що беруть участь у прогресуванні остеоартриту [44, 215].

ММП-3, відома як стромелізін-1, який здатний розщеплювати кілька компонентів ЕСМ, що мають важливе значення в тканинному гомеостазі під час остеоартриту, і може активувати інші про-ММП. Також ММП-3 вважається системним маркером, що відображає локальне запалення в суглобі. Останні звіти показують, що ММП-3 може відігравати провідне значення у формуванні

легеневих патологій, таких як гостра легенева травма, ГРДС і легеневий фіброз. Однак огляд літератури не виявив жодних даних про зв'язок між ММП-3 та інфекцією SARS-CoV-2 [280].

Існує припущення, що посилення експресії деяких матриксних металопротеїназ може бути результатом дії прозапальних медіаторів, зокрема ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-15 і ФНП- α , рівень яких підвищується в суглобовій тканині та периферичній крові, або мононуклеарних клітинах (наприклад, макрофагах і Т-клітинах), які інфільтрують синовіальну оболонку при остеоартриті [226, 304].

У цьому контексті цитокіни та медіатори запалення визначають стан імунної системи при COVID-19. З'являється все більше доказів ускладнень після одужання після COVID, порушення або дерегуляції багатьох систем органів, які можуть бути пов'язані з широким тканинним тропізмом інфекції SARS-CoV-2 і викликаними нею гіперзапальними змінами в організмі [312].

Виявлені нами підвищені рівні ММП-2, ММП-3 і ММП-9 у плазмі крові осіб з остеоартритом порівняно зі здоровою контрольною групою, можуть вказувати на значний вплив SARS-CoV-2 на прогресування захворювання суглобів у період після коронавірусної хвороби. Однак можливо, що циркулюючі рівні матриксних металопротеїназ можуть не відображати їхні рівні в тканинах. На жаль, експериментальні дослідження з подібного питання на тлі пост-COVID-19 не проводилися через відносно недавній початок цього захворювання, або матриксні металопротеїнази розглядалися лише в системних дослідженнях COVID-19 [75, 79].

ММП-10 (стромелізін-2) за будовою та субстратною специфічністю подібний до ММП-3 та індукується прозапальними цитокінами. Зниження рівня ММП-10 у плазмі крові, що було нами виявлено в групі пацієнтів з остеоартритом та реконвалесцентних пацієнтів із COVID-19, може бути результатом виснаження системної імунної відповіді або відстроченої та потенційно тривалої компенсаторної протизапальної реакції.

Аналізуючи отримані дані, можна припустити, що найвищу чутливість до інфекції SARS-CoV-2 серед усіх досліджених параметрів системи протеоліз-антипротеоліз були ММП-2 та ММП-8, рівень яких у плазмі крові реконвалесцентів після COVID-19 підвищувався на 9,3 % та 37,7 % відповідно, а рівень ММП-9, що знизився на 12 %, порівняно з особами, що не хворіли на вірусну інфекцію. Такі зміни рівнів матриксних металопротеїназ у плазмі крові можуть бути результатом системних розладів, спричинених SARS-CoV-2, пов'язаних із надмірним вивільненням цитокінів і дисбалансом ангіотензинперетворюючого ферменту 2, який є мішенню опосередкованої дії вірусу [81].

Незважаючи на важливість ММП-1 (інтерстиціальної колагенази) у патогенезі остеоартриту через її здатність розкласти широкий спектр компонентів позаклітинного матриксу, ми не виявили суттєвих змін у плазмових рівнях цього протеолітичного ферменту, коли обидві групи пацієнтів, з остеоартритом та реконвалесцентними пацієнтами з COVID-19 із патологією суглобів, порівнювали з групою контролю, що складала здорові люди. Існує декілька досліджень щодо рівня експресії та концентрації ММП-1 у синовії, хрящовій тканині, крові при остеоартриті [325].

У деяких дослідженнях концентрація ММП-1 у синовіальній рідині та сироватці крові пацієнтів з остеоартритом колінного суглоба була подібною до її концентрації у здорових осіб [147] або відзначали відносно вищий рівень ММП-1 у синовіальній рідині, ніж у сироватці крові, особливо на ранніх стадіях остеоартриту, який знижувався в міру прогресування захворювання [143, 147]. В інших дослідженнях виявлено виражене підвищення рівня ММП-1 порівняно з контролем [169].

Оскільки матриксні металопротеїнази можуть інтенсивно руйнувати тканини, їх активність жорстко контролюється тканинними інгібіторами металопротеїназ (ТІМП). Відносна концентрація ТІМП регулює активність ММП у плазмі крові, а більш високе співвідношення ММП/ТІМП може

вказувати на гірший прогноз захворювання. З тканинних інгібіторів ТІМП-1, здається, має найвищу спорідненість до ММП-1, ММП-3 і ММП-9 [304].

Нині недостатньо вивчено регуляцію експресії інгібіторів ММП і майже немає даних про фактори, які стимулюють або пригнічують вироблення цих регуляторів. У ході нашого дослідження встановлено зниження рівня ТІМП-1 у всіх осіб з діагнозом остеоартрит, а також тих, хто одужав від гострої інфекції COVID-19, порівняно з контролем. Показано, що рівні ТІМП можуть бути підвищені у пацієнтів, що мали захворювання суглобів – остеоартрит. Тим не менш, незрозуміло, чи вони підвищуються як компенсаторна реакція на підвищені рівні ММП, чи вони певним чином сприяють прогресуванню захворювання [244]. Для розуміння встановлених ефектів, необхідно проведення більш глибоких досліджень, щоб можна було точно сформулювати конкретні механізми зниження ТІМП-1 у всіх груп досліджуваних осіб, що мали діагноз остеоартрит.

3.3.2. Рівні експресії генів *TGFBI*, *FOXO1*, *COMP* та концентрація білка *COMP* у крові

Нами було проведено вивчення в крові маркерів метаболізму хрящової тканини на молекулярно-генетичному рівні – за рівнем експресії генів *TGFBI* (transforming growth factor beta, трансформуючий фактор росту бета), *FOXO1* (forkhead box protein O1, фактор транскрипції FoxO1) та *COMP* (cartilage oligomeric matrix protein, хрящовий олігомерний білок матриксу), а також визначена концентрація білка олігомерної матриці хряща (cartilage oligomeric matrix protein, *COMP*).

Згідно даних дослідників при остеоартриті відбуваються зміни рівня хрящового олігомерного колагену, агрекану та хрящового олігомерного матриксного білка (cartilage oligomeric matrix protein, *COMP*, також відомий як тромбоспондин-5; кодується геном *COMP*) [142, 216].

У ряді досліджень виявлено, що у людей мутації гена *COMP* можуть спричинити дисплазійні зміни в суглобах, при цьому недостатня кількість білка олігомерної матриці хряща буде призводити до розвитку артритів та інших патологій суглобів [142].

Важливу регуляторну роль у захисті структур хрящової тканини суглобу та підтримки гомеостазу хондроцитів виконують процеси сигналіngu трансформуючого фактора росту- β 1 (transforming growth factor beta, TGF- β 1, кодується геном *TGFBI*) [216, 234].

На сьогодні залишаються до кінця не вивченими регуляторні механізми та сигнальні шляхи, що приймають участь у керуванні захисту хондроцитів TGF- β при остеоартриті. Не так давно дослідники встановили значну роль фактору транскрипції FoxO1 (forkhead box protein O1, кодується геном *FOXO1*) як значущого медіатора TGF- β сигнального шляху, який здатний залучатися у захист від остеоартриту за рахунок регуляції гомеостазу хрящової тканини суглобу [322].

У ряді досліджень було показано кореляцію між зменшенням рівня експресії генів *TGFBI*, *FOXO1* та остеоартрит-подібними порушеннями у суглобах як у людини, так і на моделях на тваринах [178, 205, 322].

У наших дослідженнях ми провели визначення експресію генів *TGFBI*, *FOXO1* та *COMP* у клітинах крові осіб, що мали діагноз остеоартрит та у осіб з остеоартритом, що одужали після COVID-19.

В ході проведених експериментів виявлено, що у крові осіб, яким встановили діагноз остеоартрит рівень експресії гена *TGFBI* знижувався у 2,1 раза порівняно з контрольною групою здорових людей (рис. 3.37).

Показано, що у групі осіб з остеоартритом колінних суглобів після одужання від COVID-19, рівень експресії гена *TGFBI* зменшувався у 2,5 раза відносно показника групи контролю та в 1,4 раза відносно параметру групи осіб з встановленим остеоартритом (рис. 3.37).

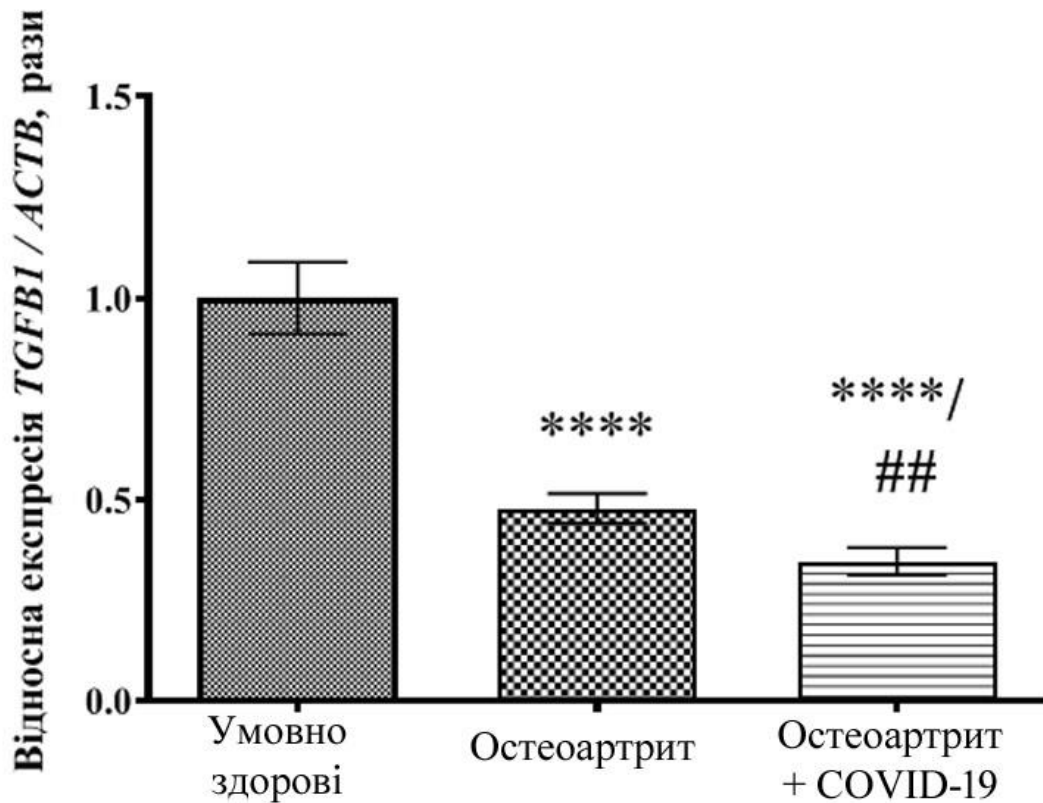


Рис. 3.37. Рівень експресії гена *TGFBI* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; ## – $p \leq 0,01$ відносно групи людей з остеоартритом

Зазначимо, що наші подільші дослідити виявили, що у клітинах крові осіб, яким встановили діагноз остеоартрит рівень експресії гена *FOXO1* знижувався в 2,5 раза порівняно з контрольною групою, що складала здорові люди (рис. 3.38).

Продемонстровано, що у осіб з остеоартритом колінних суглобів після COVID-19, рівень експресії гена *FOXO1* зменшувався в 3 раза відносно контрольних значень та в 1,5 раза порівняно з показником групи осіб з остеоартритом (рис. 3.38).

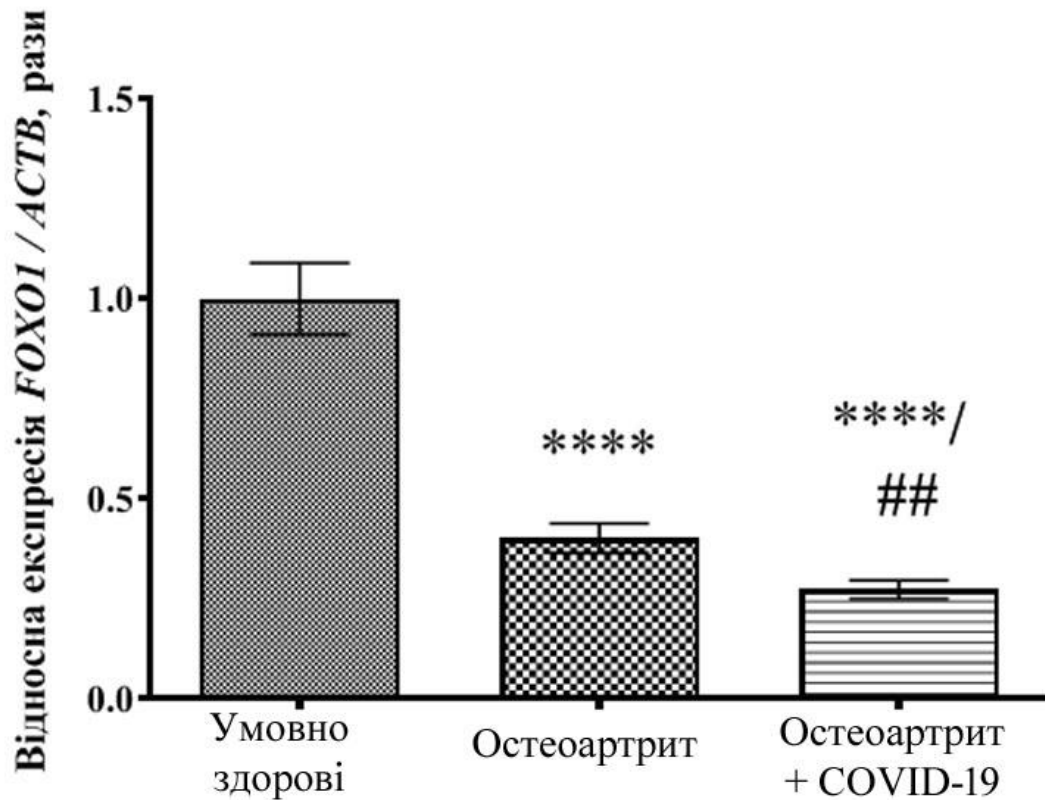


Рис. 3.38. Рівень експресії гена *FOXO1* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; ## – $p \leq 0,01$ відносно групи людей з остеоартритом

В ході подальших досліджень було виявлено, що у групі пацієнтів, що мали діагноз остеоартриту, у клітинах крові рівень експресії гена *COMP* знижувався в 2,4 раза порівняно з показником групи контролю (рис. 3.39).

Виявлено, що у пацієнтів групи з діагнозом остеоартрит, які одужали від хвороби COVID-19, у крові рівень експресії гена *COMP* був зниженим в 2,8 раза відносно групи з особами, що були умовно здорові та знижувалась в 1,4 раза порівняно з параметром групи осіб з визначеною патологією суглобів остеоартрит (рис. 3.39).

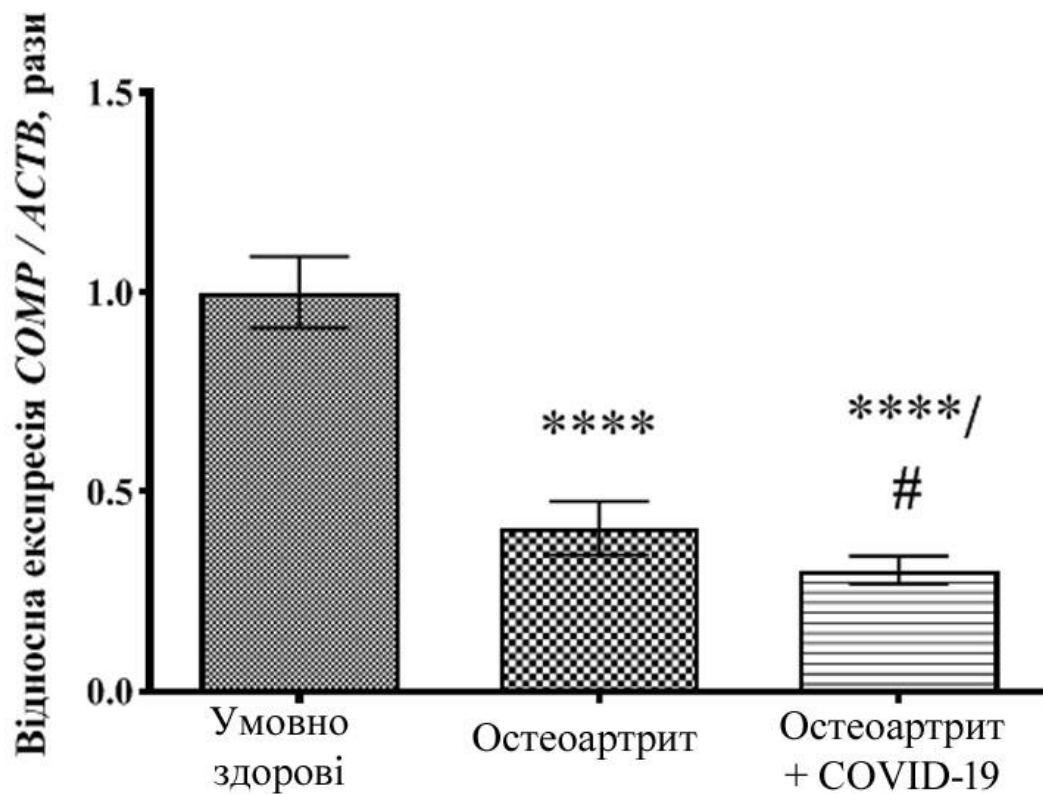


Рис. 3.39. Рівень експресії гена *COMP* у крові дослідних груп

**** $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Під час подальших експериментів було виявлено, що в плазмі крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит, концентрація хрящового олігомерного матричного білка підвищувалась в 2,8 рази відносно показників контрольної групи людей (рис. 3.40).

Продемонстровано, що у плазмі крові осіб з встановленим діагнозом остеоартрит та які одужали від хвороби COVID-19, концентрація COMP зростала в 3 рази порівняно з даним параметром контрольної групи та в 1,2 рази відносно показника групи пацієнтів з остеоартритом (рис. 3.40).

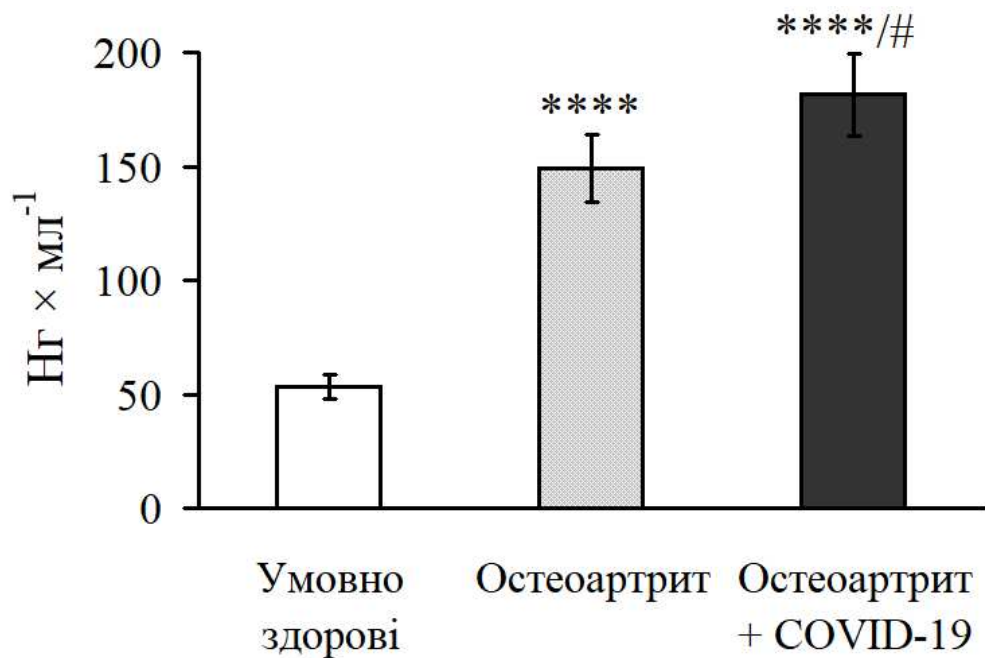


Рис. 3.40. Концентрація COMP у плазмі крові дослідних груп

**** – $p \leq 0,0001$ відносно групи умовно здорових людей; # – $p \leq 0,05$ відносно групи людей з остеоартритом

Виконані вченими експериментальні дослідження по вивченню трьох білків FoxO (-1, -3 та -4) виявили, що TGF- β 1-залежний сигнальний шлях приймає участь у регуляції тільки FoxO1 з використанням TAK1 кінази, що активується TGF- β . Дана кіназа (друга назва MAP3K7, «мітоген-активована білкова кіназа кінази кінази 7»; mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7) являє собою цитозольну серин/треонінову протеїнкіназу родини MAP3K, яка є компонентом ряду сигнальних шляхів, які приймають участь у регулюванні запалення та імунної відповіді організму. Зокрема, було показано в суглобових хондроцитах стабільну індукцію експресії гена *FOXO1* та його продукту під дією фактору TGF- β 1 [322].

При цьому, на моделях на тваринах у хрящовій тканині спостерігалась постнатальна втрата FoxO1, яка спричиняла розвиток остеоартрит-подібних патологій: спостерігалось на початкових стадіях потовщення хрящової структури, яке з часом призводило до поступового руйнування хряща [178, 205, 322]. Інші вчені показали схожі результати у осіб з діагнозом остеоартрит, а

також у людей вікової групи при старінні хряща [317]. Встановлено, що гіперекспресія *FOXO1* на тваринній моделі мишей попереджувала формування остеоартриту. Отже, було висловлено думку про те, що FoxO1 належить до ключових низхідних ефекторів передачі сигналів TGF- β в процесах регуляції постнатального гомеостазу хрящової тканини [322].

Важливим процесом для підтримки гомеостазу у хрящовій тканині суглобу є аутофагія, яка характерна для тканин із низькою швидкістю обміну клітин. Відомо, що загибель клітин та патогенез остеоартриту залежать від процесів гальмування аутофагії. В той же час, було показано залежність між активацією процесів аутофагії та зменшенням тяжкості перебігу експериментального остеоартриту [61].

Однак на сьогоднішній день механізми регуляції аутофагії в суглобовому хрящі ще залишаються до кінці не вивченими [322]. У дослідженнях на чолі з Cheng показано задіяність TGF- β /TAK1-FoxO1 сигналіngu до процесів регуляції аутофагії у хрящовій тканині [61, 322].

Виявлено патологічні зміни в процесах аутофагії у зворотно постмітотичних клітинах, що викликає нагромадження пошкоджених білкових молекул, а також змінених органел (перш за все мітохондрій) з надлишковою продукцією АФК. Такі перебудови провокують активацію процесів старіння клітин чи їх загибелі [243].

У експериментальних дослідженнях виявлено, що втрачання FoxO1 спричинює зростання продукції АФК, що успішно ліквідовуються активацією аутофагії. В той же час, якщо *in vitro* ввести в клітини вектор з FoxO1, то відбувалося інгібування H₂O₂-індукованого апоптозу клітин, за рахунок активації ферментів антиоксидантної системи. Схожі результати також було одержано *in vivo*, на тваринній моделі – мишах, яким моделювали остеоартрит [322]. Встановлено, що при окисному стресі спостерігається транслокація FoxOs із цитоплазми клітини в ядро з використанням SIRT1 деацетилази, яка спричинює активацію FoxOs [166, 322].

Таким чином, була висловлена пропозиція, в якій зазначено, що FoxO1 бере участь у підтримці гомеостазу суглобових хондроцитів за рахунок модуляції процесів аутофагії, а гіперекспресія *FOXO1* у хондроцитах гальмує розвиток остеоартриту, що викликаний втратою TGF- β 1 сигнального каскаду. Отже, цей хондропротекторний вплив FoxO1 може бути застосований для розробки потенційної терапії остеоартриту людини. Поки залишається не вивченим питанням механізму, за рахунок якого TGF- β 1/FoxO1 бере участь у регуляції проліферації та підтримці гомеостазу суглобових хондроцитів.

У наших дослідженнях ми виявили, що рівні експресії генів *TGFB1* та *FOXO1* знижується більшою мірою у пацієнтів з остеоартритом, що перехворіли COVID-19, у порівнянні з групою осіб з діагнозом остеоартрит колінних суглобів, що може свідчити про порушення редокс-статусу клітин і можливу втрату TGF- β 1-FoxO1 сигналіну у пацієнтів з остеоартритом після вірусної інвазії. Такі зміни можуть відбуватися внаслідок посилення процесів загальносистемного запалення через реагування організму на SARS-CoV2-інфекцію.

Треба зазначити, що на тваринних моделях патології суглобів остеоартрит, за гіперекспресії *FOXO*, у хондроцитах було показано як зростання рівня експресії генів, які кодують компоненти позаклітинного матриксу, *Comp*, *Colla1* (ген, що кодує α 1-ланцюг колагену I типу) тощо; так і генів антиоксидантного захисту організму [178].

Остеоартрит виникає внаслідок дисбалансу між деградацією й синтезом хряща та призводить до того, що шар хряща стає тоншим. Фрагменти COMP вивільняються в суглобову рідину після травми та навіть на ранніх стадіях остеоартриту, і тому COMP вважається маркером деградації хряща [141, 148, 216].

Зростання рівня АФК може індукувати катаболічну сигналізацію, викликати окисний стрес, збільшити експресію як генів, залучених у формування запалення, так і таких, що кодують ММП, які, у свою чергу, впливають на матричні компоненти, включаючи колаген, агрекан, COMP [87, 216, 320].

Нами зазначено більш значне падіння рівня експресії гена *COMP* у рековалесцентних осіб з виявленим діагнозом остеоартрит та які одужали від COVID-19, порівняно з групою пацієнтів з встановленою патологією суглобів остеоартрит на фоні більшого рівня концентрації *COMP* у осіб з остеоартритом, які були інфіковані вірусом SARS-CoV2. Встановлені дані засвідчують наявність більш інтенсивних явищ деструктивних процесів в організмі після вірусної інфекції та подальшу прогресію хвороби.

Ці дані корелюють з результатами літературних наукових джерел відносно можливої дії хвороби COVID-19 на старіння суглобів та остеоартрит, які супроводжуються запальними процесами [174, 176]. Загалом, отримані нами результати збігаються з вищезазначеними даними літератури, де продемонстровано зв'язок системи TGF- β 1-FoxO1 як з активністю ферментів антиоксидантної ланки організму, так і зі станом позаклітинного матриксу хондроцитів у патогенезі ОА [178, 205, 322].

Отже, за допомогою молекулярно-біологічних підходів продемонстровано зниження у клітинах крові більшою мірою рівня експресії генів *TGFB1* та *FOXO1* у рековалесцентних осіб з діагнозом остеоартрит, які одужали від COVID-19, порівняно з групою пацієнтів, яким встановлено діагноз остеоартрит на фоні показаного в попередньому розділі порушення окисно-антиоксидантної рівноваги та розвитку окисного стресу (порушення редокс-статусу клітин і вирогідна втрата TGF- β 1-FoxO1 сигналіngu) у осіб з остеоартритом після SARS-CoV2-інфекції [166, 261].

Такі результати виникають внаслідок інтенсифікації системного запалення в організмі через відповідь на вірусне вторгнення. Водночас зафіксовано більш значне зниження рівня експресії гена *COMP* у рековалесцентних осіб з діагнозом остеоартрит, які одужали від COVID-19, порівняно з групою пацієнтів з остеоартритом на фоні інтенсивнішого зростання концентрації *COMP* у осіб з остеоартритом після вірусної інфекції SARS-CoV2. Отримана інформація наших експериментів служить доказом

більшої активації процесів деструкції в організмі рековалесцентних пацієнтів після вірусної інфекції, що провокує подальшу прогресію патології суглобів.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У 2019 році спалахнула масштабна світова епідемія, яка була спричинена новим коронавірусом SARS-CoV-2, що викликав розвиток коронавірусної хвороби COVID-19. Це вірусне захворювання було висококонтагіозним та супроводжувалось розвитком тяжких ускладнень у частини населення [98, 150, 239].

Наша країна теж зазнала руйнівного удару COVID-19 на здоров'я українців. Нульовий пацієнт був зафіксований з діагнозом даної хвороби у березні 2020 року в місті Чернівці. На жаль, з 13 березня в Україні стався перший летальний випадок, спричинений інфекцією SARS-CoV-2. В подальшому у нашій країні було заражено коронавірусом більше 5 мільйонів осіб, серед яких померло більше 100 тисяч людей [1].

Згідно встановлених даних, вірус SARS-CoV-2 може викликати не тільки характерні легеневі порушення дихальної системи, а може провокувати ураження інших систем органів та обтяжувати самопочуття осіб, що мають коморбідні патології [78, 356]. До таких верств населення, що мають хронічні захворювання опорно-рухового апарату, належать пацієнти з остеоартритами. При даній патології відбувається дегенеративне руйнування хряща у суглобі, що супроводжується запальними процесами. Такі пацієнти складають групу ризику при зараженні інфекцією SARS-CoV-2, оскільки додаткове вірусне навантаження на організм може стати тригером для ускладнення перебігу остеоартриту. Так, проведений аналіз медико-біологічної літератури показав, що біля 15 % осіб з діагнозом COVID-19, мали в анамнезі ознаки ураження скелетно-м'язової системи: від артралгій до реактивного артрити [40, 54, 94, 212, 291]. На даний час дослідження взаємозв'язку між патологією суглобів та коронавірусною хворобою є обмеженими та епізодичними, що не дає можливості повністю зрозуміти потенційний вплив COVID-19 на кістково-м'язову систему. Отже, дійсно важливим питанням є вивчення перебігу такого

хронічного захворювання як остеоартрит у осіб, що зазнали інфікування вірусом SARS-CoV-2.

Наші дослідження базувались на вивченні ряду показників запалення та вільнорадикальних процесів у крові осіб як тих, хто мав діагноз остеоартрит, так і тих пацієнтів з остеоартритом, хто одужав після COVID-19. Треба зазначити, що нами була обрана кров в якості дослідницького об'єкту, оскільки це доступний зразок біологічного матеріалу, що дає змогу для моніторингу роботи внутрішніх органів і систем організму як в нормі, та і при патофізіологічних станах.

Першим блоком наших досліджень було вивчення ряду параметрів, що пов'язані з розвитком запальних процесів. Відомо, що при остеоартритах в організмі хворих розвивається запалення як в самому суглобі, так і системно на рівні цілого організму [186, 268]. Формування та прогресування патології суглобів при остеоартриті відбувається внаслідок тісно пов'язаних взаємодій між пошкодженням суглобів, імунною відповіддю на передбачуване пошкодження та подальшим формуванням хронічного запалення. Літературні джерела засвідчують, що інфекція викликана вірусом SARS-CoV-2 створює в організмі системне запалення, що супроводжується продукцією прозапальних цитокінів, які спричиняють структурно-функціональні розлади у хрящовій та кістковій тканинах опорно-рухового апарату [132, 302].

Проведене нами детальне вивчення показників запалення у пацієнтів з діагнозом остеоартрит колінних суглобів дозволило виявити у крові збільшення концентрації С-реактивного білка, молекул середньої молекулярної маси, ІЛ-1 β та рівня експресії генів *PTGS2*, *NOS2*, *NFKB1* на тлі зниження концентрації ІЛ-8, ІЛ-12 β , ФНП- α , ІФ- γ , ІЛ-4, ІЛ-10 відносно досліджуваних параметрів у контролі, який складали умовно здорові люди. Треба відмітити, що у крові осіб з остеоартритом, які зазнали дії вірусу SARS-CoV-2 та одужали після COVID-19, спостерігаються схожі змінювання досліджуваних біохімічних маркерів запалення порівняно з показниками контрольної групи. Певні відмінності у реагуванні організму рековалесцентних пацієнтів були нами виявлені під час

проведених досліджень: в крові більшою мірою зростала концентрація С-реактивного білка, молекул середньої молекулярної маси, ІЛ-1 β та збільшувалися рівні експресії генів *PTGS2*, *NOS2*, *NFKB1* і знижувався рівень ІЛ-12 β порівняно з групою осіб з остеоартритом [7]. В той же час треба зауважити, що у осіб з остеоартритом після одужання від коронавірусної хвороби концентрація таких цитокінів, як ФНП- α та ІЛ-10 зростала порівняно з групою осіб з остеоартритом, які не були інфіковані вірусом SARS-CoV-2.

Відомо, що ФНП- α належить до цитокінів, який продукується макрофагами та моноцитами (клітинами вродженого імунітету). Його надекспресія при COVID-19 відбувається у пацієнтів під час та після зараження вірусом SARS-CoV2 [85, 276]. Дослідниками показано чітку залежність між цитокіновим профілем крові та ступенем тяжкості COVID-19, що може використовуватися в якості диференційованого прогнозу смертності пацієнтів відповідно до модальностей кисневої підтримки [85]. Ці дані є свідченням формування в організмі осіб з остеоартритом після COVID-19 домінуючої прозапальної відповіді, яка супроводжується підвищеним рівнем ФНП- α , ІЛ-10 та інших показників активності запального процесу.

Таким чином, результати наших досліджень показників запалення свідчать про те, що у пацієнтів з остеоартритом протягом тривалого постковідного періоду розвивається більш інтенсивне запалення та спостерігається дисбаланс про- та протизапальних цитокінів у плазмі крові – підвищення рівня ІЛ-1 β проти зниження рівня ІЛ-4, ІЛ-8, ІЛ-10, ІЛ-12 β , ФНП- α та ІФ- γ . Порівняно зі здоровими особами контролю, різні рівні цитокінів свідчать про наявність різних імунорегуляторних механізмів, залучених у патогенез як остеоартриту, так і хвороби COVID-19. Виявлені зміни в досліджуваних параметрах можуть відображати характер клінічного перебігу остеоартриту на тлі інфекції SARS-CoV-2 і свідчать про важливість цитокінової регуляції запалення в патогенезі захворювань опорно-рухового апарату та системних розладів, викликаних вірусною інфекцією.

Отже, профілювання цитокінів у таких хворих може бути використано для оцінки стану як тяжкості перебігу хвороби, так і розробки персоналізованого лікування пацієнтів з діагнозом остеоартрит після ураження вірусом SARS-CoV2.

Наступний етап наших досліджень був присвячений визначенню ролі вільнорадикальних процесів у патологічних змінах в організмі при остеоартриті та після одужання від COVID-19. Відомим фактом є те, що вільні радикали можуть виконувати в організмі подвійну роль. З одного боку, вони утворюються в нормі як побічні продукти при фізіологічних процесах в клітині та приймають участь у підтримці метаболізму клітин. Наприклад, як вторинні месенджери при передачі клітинних сигналів або як молекули, що виробляються захисними клітинами нашого організму для знешкодження різних інфекційних агентів [25, 146, 179]. Але з іншого боку, неконтрольоване та надмірне утворення АФК буде спричинювати руйнівну дію на біологічні молекули. Ряд дослідників показали, що надмірна продукція молекул АФК активно зростає при запальних та дегенеративних процесах, що може зумовлювати формування больових відчуттів, викликати ендотеліальну дисфункцію та пошкодження клітин та тканин, у тому числі й за остеоартриту [39, 149, 344].

Оскільки порушення окисно-антиоксидантного балансу відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні патології суглобів [22, 191], ми дослідили ряд показників, що характеризують інтенсивність вільнорадикальних процесів та роботу ферментів антиоксидантного захисту у крові пацієнтів експериментальних груп.

Досліджуючи окисно-антиоксидантну рівновагу в крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит нами зафіксовано зростання продукції АФК (супероксидного радикалу та пероксиду водню), збільшення утворення окиснених продуктів ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ) та білків (нейтральних альдегідних та кетонних продуктів і основних альдегідних та кетонних продуктів) та рівня експресії гену *OLR1*, при

цьому відбувається зниження концентрація небілкових, білкових та загальних сульфгідрильних груп, рівня експресії гену *LRPI* та падіння супероксиддисмутази та каталази активності порівняно з групою контролю умовно здорових осіб [4, 5, 6]. Треба наголосити, що у крові осіб з остеоартритом після COVID-19, досліджувані параметри вільнорадикальних процесів були зрушені у прооксидантний бік більшою мірою порівняно з групою осіб з остеоартритом. Такі зміни засвідчують більш глибокі та серйозні порушення окисно-антиоксидантної рівноваги, що буде створювати умови для формування окисного стресу в організмі осіб з остеоартритом, що зазнали дії вірусу SARS-CoV2. Треба зазначити, що окисний стрес через надмірну продукцію вільних радикалів буде провокувати ураження біологічних молекул різних тканин, у тому числі, включаючи руйнацію хряща, а також буде залучатися у запальні трансформації в суглобі [191]. Наприклад, органічні перекиси, що будуть утворюватись внаслідок дії АФК на молекули ліпідів, будуть збільшувати набряки та продукцію простагландинів, що сприятиме подальшому посиленню запалення [71]. В той же час, виявлене нами до цього в крові надмірне утворення медіаторів запалення, зокрема цитокінів (ІЛ-1 β , ФНП- α) буде індукувати виробництво АФК та продукцію матриксних металопротеїназ. Це буде призводити до деградації хрящової тканини та руйнуванню структури суглобів та їх функціональності. Важливо зазначити, що вільнорадикальні та запальні процеси є взаємозалежними і кожен з них є мішенню для іншого.

На заключному етапі наших досліджень була проведена оцінка маркерів метаболізму хрящової тканини у крові пацієнтів з діагнозом остеоартрит та після одужання від COVID-19. Встановлено, що у крові пацієнтів з остеоартритом зростають рівні ММП-2, ММП-3, ММП-9, концентрація білка COMP та знижується рівні ММП-8, ММП-10, ТІМП-1, рівні експресії генів *TGFB*, *FOXO1*, *COMP* порівняно з контролем [142, 351]. В той же час, у крові осіб з остеоартритом після одужання від COVID-19, зростає рівень ММП-2,

ММП-8, концентрація COMP та знижуються рівень ММП-9, рівні експресії генів *TGFBI*, *COMP*, *FOXO1* порівняно з групою осіб з діагнозом остеоартрит.

Отже, найбільш суттєві зміни в системі протеолізу-антипротеолізу після коронавірусної інфекції відбулися на рівні ММП-2, ММП-8 і ММП-9, що може бути наслідком системних порушень, спричинених вірусом SARS-CoV-2, пов'язаних із надмірним виділенням медіаторів запалення та дисбалансом ангіотензин-перетворюючого ферменту 2. Встановлено значне зниження ММП-10 та ТІМП-1 у пацієнтів з остеоартритом та реконвалесцентами COVID-19 у порівнянні з контрольною групою умовно здорових осіб. Виявлене зменшення у клітинах крові рівня експресії генів *TGFBI* та *FOXO1* у реконвалесцентних осіб з діагнозом остеоартрит, відбувається внаслідок порушення редокс-гомеостазу клітин (зсув у прооксидантний бік) та можливої втрати TGF- β 1-FoxO1 сигналіngu у осіб з остеоартритом, що перенесли інфікування SARS-CoV2 [166, 261]. Наслідком цих змін у реконвалесцентних пацієнтів є руйнування екстрацелюлярного матриксу хрящової тканини суглобу, про свідчить встановлене нами збільшення у крові маркера деградації хряща при остеоартриті – концентрації білка олігомерної матриці хряща COMP [73, 309], який зв'язує колагенові волокна типу I і II та каталізує збірку фібрилярного колагену [203].

Таким чином, отримані в ході виконання дисертаційної роботи результати свідчать про те, що COVID-19 може спричинити ускладнення наявних патологій опорно-рухового апарату, зокрема при остеоартриті. Виявлене нами підсилення запальних та вільнорадикальних реакцій в організмі пацієнтів з остеоартритом, що перенесли COVID-19, сприятиме більшому руйнуванню хрящової тканини, що в подальшому буде проявлятися клінічними симптомами даної патології суглобів. Таким пацієнтам необхідно ретельне спостереження за розвитком остеоартриту та потрібні персоналізовані тактики для проведення лікування як COVID-19, так і подальшої корекції симптомів остеоартриту після перенесеної коронавірусної інфекції. Виявлені нами відмінності у перебігу остеоартриту у реконвалесцентних осіб після COVID-19

можна використати як прогностичні біомаркери, які можуть стати об'єктом оцінки як розвитку самого патофізіологічного процесу, так і ефективності його специфічної терапії.

ВИСНОВКИ

1. У дисертаційній роботі показано, що у рековалентних пацієнтів з остеоартритом колінних суглобів, які перехворіли на COVID-19, у крові інтенсифікуються запальні та вільнорадикальні процеси, що спричинює більші дегенеративні процеси суглобового хряща порівняно з особами з остеоартритом, які не підлягали дії SARS-CoV2. У таких пацієнтів виявлено в крові збільшення концентрацій С-реактивного білка, молекул середньої молекулярної маси, прозапальних цитокінів, активних форм кисню, продуктів окиснення ліпідів і білків, матриксних металопротеїназ, хрящового олігомерного матриксного білка на фоні зниження концентрації сульфгідрильних груп та активностей антиоксидантних ферментів. Всі встановлені зміни супроводжувались зміною рівнів експресії генів, залучених у формування запалення, окисного стресу та дегенерації хряща. Отже, у пацієнтів після SARS-CoV2-інфекції вірогідний розвиток більш важкого перебігу остеоартриту.

2. Встановлено, що у крові пацієнтів з остеоартритом зростають концентрації С-реактивного білка – в 2 рази, молекул середньої молекулярної маси – в 1,3 рази, ІЛ-1 β – в 1,2 рази, збільшуються рівні експресії генів *PTGS2* – в 2,3 рази, *NOS2* – в 2,5 рази, *NFKB1* – в 1,8 рази та знижується вміст ІЛ-8 – в 1,6 рази, ІЛ-12 β – в 1,2 рази, ФНП- α – в 1,3 рази, ІФ- γ – в 1,4 рази, ІЛ-4 та ІЛ-10 – в 1,5 рази порівняно з контролем. Показано, що у крові осіб з остеоартритом після COVID-19, зростають концентрації С-реактивного білка – в 1,7 рази, молекул середньої молекулярної маси – в 1,2 рази, ІЛ-1 β , ФНП- α та ІЛ-10 – в 1,2 рази, рівні експресії генів *PTGS2* й *NOS2* – в 1,3 рази, *NFKB1* – в 1,2 рази, та знижується рівень ІЛ-12 β – в 1,2 рази порівняно з групою осіб з остеоартритом.

3. Виявлено, що у крові пацієнтів з остеоартритом зростають концентрації супероксидного радикалу – в 1,7 рази, пероксиду водню – в 1,5 рази, дієнових кон'югатів – в 1,9 рази, ТБК-активних сполук – в 2,1 рази,

шиффових основ – в 2,4 раза, а також рівень експресії гену *OLRI* – в 1,9 раза, тоді як рівень експресії гену *LRPI* знижується в 1,7 раза порівняно з контролем. Визначено, що у крові осіб з остеоартритом після COVID-19 зростають концентрації супероксидного радикалу – в 1,4 раза, пероксиду водню – в 1,3 раза, дієнових кон'югатів – в 1,5 раза, ТБК-активних сполук – в 1,4 раза, шиффових основ – в 1,3 раза, а також рівень експресії гену *OLRI* – в 1,3 раза; при цьому рівень експресії гену *LRPI* знижується в 1,4 раза порівняно з групою осіб з остеоартритом.

4. Показано, що у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом зростають концентрації продуктів окисної модифікації білків: нейтральних альдегідних продуктів – у 2,4 раза, нейтральних кетонних продуктів – у 1,8 раза, основних альдегідних продуктів – у 2,1 раза та основних кетонних продуктів – у 1,6 раза порівняно з контролем. Встановлено, що у плазмі крові осіб з остеоартритом після COVID-19 зростають концентрації нейтральних альдегідних і основних кетонних продуктів – у 1,3 раза, нейтральних кетонних продуктів – у 1,4 раза та основних альдегідних продуктів – у 1,5 раза порівняно з групою осіб з остеоартритом.

5. Виявлено, що у плазмі крові пацієнтів з остеоартритом знижуються супероксиддисмугазна та каталазна активності – в 1,4 та 1,6 раза, відповідно, а також зменшуються концентрації небілкових SH-груп – в 1,4 раза, та білкових і загальних SH-груп – в 1,5 раза порівняно з контролем. Визначено, що у плазмі крові осіб з остеоартритом після COVID-19 зменшується супероксиддисмугазна активність – у 1,3 раза, каталазна активність – у 1,4 раза, а також концентрації небілкових, білкових та загальних SH-груп – у 1,3 раза порівняно з групою осіб з остеоартритом.

6. Встановлено, що у крові пацієнтів з остеоартритом зростає вміст ММП-2 – в 1,3 раза, ММП-3 та ММП-9 – в 1,4 раза, збільшуються рівні експресії генів *TGFB1* – в 2,1 раза, *FOXO1* – в 2,5 раза, *COMP* – в 2,4 раза і концентрація білка *COMP* – в 2,8 раза, та знижується вміст ММП-8 й ММП-10 – в 1,4 раза, а ТІМП-1 – в 1,3 раза порівняно з контролем. Показано, що у крові

осіб з остеоартритом після COVID-19 зростає вміст ММП-2 – в 1,2 раза, ММП-8 – в 1,6 раза, концентрація СОМР – в 1,2 раза, та знижується вміст ММП-9 – в 1,2 раза, рівні експресії генів *TGFB1* й *COMP* – в 1,4 раза, гена *FOXO1* – в 1,5 раза порівняно з групою осіб з остеоартритом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Коронавірус в Україні. [Електронний ресурс]. –<https://covid19.com.ua/>.
2. Короткий, О., Тугаров, Ю., Дворщенко, К. (2022). Інтенсивність вільнорадикальних процесів у плазмі крові хворих на остеоартрит. *Міжнародна науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», присвячена Всесвітньому дню науки, 60-63., 9–11 листопада 2022 року, Чернівці, Україна.*
3. Мінфін. [Електронний ресурс]. – <https://index.minfin.com.ua/ua/reference/coronavirus/ukraine/>.
4. Тугаров, Ю., Дворщенко, К. (2024). Окисна модифікація білків у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*, 97(2):22-27, doi:10.17721/1728.2748.2024.97.22-27.
5. Тугаров, Ю., Дворщенко, К. (2023). Показники системи антиоксидантного захисту у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія»*,. 93(2): 29-33, doi:10.17721/1728.2748.2023.93.29-33.
6. Тугаров, Ю., Юет, А., Дворщенко, К. (2023). Експресія генів LRP1 та OLR1 у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія»*, 2023, 3(94):35-40, doi:10.17721/1728.2748.2023.94.35-40.
7. Тугаров, Ю., Юет, А., Торгалло, Є., Дворщенко, К. (2022) Концентрація С-реактивного білка та вміст молекул середньої молекулярної маси у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія», Volume 1, Issue 88, 47-50, doi:10.17721/1728.2748.2022.88.47-50.*

8. Центр громадського здоров'я МОЗ України. [Електронний ресурс]. – <https://www.phc.org.ua/news/za-minuliy-tizhden-epidemichnogo-sezonu-20242025-zareestrovano-150-864-vipadki-grvi-ta-gripu>.

9. Able, A., Guest, D & Sutherland, M. (1998). Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica varnicotiana*. *Plant Physiology*. 117(2):491-499.

10. Abusarah, J., Bentz, M., Benabdoune, H., Rondon, P., Shi, Q., Fernandes, J., Fahmi, H., & Benderdour, M. (2017). An overview of the role of lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal in osteoarthritis. *Inflamm. Re.* 66(8) P.637-651. doi: 10.1007/s00011-017-1044-4.

11. Abdulsamed, K., Volkan, G., Ömer, F., Hacı, A., & Karapehlivan, M. (2021)/ Thiols: Role in Oxidative Stress-Related Disorders Submitted/Published: 20 March 2021 DOI: 10.5772/intechopen.96682 Publisher: <https://www.intechopen.com/online-first/thiols-role-in-oxidative-stress-related-disorders>.

12. Ackermann, M., Verleden, S., Kuehnel, M., Haverich, A., Welte, T., & Laenger, F. (2020). Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. Jul 9;383(2):120–128.

13. Accortt, N., Lesperance, T., Liu, M., Rebello, S., Trivedi, M., & Li, Y. Impact of sustained remission on the risk of serious infection in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 2018; 70: 679–684. doi: 10.1002/acr.23426.

14. Ahmad, N., Ansari, M., Y., Haqqi, T., (2020). Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *J Cell Physiol.*, 235(10):6366-6376. doi: 10.1002/jcp.29607.

15. Akagi, M., Kanata, S., Mori, S., Itabe, H., Sawamura, T., & Hamanishi, C. (2007). Possible involvement of the oxidized low-density lipoprotein/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 system in pathogenesis and progression of human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 15:281-90.

16. Akhmedov, A., Crucet, M., Simic, B., Kraler, S., Bonetti, N., R., Ospelt, C, Distler, O., & all. (2022). TNF α induces endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis via LOX-1 and arginase 2: reversal by monoclonal TNF α antibodies. *Cardiovasc Res.*, 7;118(1):254-266. doi: 10.1093/cvr/cvab005.
17. Albini, A., Di, G., Noonan, D., & Lombardo, M. (2020). The SARS-CoV-2 receptor, ACE-2, is expressed on many different cell types: implications for ACE-inhibitor- and angiotensin II receptor blocker-based cardiovascular therapies. *Intern Emerg Med.*, 15:759–766. doi: 10.1007/s11739-020-02364-6.
18. Alhassan, E., Siaton, B., Hochberg, M. (2022). Did COVID-19 impact osteoarthritis - clinical perspective? *Curr Opin Rheumatol.* Jan 1;34(1):68-72. doi: 10.1097/BOR.0000000000000851.
19. Aliyu, A. (2021). Public health ethics and the COVID-19 pandemic. *Ann Afr Med.* Jul-Sep;20(3):157-163. doi: 10.4103/aam.aam_80_20.
20. Andreica, I., Kiefer, D., Rezniczek, G. (2020). Comment on «Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 global rheumatology alliance physician-reported registry» by Gianfrancesco M et al. *Ann Rheum Dis.* doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218609. Published online July 30.
21. Ansari, M., Ahmad, N., Haqqi, T. (2020). Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother.* Sep;129:110452. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110452.
22. Aries, P., Iking-Konert, C. (2020). No increased rate of SARS-CoV-2 infection for patients with inflammatory rheumatic diseases compared with the general population in the city of Hamburg (Germany) *Ann Rheum Dis.* doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218400. Published online August 7.
23. Arevalo-Rodriguez, I., Buitrago-Garcia, D., Simancas-Racines, D., Zambrano-Achig, P., Del Campo, R., Ciapponi, A., Sued, O., Martinez-García, L., Rutjes, A., Low, N., Bossuyt, P., Perez-Molina, J., Zamora, J. (2020). False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS One.* Dec 10;15(12):e0242958. doi: 10.1371/journal.pone.0242958

24. Atri, D., Siddiqi, H., Lang, J., Nauffal, V., Morrow, D., Bohula, E. (2020). COVID-19 for the cardiologist. *JACC: Basic Transl Sci.* May 5(5):518–536.
25. Averill-Bates, D. (2024). Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2024 Feb;1871(2):119573. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119573.
26. Au, K., Reed, G., & Curtis, J. (2011). High disease activity is associated with an increased risk of infection in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 70:785–791.
27. Banerjee, A., Kulcsar, K., Misra, V., Frieman, M., & Mossman, K. (2019). Bats and coronaviruses. *Viruses.* Pubmed. DOI: 10.3390/v11010041.
28. Bangalore, S., Sharma, A., Slotwiner, A., Yatskar, L., Harari, R., & Shah, B. (2020). ST-segment elevation in patients with Covid-19 — a case series. *N Engl J Med.* Jun 18;382(25):2478–2480.
29. Barton L.M., Duval E.J., Stroberg E., Ghosh S., & Mukhopadhyay S. COVID-19 autopsies, Oklahoma, USA. *Am J Clin Pathol.* 2020;153:725–733.
30. Bassiouni, W., Ali, M., & Schulz, R. (2021). Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J.* 2021, 288, 7162–7182, doi:10.1111/febs.15701.
31. Belani, P., Schefflein, J., Kihira, S., Rigney, B., Delman, B., & Mahmoudi, K. (2020). COVID-19 is an independent risk factor for acute ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol.* Jun 25 ;ajnr;ajnr.A6650v1.
32. Bernatsky, S., Paterson, M., Gunraj, N., Thorne, J., Pope, J. (2013). Serious infections in a population-based cohort of 86,039 seniors with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* ;65:353–361. doi: 10.1002/acr.21812.
33. Beydon, M., Chevalier, K., et al. (2021)/ Myositis as a manifestation of SARS-CoV-2. *Ann Rheum Dis.* 2021 Mar;80(3):e42. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-217573. Epub 2020 Apr 23.
34. Bhaskar S, Sinha A, Banach M, et al. Cytokine storm in COVID-19-immunopathological mechanisms, clinical considerations, and therapeutic

approaches: the REPROGRAM Consortium Position Paper. *Front Immunol* 2020; 11: 1648.

35. Birkeland, K., Zimmer, R., Kimchi, A., Kedan, I. (2020). Venous thromboembolism in hospitalized COVID-19 patients: a systematic review (Preprint) *Interact J Med Res* [Internet] Jul 22 2020 <http://preprints.jmir.org/preprint/22768/accepted>.

36. Brasier, A., Recinos, A., Eledrisi, M. (2002) Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *ATVB*. Aug , 22(8):1257–1266.

37. Bo, L., Marie-Louise H., Merete, S. (2021). Reactive arthritis after COVID-19 *BMJ Case Rep*. Mar 2;14(3):e241375. doi: 10.1136/bcr-2020-241375.

38. Bogdanos, D., Smyk, D., Invernizzi, P., Rigopoulou, E., Blank, M., Pouria, S. (2012). Infectome: a platform to trace infectious triggers of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2012;12:726–740. doi: 10.1016/j.autrev.2012.12.005.

39. Bolduc, J., Collins, J., Loeser, R. (2019). Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med*, 132, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.038>.

40. Borodin, S., Tuharov, Y., Ostapchenko, D., Kot, L., Korotkyi, O. (2022). View of the pathogenetic mechanisms of joint damage in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Visnyk of Taras Shevchenko national university of Kyiv, series «Biology»*, 2(89):5-8, doi.org/10.17721/1728_2748.

41. Bourmistrova, N., Solomon, T, Braude, P, Strawbridge, R, Carter, B. (2022). Long-term effects of COVID-19 on mental health: A systematic review. *J Affect Disord*. Feb 15;299:118-125. doi: 10.1016/j.jad.2021.11.031.

42. Bowles, L., Platton, S., Yartey, N., Dave, M., Lee, K., Hart, D. (2020). Lupus anticoagulant and abnormal coagulation tests in patients with covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383:288–290.

43. Buja, L., Wolf, D., Zhao, B., Akkanti, B., Do, M., Lelenwa, L., et al. (2020). Emerging Spectrum of Cardiopulmonary Pathology of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Report of Three Autopsies from Houston, Texas and

Review of Autopsy Findings from other United States Cities. *Cardiovasc Pathol* 2020.

44. Cabral-Pacheco, G.; Garza-Veloz, I.; Castruita-De la Rosa, C., et al. (2020). The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9739, doi:10.3390/ijms21249739.

45. Calvier, L., Boucher, P., Herz, J., Hansmann, G. (2019). LRP1 deficiency in vascular SMC leads to pulmonary arterial hypertension that is reversed by PPAR γ activation. *Circ Res.*, 124:1778–1785.

46. Calvier, L., Herz, J., Hansmann, G. (2022). Interplay of Low-Density Lipoprotein Receptors, LRP, and Lipoproteins in Pulmonary Hypertension. *JACC Basic Transl Sci.*, 7(2):164-180. doi: 10.1016/j.jacbts.2021.09.011. eCollection 2022 Feb.

47. Campbell, R., Schwertz, H., Hottz, E., Rowley, J., Manne, B., Washington, A. (2019). Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3. *Blood.* 133:2013–2026.

48. Garrido Ruiz, D., Sandoval-Perez, A., Rangarajan, A., Gunderson, E., Jacobson, M. (2022). Cysteine oxidation in proteins: structure, biophysics, and simulation. *Biochemistry*, 61(20), 2165-2176. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00349>.

49. Capece, D., Verzella, D., Flati, I., Arboretto, P., Cornice, J., Franzoso, G. (2022). NF-kappaB: blending metabolism, immunity, and inflammation. *Trends Immunol. Sep*;43(9):757-775. doi: 10.1016/j.it.2022.07.004.

50. Castro da Rocha, F., Melo, LDP., Berenbaum, F. (2021). Tackling osteoarthritis during COVID-19 pandemic. *Ann Rheum Dis.* Feb;80(2):151-153. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218372.

51. Cavalli, G., De Luca, G., Campochiaro, C. (2020). Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol.* 2:e325–e331.

52. Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, A., Schafers, J., Ho, A. (2021) SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Microbe*, 2, e13–e22. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30172-5.
53. Ciceri, F., Beretta, L., Scandroglio, A., Colombom S., Landoni, G., Ruggeri, A., Peccatori, J., D'Angelo, A., et al. (2020). Microvascular COVID-19 lung vessels obstructive thromboinflammatory syndrome (MicroCLOTS): an atypical acute respiratory distress syndrome working hypothesis. *Crit Care Resusc*; doi: 10.51893/2020.2.pov2.
54. Cipollaro, L., Giordano, L., Padulo, J., Oliva, F., Maffulli, N. (2020). Musculoskeletal symptoms in SARS-CoV-2 (COVID-19) patients. *J Orthop Surg Res* 2020;15:178.
55. Chan, J., Yuan, S., Kok, K., To, K. et al. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020;395(10223):514–523.
56. Chafekar, A., Fielding, B. (2018). MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*. Feb 24;10(2):93. doi: 10.3390/v10020093.
57. Chavez-Galan, L., Ruiz, A., Martinez-Espinosa, K., Aguilar-Duran, H., et al. (2022). Circulating Levels of PD-L1, TIM-3 and MMP-7 Are Promising Biomarkers to Differentiate COVID-19 Patients That Require Invasive Mechanical Ventilation. *Biomolecules* 2022, 12, 445, doi:10.3390/biom12030445.
58. Cheleschi, S., Tenti, S., Lorenzini, S et al. (2022). Synovial Fluid Regulates the Gene Expression of a Pattern of microRNA via the NF-κB Pathway: An In Vitro Study on Human Osteoarthritic Chondrocytes. *Int J Mol Sci* 23(15):8334. doi: 10.3390/ijms23158334.
59. Chen, T. (2024). Unveiling the significance of inducible nitric oxide synthase: Its impact on cancer progression and clinical implications. *Cancer Lett*. Jun 28;592:216931. doi: 10.1016/j.canlet.2024.216931.

60. Chen, T., Wang, H., Chang, C., Lee, S. (2024) Mitochondrial Glutathione in Cellular Redox Homeostasis and Disease Manifestation. *Int J Mol Sci.* Jan 21;25(2):1314. doi: 10.3390/ijms25021314.
61. Cheng, N., Meng H., Ma, L., et al. (2017) Role of autophagy in the progression of osteoarthritis: The autophagy inhibitor, 3-methyladenine, aggravates the severity of experimental osteoarthritis. *Int. J. Mol. Med.* 39:1224–1232. doi: 0.3892/ijmm.2017.2934.
62. Choi, M., Jo, J., Park, J. et al. (2019). NF- κ B signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction. *Cells* 8(7):734. doi: 10.3390/cells8070734.
63. Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry.* 162(1):156-159.
64. Chow, Y., Chin, K. (2020). The role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 8293921. doi: 110.1155/2020/8293921,
65. Colling, M., Kanthi, Y. (2020). COVID-19-associated coagulopathy: an exploration of mechanisms. *Vasc Med.* Jun 19 1358863X2093264.
66. Comber, L., Walsh, K., Jordan, K., O'Brien, K., et al. (2021). Alternative clinical specimens for the detection of SARS-CoV-2: a rapid review. *Rev. Med. Virol.* 31:2185.
67. Conigliaro, P., Triggianese, P., Martino, E., Fonti, G., Chimenti, M., Sunzini F. (2019). Challenges in the treatment of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 18:706–713. doi: 10.1016/j.autrev.2019.05.007
68. Connors, J., Levy, J. (2020). COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*; DOI: 10.1182/kr0b.2020006000.
69. Corongiu, F., Banni, S. (1994). Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods Enzymol.* 1994;233:303-10. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33033-6.
70. Cowling, B., Ali, S, Ng, T. (2020). Impact assessment of non-pharmaceutical interventions against coronavirus disease 2019 and influenza in Hong Kong: an observational study. *Lancet Public Health.* 2020;5:e279–e288.

71. Crofford, L., Wilder, R., Ristimaki, A., et al. (1994). Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 β , phorbol ester, and corticosteroids. *Journal of Clinical Investigation*. 93(3):1095–1101. doi: 10.1172/JCI117060.
72. Cui, J., Li, F., Shi, Z. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17(3):181–192.
73. Cui, J, Zhang, J. (2022). Cartilage Oligomeric Matrix Protein, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci.* Aug 17;23(16):9253. doi: 10.3390/ijms23169253.
74. Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R.A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. In; 2017; pp. 1–73.
75. da Silva-Neto, P., do Valle, V., et al. (2022). Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress. *Biomolecules*, 12, 604, doi:10.3390/biom12050604.
76. Davies, M. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J.* Apr 1;473(7):805-25. doi: 10.1042/BJ20151227.
77. Davis, H., McCorkell, L., Vogel, J., Topol, E. (2023). Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol*, 21(3), 133-146. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2>.
78. Davis H. (2023) Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol.* Mar;21(3):133-146. doi: 10.1038/s41579-022-00846-2. Epub 2023 Jan 13.
79. D`Avila-Mesquita, C., Couto, A., Campos, L., et al. (2021). MMP-2 and MMP-9 levels in plasma are altered and associated with mortality in COVID-19 patients. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 142, 112067, doi:10.1016/j.biopha.2021.112067.
80. Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan A., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., Apak, R. (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal.* Feb 5;209:114477. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114477.

81. Diao, B., Wang, C., Tan, Y., Chen, X., Liu, Y., Ning, L. (2020). Reduction and functional exhaustion of T Cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) *Front Immunol.* May 1;11:827.
82. Dietert, K., Mahesula, S., Hegde, S., Vershelde, J., Reed, P., Sprague, S., Kokovay, E., Sayre, N., L. (2023). Loss of LRP1 in Adult Neural Stem Cells Impairs Migration to Ischemic Lesions. *Stem Cells.*, 15;41(6):570-577. doi: 10.1093/stmcls/sxad034.
83. Dixit, N., Churchill, A., Nsair, A., Hsu, J. (2021). Post-Acute COVID-19 Syndrome and the cardiovascular system: What is known? *Am. Hear. J. Plus Cardiol. Res. Pract.* 25, 100025, doi:10.1016/j.ahjo.2021.100025.
84. Doran, M., Crowson, C., Pond, G., O'Fallon, W., Gabriel, S. (2002). Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: a population-based study. *Arthritis Rheum.* 46:2287–2293. doi: 10.1002/art.10524.
85. Dorgham, K., Quentric, P., Gökkaya, M., Marot, S., et al. (2021). Distinct cytokine profiles associated with COVID-19 severity and mortality. *J Allergy Clin Immunol.* Jun;147(6):2098-2107. doi: 10.1016/j.jaci.2021.03.047.
86. Dounia, D., Ikram, H., Ayyoub, K., Imane, E., et al. (2021). The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microb. Pathog. Apr;* 153: 104799. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104799.
87. Dranitsina, A., Dvorshchenko, K., Korotkyi, O., Vovk, A., Falalyeyeva, T., et al. (2019). Expression of Nos2 and Acan Genes in Rat Knee Articular Cartilage in Osteoarthritis. *Cytol. Genet.* 2019, 53, doi:10.3103/S0095452719060021.
88. Durak, I., Yurtarlan, Z., Canbolat, O., Akyol, O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*, 214(1), 103-4. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(93\)90307-p](https://doi.org/10.1016/0009-8981(93)90307-p).
89. Edwards, C., Galeazzi, M., Bellinva, S., Ringer, A., Dimitroulas, T., Kitas, G. (2019). Can we wean patients with inflammatory arthritis from biological therapies? *Autoimmun Rev.* 18:102399. doi: 10.1016/j.autrev.2019.102399.

90. eCollection 2021., Ono K., Kishimoto, M., Shimasaki, T., (2020). Reactive arthritis after COVID-19 infection. *RMD Open*. 2020 Aug;6(2):e001350. doi: 10.1136/rmdopen-2020-001350.
91. Ellman, G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/doi:10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6).
92. Emmi, G., Bettioli, A., Mattioli, I. (2020). SARS-CoV-2 infection among patients with systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 19(7):102575.
93. Faissner, A. (2023). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in the glial lineage modulates neuronal excitability. *Front Netw Physiol.*, 3:1190240. doi: 10.3389/fnetp.2023.1190240. eCollection 2023.
94. Farisogullari, B., Pinto, A., Machado, P. (2022). COVID-19-associated arthritis: an emerging new entity? *RMD Open*, 8(2), e002026. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-002026>.
95. Fathi, F., Sami, R., Mozafarpour, S., Hafezi, H., Motedayyen, H., Arefne-zhad, R., et al. (2020). Immune system changes during COVID-19 recovery play key role in determining disease severity. *Int J Immunopathol Pharmacol* ;34:2058738420966497.
96. Favalli, E., Monti, S., Ingegnoli, F., Balduzzi, S., Caporali, R., Montecucco, C. (2020). Incidence of COVID-19 in patients with rheumatic diseases treated with targeted immunosuppressive drugs: what can we learn from observational data? *Arthritis Rheumatol*. doi: 10.1002/art.41388. Published online June 7.
97. Favalli, E., Raimondo, M., Becciolini, A., Crotti, C., Biggioggero, M., Caporali, R. (2017). The management of first-line biologic therapy failures in rheumatoid arthritis: current practice and future perspectives. *Autoimmun Rev*. 16:1185–1195. doi: 10.1016/j.autrev.2017.10.002.
98. Fernández-de-Las-Peñas, C., Notarte, K., Peligro, P., Velasco, J., Ocampo, M., Henry, B., Arendt-Nielsen, L., Torres-Macho, J., Plaza-Manzano, G. (2022). Long-COVID symptoms in individuals infected with different SARS-CoV-2

variants of concern: A systematic review of the literature. *Viruses*, 14(12), 2629. <https://doi.org/10.3390/v14122629>,

99. Fernandez-Patron, C., Hardy, E. (2022). Matrix Metalloproteinases in Health and Disease in the Times of COVID-19. *Biomolecules* 2022, 12, 692, doi:10.3390/biom12050692.

100. Ferrer, M., Busquets-Cortés, C., Capó, X., Tejada, S., Tur, J., A., Pons, A., Sureda, A. (2019). Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. *Curr Med Chem.*, 26(18):3225-3241. doi: 10.2174/0929867325666180514112124.

101. Flood, R., Conway, R., Kirby, C., Gheeta, D., Kane, D., Mullan R. (2020) Correspondence to: «Characteristics associated with hospitalisation for COVID-19 in people with rheumatic disease: data from the COVID-19 Global Rheumatology Alliance physician-reported registry» by Gianfrancesco et al. *Ann Rheum Dis*. doi: 10.1136/annrheumdis-2020-218733. Published online August 19.

102. Fox, S., Akmatbekov, A., Harbert, J., Li, G., Brown, J. (2020). Pulmonary and cardiac pathology in Covid-19: the first autopsy series from New Orleans. *medRxiv*. (04.6.20050575) In press.

103. Franklin J., Lunt M., Bunn D., Symmons D., Silman A. (2007). Risk and predictors of infection leading to hospitalisation in a large primary-care-derived cohort of patients with inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66:308–312. doi: 10.1136/ard.2006.057265.

104. Fu L, Baranova A, Cao H, Zhang F. (2023). Causal influences of osteoarthritis on COVID-19: a Mendelian randomization study. *Front Med (Lausanne)*. Oct 31;10:1287043. doi: 10.3389/fmed.2023.1287043.

105. Hägglund P, López-Alarcón C, Davies M. (2021). Oxidative Crosslinking of Peptides and Proteins: Mechanisms of Formation, Detection, Characterization and Quantification. *Molecules*. Dec 21;27(1):15. doi: 10.3390/molecules27010015.

106. Galloway J., Hyrich K., Mercer K., Dixon W., Fu B., Ustianowski A.P. (2010). Anti-TNF therapy is associated with an increased risk of serious infections in

patients with rheumatoid arthritis especially in the first 6 months of treatment: updated results from the British Society for Rheumatology biologics register with special emphasis on risks in the elderly. *Rheumatology* (Oxford); 2011;50(1):124-31. doi: 10.1093/rheumatology/keq242.

107. Gandhi, M., Yokoe, D., Havlir, D. (2020). Asymptomatic transmission, the Achilles' heel of current strategies to control Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, 328, 2158–2160. DOI 10.1056/NEJMe2009758.

108. García-Manrique, M., Calvet, J., Orellana, C., Berenguer-Llargo A., García-Cirera, S, Llop, M., et al. (2021). Synovial fluid but not plasma interleukin-8 is associated with clinical severity and inflammatory markers in knee osteo- arthritis women with joint effusion. *Sci Rep* 2021;11:5258.

109. Gasparotto, M., Framba, V., Piovella, C., Doria, A., Iaccarino, L (2021). Post-COVID-19 arthritis: a case report and literature review. *Clin. Rheumatol.* Aug;40(8):3357-3362. doi: 10.1007/s10067-020-05550-1.

110. Gates B. (2020) Responding to Covid-19 - A Once-in-a-Century Pandemic? *N. Engl. J. Med.* 382, 1677–1679.

111. Gattinoni, L., Coppola, S., Cressoni, M., Busana, M., Chiumello, D. (2020). Covid-19 Does Not Lead to a «Typical» Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.*

112. Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I, Leroy, P., and Parent M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel)*, 7(5), 62. <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>.

113. Goth, L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range *Clin Chim Acta*, 196(2-3), 143-51. 1991. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-m](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-m).

114. Gralinski, L., Menachery, V. (2020) Return of the coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 12(2):135.

115. Greening D, Simpson R. (2017) Characterization of the Low-Molecular-Weight Human Plasma Peptidome. *Methods Mol Biol.* 1619:63-79. doi: 10.1007/978-1-4939-7057-5_6.

116. Guan, Y., Zheng, B., He, Y., Liu, X., Zhuang, Z., Cheung, C., Luo, S., Li, P., Zhang L., Guan Y. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*. 2003;302(5643):276–278.

117. Giamarellos-Bourboulis, E., Netea, M., Rovina, N., Akinosoglou, K., Antoniadou, A., Antonakos, N. (2020). Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*. Jun 27(6):992–1000. e3.

118. Giannis, D., Ziogas, I., Gianni P. (2020). Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *J Clin Virol* 127:104362.

119. Golzardi. M., Hromić-Jahjefendić. A., Šutković. J, Aydin. O., Ünal-Aydın. P., Bećirević T., Redwan E., Rubio-Casillas A., Uversky V. (2024). The Aftermath of COVID-19: Exploring the Long-Term Effects on Organ Systems. *Biomedicines*. Apr 20;12(4):913. doi: 10.3390/biomedicines12040913.

120. Gómez-Moreno, D., Adrover, J., Hidalgo, A. (2018). Neutrophils as effectors of vascular inflammation. *Eur J Clin Invest*. Nov 48:e12940.

121. Goodnough, L., Saito, H., Ratnoff, O. (1983.) Thrombosis or myocardial infarction in congenital clotting factor abnormalities and chronic thrombocytopenias: a report of 21 patients and a review of 50 previously reported cases. *Medicine (Baltimore)* 62:248–255.

122. Goshua, G., Pine, A., Meizlish, M., Chang, C., Zhang, H., Bahel, P. (2020). Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *The Lancet Haematol*. Jun S2352302620302167.

123. Ge, X., Li J., Yang X., Chmura A., Zhu G., Epstein J., Mazet J., Hu B., Zhang W., Peng C. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*.503(7477):535–538.

124. Guo, Q., Jin, Y., Chen X., Ye, X., Shen, X., Lin, M., Zeng, C., Zhou, T., Zhang, J. (2024). NF-kappaB in biology and targeted therapy: new insights and

translational implications. *Signal Transduct Target Ther.* Mar 4;9(1):53. doi: 10.1038/s41392-024-01757-9.

125. Hadi, J., Shukur, H., Rabeea, H. Radiography of osteoarthritis as an abnormal anatomical change in geriatrics. (2021). *Wiad Lek.* 74(12):3168-3171.

126. Hägglund, P., Mariotti, M., Davies, M. (2018). Identification and characterization of protein cross-links induced by oxidative reactions. *Expert Rev Proteomics.* 2018 Aug;15(8):665-681. doi: 10.1080/14789450.2018.1509710.

127. Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M., Lely, A., Navis, G., van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. PubMed. DOI: 10.1002/path.1570.

128. Han, Q., Zheng, B., Daines, L., Sheikh, A. (2022). Long-Term Sequelae of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis of One-Year Follow-Up Studies on Post-COVID Symptoms. *Pathogens* 11, 269, doi:10.3390/pathogens11020269.

129. Hanada, M., Takahashi, M., Furuhashi, H., Koyama, H., Matsuyama, Y. (2016). Elevated erythrocyte sedimentation rate and high-sensitivity C-reactive protein in osteoarthritis of the knee: relationship with clinical findings and radiographic severity. *Ann Clin Biochem,* 2016; 53(5): 548-553, 10.1177/0004563215610142.

130. Hanley B., Lucas S.B., Youd E., Swift B., Osborn M. Autopsy in suspected COVID-19 cases. *J Clin Pathol.* 2020;73:239–242.

131. Harzallah, I., Debliquis, A., Drénou, B. (2020). Lupus anticoagulant is frequent in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost.* doi: 10.1111/jth.14867.

132. Hasan, L., Deadwiler, B., Haratian, A., Bolia, I., Weber, A., Petrigliano F. (2021). Effects of COVID-19 on the Musculoskeletal System: clinician's Guide. *Orthop Res Rev,* 13:141–50.

133. Hashimoto, K., Oda, Y., Nakagawa, K., Ikeda, T., Ohtani, K., Akagi, M. (2018). LOX-1 deficient mice show resistance to zymosan-induced arthritis. *Eur J Histochem.,* 62(1):2847. doi: 10.4081/ejh.2018.2847.

134. Hawkins, C., Davies, M. (2019). Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem.* 2019 Dec 20;294(51):19683-19708. doi: 10.1074/jbc.REV119.006217. Epub Oct 31.

135. He, X., Li, W., Zhu, L., Zhang, J. (2018). Investigation for effects of iNOS on biological function of chondrocytes in rats with post-traumatic osteoarthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018 Nov;22(21):7140-7147. doi: 10.26355/eurrev_201811_16245.

136. He, Z., Wang, G., Wu, J., Tang, Z., Luo, M. (2021). The molecular mechanism of LRP1 in physiological vascular homeostasis and signal transduction pathways. *Biomed Pharmacother.*, 139:111667. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111667. Epub 2021 May 7.

137. Helms, J., Tacquard, C., Severac, F., Leonard-Lorant, I., Ohana, M., CRICS TRIGGERSEP Group (Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis) (2020). High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intens Care Med.* Jun 2020;46(6):1089–1098.

138. Herold, T., Jurinovic, V., Arnreich, C., Hellmuth, J.C., von Bergwelt-Baildon M., Klein, M. (2020) Level of IL-6 predicts respiratory failure in hospitalized symptomatic COVID-19 patients. *medRxiv.* (04.1.20047381) In press.

139. Huang, C., Wang, Y., Li X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497–506.

140. Huang, Y., Chen, Z, Wang, Y. (2020). Clinical characteristics of 17 patients with COVID-19 and systemic autoimmune diseases: a retrospective study. *Ann Rheum Dis.* 79:1163–1169.

141. Huet, A., Dvorshchenko, K., Korotkyi, O., et al (2019). Expression of Nos2 and Acan Genes in Rat Knee Articular Cartilage in Osteoarthritis. *Cytology and Genetics.* 53(6):481-488. doi: 10.3103/S0095452719060021.

142. Huet, A., Tugarov, Y., Dvorshchenko, K., Grebinyk, D., Savchuk, O., Korotkyi, O., Ostapchenko, L. (2023). TGFB1, FOXO1, and COMP genes expression in blood of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. *Cytol Genet.*57(2):128-133, doi:10.3103/S009545272302010X.

143. Hwang, I., Youm, Y., Cho, S., Choi, S., Bae, M., Park, S. (2018). Kim, H.-W. Synovial fluid levels of TWEAK and matrix metalloproteinase 1 in patients with osteoarthritis, and associations with disease severity. *J. Orthop. Surg.* 26, 230949901876011, doi:10.1177/2309499018760112.

144. Inciardi, R., Lupi, L., Zaccone, G., Italia, L., Raffo, M., Tomasoni, D., Cani, D., Cerini, M., Farina, D., et al. (2019). Cardiac Involvement in a Patient with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.*

145. Ishikawa, M., Ito, H., Furu, M., Hashimoto, M., Fujii, T., Okahata, A., Mimori, T., Matsuda, S. (2016). Plasma sLOX-1 is a potent biomarker of clinical remission and disease activity in patients with seropositive RA. *Mod Rheumatol.*, 26(5):696-701. doi: 10.3109/14397595.2015.1128871.

146. Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., Janda, K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage *Pol. Merku.r Lekarsk.*, Apr 22;48(284):124-127.

147. Jarecki, J., Małecka-Masalska, T., Kosior-Jarecka, E., Widuchowski, W., Krasowski, P.; Gutbier, M.; Dobrzyński, M.; Blicharski, T. (2022). Concentration of Selected Metalloproteinases and Osteocalcin in the Serum and Synovial Fluid of Obese Women with Advanced Knee Osteoarthritis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19, 3530, doi:10.3390/ijerph19063530.

148. Jaabar, I., Cornette, P., Miche, A., et al (2022). Deciphering pathological remodelling of the human cartilage extracellular matrix in osteoarthritis at the supramolecular level. *Nanoscale.* 24. doi: 10.1039/D2NR00474G.

149. Jávör, P., Mácsai, A., Butt, E., Baráth, B., Jász, D. K., Horváth, T., Baráth, B., Csonka, Á., Török, L., Varga, E., Hartmann, P. (2022). Mitochondrial dysfunction affects the synovium of patients with rheumatoid arthritis and

osteoarthritis differently. *Int J Mol Sci*, 23(14), 7553. <https://doi.org/10.3390/ijms23147553>.

150. Jeong, Y., Wi, Y., Park, H., Lee, J., Kim, S., Lee, K. (2023). Current and emerging knowledge in COVID-19. *Radiology*, 306(2), e222462. <https://doi.org/10.1148/radiol.222462>.

151. Jiang, Z., Woollard, A. & Wolff, P. (1990). Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *Febs Letters*. 1990;268(1):69-71.

152. Jiménez-Muro, M., Soriano-Romaní, L., Mora, G., Ricciardelli, D., Nieto, J. (2023). The microbiota-metabolic syndrome axis as a promoter of metabolic osteoarthritis. *Life Sci*. Sep 15;329:121944. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121944.

153. Jin, X., Beguerie, J., Zhang, W., Blizzard, L., Otahal, P., Jones, G., et al. (2015). Circulating C reactive protein in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis*, 74(4):703e10, <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204494>.

154. Joo, Y., Lim, Y., Kim, K., Park, K., Park, Y. (2019). Respiratory viral infections and the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2019;21:199. doi: 10.1186/s13075-019-1977-9.

155. Joob, B., Wiwanitkit, V. (2020). Arthralgia as an initial presentation of COVID-19: observation. *Rheumatol. Int*. 40: 823.

156. Jové, M., Mota-Martorell, N., Pradas, I., Martín-Gari, M., Ayala, V., Pamplona R. (2020). The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity. *Antioxidants* (Basel). Nov; 9(11): 1132. doi: 10.3390/antiox9111132.

157. Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwan, V., Hitesh, Kaur, G., Pathak, A. (2016). Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J. Cancer Res. Ther*. 2016, 12, 28, doi:10.4103/0973-1482.157337.

158. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 2005;115:3339–3347.

159. Kawaguchi, S., Okada, M., Ijiri, E., Koga, D., Watanabe, T., Hayashi, K., Kashiwagi, Y., Fujita, S., Hasebe, N. (2020). β_3 -Adrenergic receptor blockade

reduces mortality in endotoxin-induced heart failure by suppressing induced nitric oxide synthase and saving cardiac metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 1;318(2):H283-H294. doi: 10.1152/ajpheart.00108.2019.

160. Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., Höhn, A. (2021) Protein oxidation - formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biol*. Jun;42:101901. doi: 10.1016/j.redox.2021.101901. Epub 2021 Feb 18.

161. Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., Höhn, A. (2021). Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biol*. 2021 Jun;42:101901. doi: 10.1016/j.redox.2021.101901.

162. Kerkhof, H., Bierma-Zeinstra, S., Castano-Betancourt, M., de Maat, M., Hofman, A., Pols, H., et al. (2010). Serum C reactive protein levels and genetic variation in the CRP gene are not associated with the prevalence, incidence or progression of osteoarthritis independent of body mass index. *Ann Rheum Dis*, 69(11):1976e82, <https://doi.org/10.1136/ard.2009.125260>.

163. Kim, J., Lee, J., Yang, J., Lee, K., Effenberger, M., Szpirt, W., et al. (2021). Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Theranostics* 2021;11:316–29.

164. Kim, W., Min, S, Cho, M., Youn, J., Min, J., Lee, S., et al (2000). The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 119:175–81.

165. Klok, F., Kruij, M., Meer, N., et al. (2020). Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis. *Thromb Res* 2020:1–3.

166. Klotz, L., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., et al (2015). Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biol*. 6:51–72. doi: 10.1016/j.redox.2015.06.019.

167. Korotkyi, O., Dvorshchenko, K., Kot, L. (2020) Oxidative/antioxidant balance and matrix metalloproteinases level in the knee cartilage of rats under

experimental osteoarthritis and probiotic administration. *Ukr. Biochem. J.* 92, 126–136, doi:10.15407/ubj92.06.126.

168. Korotkyi, O., Vovk, A., Galenova, T., Vovk, T., Dvorschenko, K., Falalyeyeva, T., Ostapchenko, L. (2020). Cytokines profile in knee cartilage of rats during monoiodoacetate-induced osteoarthritis and administration of probiotic. *Biopolym. Cell*, 36, doi:10.7124/bc.000A1E.

169. Korotkyi, O., Huet, A., Dvorshchenko, K., Kobylak, N.; Falalyeyeva, T., Ostapchenko, L. (2021). Probiotic Composition and Chondroitin Sulfate Regulate TLR-2/4-Mediated NF- κ B Inflammatory Pathway and Cartilage Metabolism in Experimental Osteoarthritis. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, doi:10.1007/s12602-020-09735-7.

170. Koh, S., Chan, C., Teo, S., Singh, S., Merican, A., Ng, W., Abbas, A., Kamarul, T. (2020). Elevated plasma and synovial fluid interleukin-8 and interleukin-18 may be associated with the pathogenesis of knee osteoarthritis. *Knee*, 27, 26–35, doi:10.1016/j.knee.2019.10.028.

171. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan B. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* Aug 11(8):875–879.

172. Labarrere, C., Kassab, G. (2022). Glutathione: A Samsonian life-sustaining small molecule that protects against oxidative stress, ageing and damaging inflammation. *Front Nutr*, 9, 1007816. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1007816>.

173. Lai, C., Shih, T., Ko, W., Tang, H., Hsueh, P. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and corona virus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020;55.

174. Lai, Q., Spoleitini, G., Bianco, G., et al (2020). SARS-CoV2 and immunosuppression: A double-edged sword. *Transpl. Infect. Dis.* 22(6):e13404. doi:10.1111/tid.13404.

175. Lamprecht, B. (2020). Is there a post-COVID syndrome? *Pneumologie (Berl)* 2020;17:398–405.

176. Lauwers, M., Au, M., Yuan Сю, Wen C. (2022). COVID-19 in Joint Ageing and Osteoarthritis: Current Status and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 10;23(2):720. doi: 10.3390/ijms23020720.
177. Lax S., Skok K., Zechner, P., Kessler, H., Kaufmann, N., Koelblinger, C. (2020). Pulmonary arterial thrombosis in COVID-19 with fatal outcome: results from a prospective, single-center, clinicopathologic case series. *Ann Internal Med*. May 14 2020:M20–2566.
178. Lee, K., Choi, S., Matsuzaki, T., et al (2020). FOXO1 and FOXO3 transcription factors have unique functions in meniscus development and homeostasis during aging and osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 117(6):3135-3143. doi: 10.1073/pnas.1918673117
179. Lennicke, C., Cochemé, H. (2021) Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell*. Sep 16;81(18):3691-3707. doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.018
180. Lapenna, D. (2023). Glutathione and glutathione-dependent enzymes: From biochemistry to gerontology and successful aging. *Ageing Res Rev*. Dec;92:102066. doi: 10.1016/j.arr.2023.102066.
181. Lepetsos, P., Papavassiliou, K., Papavassiliou, A. (2019). Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Free Radic Biol Med*. 2019 Feb 20;132:90-100.
182. Li, F. (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol*. 2016;3:237–261.
183. Li, L., Li, J., Gao, M., Fan, H., Wang, Y., Xu, X, et al. (2021). Interleukin-8 as a Biomarker for Disease Prognosis of Coronavirus Disease-2019 Patients. *Front Immunol*, 11:602395.
184. Li, M., Li, L., Zhang, Y., Wang, X. (2020). Expression of the SARS-CoV2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty*; 9(1):45.
185. Li, Y., Li, H., Zhu, S., Xie, Y., Wang, B., et al. (2020). Prognostic Value of Right Ventricular Longitudinal Strain in Patients with COVID-19. *JACC Cardiovasc Imaging* 2020:3423.

186. Li, Z., Huang, Z., Bai, L. (2021). Cell Interplay in Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol.* 2021, Aug;3(9):720477. doi:10.3389/fcell.2021.720477.
187. Lio, D., Scola, L., Giarratana, R., Candore, G. (2021). SARS CoV2 infection _The longevity study perspectives. *Ageing Res Rev.* 2021, May;67:101299. doi: 10.1016/j.arr.2021.101299.
188. Listing, J., Gerhold, K., Zink, A. (2012). The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment. *Rheumatology (Oxford)* 52:53–61. doi: 10.1093/rheumatology/kes305.
189. Livak, K., Schmittgen, T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods* 25(4):402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
190. Liu, G., Liu, Q., Yan, B., Zhu, Z., Xu, Y. (2021). USP7 inhibition alleviates H₂O₂-induced injury in chondrocytes via inhibiting NOX4/NLRP3 pathway. *Front Pharmacol*, 11, 617270. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.617270>. eCollection 2020.
191. Liu, L., Luo, P., Yang, M., Wang, J., Hou, W., Xu, P. (2022). The role of oxidative stress in the development of knee osteoarthritis: A comprehensive research review. *Front Mol Biosci*, 9, 1001212. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1001212>.
192. Liu, S., Deng, Z., Chen, K., Jian, S., Zhou, F., Yang, Y., et al. (2022). Cartilage tissue engineering: from proinflammatory and anti-inflammatory cytokines to osteoarthritis treatments (Review). *Mol Med Rep* 25:99.
193. Liu, T., Luo, S., Libby, P., Shi, G.-P.(2020). Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. *Pharmacol Therapeut.* Sep;213.
194. Liu, Y., Yang, Y., Zhang, C., Huang, F., Wang, F., Yuan, J. (2020). Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci.* Mar 63(3):364–374.

195. Lodigiani, C., Iapichino, G., Carenzo, L., Cecconi, M., et al. (2020). Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy. *Thromb Res* 2020;191:9–14.
196. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193; 1:265–275.
197. Lu, C., Li, S., Liu, Y. (2020). Role of immunosuppressive therapy in rheumatic diseases concurrent with COVID-19. *Ann Rheum Dis.* 2020;79:737–739.
198. Lu, L., Zhang, H., Dauphars, D., He, Y. (2021). A Potential Role of Interleukin 10 in COVID-19 Pathogenesis. *Trends Immunol* 2021;42:3–5.
199. Luo, W., Yu, H., Gou, J., Li, X., Sun, Y., Li, J. (2020). Clinical Pathology of Critical Patient with Novel Coronavirus Pneumonia (COVID-19): First Case of the Whole Lung Biopsy. (Preprints, 2020020407);
200. Ma, A., Zhang, L., Ye, X., Chen, J., Yu, J., Zhuang, L., et al. (2021). High Levels of Circulating IL-8 and Soluble IL-2R Are Associated With Prolonged Ill-ness in Patients With Severe COVID-19. *Front Immunol*;12:626235.
201. Mahajan, A., Manchikanti, L. (2020). Value and Validity of Coronavirus Anti-body Testing. *Pain Physician* 2020;23(4S):S381–90.
202. Maltezou, H., Pavli, A., Tsakris, A. (2021). Post-COVID Syndrome: An Insight on Its Pathogenesis. *Vaccines (Basel)* 2021;9:497.
203. Maly, K., Andres Sastre, E., Farrell, E., Meurer, A., Zaucke, F. (2021) COMP and TSP-4: Functional Roles in Articular Cartilage and Relevance in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* Feb 24;22(5):2242. doi: 10.3390/ijms22052242.
204. Mathew, A., Ravindran, V. (2014). Infections and arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;28:935–959. doi: 10.1016/j.berh.2015.04.009.
205. Matsuzaki, T., Alvarez-Garcia, O., Mokuda, S., et al (2018). FoxO transcription factors modulate autophagy and proteoglycan 4 in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Sci. Transl. Med.* 10, ean0746. doi: 10.1126/scitranslmed.aan0746.
206. Magro, C., Mulvey, J., Berlin, D., Nuovo, G., Salvatore, S., Harp, J. (2020). Complement associated microvascular injury and thrombosis in the

pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases. *Transl Res.* 220:1–13.

207. McConnell, S., Kolopack, P., Davis, A. (2001). The Western Ontario and McMaster universities osteoarthritis index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis Care Res.* 45(5):453–61. doi: 10.1002/1529-0131(200110)45:5<453:aid-art365>3.0.co;2-w.

208. Mendoza, M., Garcia-Ruiz, I., Maiz, N., Rodo, C., Garcia-Manau, P., Serrano, B. (2020). Preeclampsia-like syndrome induced by severe COVID-19: a prospective observational study. *BJOG: Int J Obstet Gy.* Jun;1471-0528:16339.

209. Menter, T., Haslbaue, J., Nienhold, R., Savic, S., Hopfer, H., Deigendes, N., Frank, S., Turek, D., Willi, N., et al. (2020). Post-mortem examination of COVID19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings of lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology* :his.14134.

210. Menter, D., Kopetz, S., Hawk, E., Sood A., Loree, J., Gresele, P. (2017). Platelet «first responders» in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 36:199–213.

211. Merza, M., Hwaiz, R., Hamad, B., Mohammad, K., Hama, H., Karim, A. (2021). Analysis of cytokines in SARS-CoV-2 or COVID-19 patients in Erbil city, Kurdistan Region of Iraq. *PLoS One* 2021;16:e0250330.

212. Michelena, X., Borrell, H., López-Corbeto, M. (2020). Incidence of COVID-19 in a cohort of adult and paediatric patients with rheumatic diseases treated with targeted biologic and synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Semin Arthritis Rheum.* 50:564–570.

213. Middeldorp, S., Coppens, M., Haaps, T. et al. (2020). Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020:jth.14888.

214. Migliorini, F., Bell, A., Vaishya, R., Eschweiler, J., Hildebrand, F., Maffulli, N. (2023). Reactive arthritis following COVID-19 current evidence,

diagnosis, and management strategies. *J Orthop Surg Res*, 18(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s13018-023-03651-6>.

215. Milaras, C.; Lepetsos, P., Dafou, D., Potoupnis, M., Tsiridis, E. (2021). Association of Matrix Metalloproteinase (MMP) Gene Polymorphisms With Knee Osteoarthritis: A Review of the Literature. *Cureus*, doi:10.7759/cureus.18607.

216. Mishra, A., Awasthi, S., Raj, S., et al (2019). Identifying the role of ASPN and COMP genes in knee osteoarthritis development. *J Orthop Surg Res* 14(1):337. doi: 10.1186/s13018-019-1391-7.

217. Molitor, M., Rudi, W., Garlapati, V., Finger, S., Schüler R., Kossmann, S. (2020). Nox2+ myeloid cells drive vascular inflammation and endothelial dysfunction in heart failure after myocardial infarction via angiotensin II receptor type 1. *Cardiovasc Res*. Jan 31 cvaa042.

218. Molnar, V., Matišić, V., Kodvanj, I., et al. (2021). Cytokines and Chemokines Involved in Osteoarthritis Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 26;22(17):9208. doi: 10.3390/ijms22179208.

219. Moreau, C., & Issakidis-Bourguet, E. (2022). A simplified method to assay protein carbonylation by spectrophotometry. *Methods in Molecular Biology*, 2526, 135–141. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2469-2_10.

220. Moreno-Eutimio, M., López-Macías, C., Pastelin-Palacios, R. (2020). Bioinformatic analysis and identification of single-stranded RNA sequences recognized by TLR7/8 in the SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV genomes. *Microbes Infect*. 22: 226-229.

221. Morgan, E., Skubic, C., Lee C., Cokan, K., Rozman, D. (2020). Regulation of cytochrome P450 enzyme activity and expression by nitric oxide in the context of inflammatory disease. *Drug Metab Rev*. 2020 Nov;52(4):455-471. doi: 10.1080/03602532.2020.1817061.

222. Mourtzikou, A., Alepaki, M., Stamouli, M., Pouliakis, A., Skliris, A., Kara-kitsos, P. (2014). Evaluation of serum levels of IL-6, TNF- α , IL-10, IL-2 and IL-4 in patients with chronic hepatitis. *Immunologia* 33:41–50.

223. Mukarram, M., Ishaq, M., Sethar, S., Afsar, N., Riaz, A., Ishaq, K. (2021). COVID-19: An emerging culprit of inflammatory arthritis case. *Rep. Rheumatol.* 2021 Apr 26;6610340. doi: 10.1155/2021/6610340.
224. Munshaw, S., Redpath, A., N., Pike, B., T., Smart, N. (2023). Thymosin β 4 preserves vascular smooth muscle phenotype in atherosclerosis via regulation of low density lipoprotein related protein 1 (LRP1). *Int Immunopharmacol.*, 115:109702. doi: 10.1016/j.intimp.2023.109702. Epub 2023 Jan 20.
225. Muraoka, N., Nara, K., Fumiya, T., et al. (2019). Role of cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2-prostaglandin E receptor 4 signaling in cardiac reprogramming. *Nat Commun.* 2019 Feb 20;10(1):674, 164.
226. Naito, K., Takahashi, M., Kushida, K., Suzuki, M., Ohishi, T., Miura, M., Inoue, T., Nagano, A. (1999). Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: comparison with generalized osteoarthritis. *Rheumatology* 38, 510–515, doi:10.1093/rheumatology/38.6.510.
227. Nakagawa, T., Akagi, M., Hoshikawa, H., Chen, M., Yasuda, T., Mukai, S. (2002). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates leukocyte infiltration and articular cartilage destruction in rat zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 46: 2486-94.
228. Nakagawa, T., Yasuda, T., Hoshikawa, H., Shimizu, M., Kakinuma, T., Chen, M. (2002). LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death-possible role of dephosphorylation of Akt. *Biochem Biophys Res Commun*, 299:91-7.
229. Nees, T., Rosshirt, N., Reiner, T., Schiltenswolf, M., Moradi, B. (2019). Die Rolle der Inflammation bei Arthroseschmerzen. *Der Schmerz* 2019, 33, 4–12, doi:10.1007/s00482-018-0346-y.
230. Nicola, R. (2018). Sproston and Jason J. Ashworth* Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol.* 2018; 9: 754. doi: 10.3389/fimmu.2018.00754.

231. Nogrady, B. (2020). What the data say about asymptomatic COVID infections. *Nature* 2020, 587, 534–535. doi: 10.1038/d41586-020-03141-3.

232. Oliveira, FRMB, Assreuy, J., Sordi, R. (2022). The role of nitric oxide in sepsis-associated kidney injury. *Biosci Rep.* Jul 29;42(7):BSR20220093. doi: 10.1042/BSR20220093.

233. Ono, K., Kishimoto, M., Shimasaki, et al. (2020). Reactive arthritis after COVID-19 infection. *RMD Open.*, 6(2):e001350. doi: 10.1136/rmdopen-2020-001350.

234. Ostojic, M., Zevrnja, A., Vukojevic, K., Soljic, V. (2021). Immunofluorescence Analysis of NF-kB and iNOS Expression in Different Cell Populations during Early and Advanced Knee Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.*, 16;22(12):6461. doi: 10.3390/ijms22126461.

235. Ostalowska, A., Birkner, E., Wiecha, M., Kasperczyk, S., Kasperczyk, A., Kapolka, D., Zon-Giebel, A. (2006). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage.*Feb;14(2):139-45. doi: 10.1016/j.joca.2005.08.009.

236. Oxley, T., Mocco, J., Majidi, S., et al. (2020). Large-Vessel Stroke as a Presenting Feature of Covid-19 in the Young. *N Engl J Med*:e60.

237. Prasad, S., Kulshreshtha, A., Lall, R., Gupta, S. (2021). Inflammation and ROS in arthritis: management by Ayurvedic medicinal plants. *Food Funct.* Sep 20;12(18):8227-8247. doi: 10.1039/d1fo01078f.

238. Pratt, J., Haidara, K., Annabi, B. (2022). MT1-MMP Expression Levels and Catalytic Functions Dictate LDL Receptor-Related Protein-1 Ligand Internalization Capacity in U87 Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci.*, 23(22):14214. doi: 10.3390/ijms232214214.

239. Parisi, S., Borrelli, R., Bianchi, S., Fusaro, E. (2020). Viral arthritis and COVID-19 *Lancet. Rheumatol.* 2020 Nov;2(11):e655-e657. doi: 10.1016/S2665-9913(20)30348-9. Epub Oct 5. DOI: 10.1016/S2665-9913(20)30348-9.

240. Peiris, J., Yuen, K., Osterhaus A., Stohr, K. (2003). The severe acute respiratory syndrome. *New Engl. J. Med.* 349:2431–2441.

241. Peluso, M., Deeks, S. (2024). Mechanisms of long COVID and the path toward therapeutics. *Cell*. Oct 3;187(20):5500-5529. doi: 10.1016/j.cell.2024.07.054.
242. Peng, A., Lu, X., Huang, J., He, M., Xu, J., Huang, H., Chen, Q. (2019). Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promote TREM-1 expression in monocytes via COX-2/PGE₂ pathway. *Arthritis Res Ther*. Jul 8;21(1):169. doi: 10.1186/s13075-019-1954-3.
243. Peng, Q., Qin, J., Zhang, Y., et al (2017). Autophagy maintains the stemness of ovarian cancer stem cells by FOXA2. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 36, 171. doi: 10.1186/s13046-017-0644-8.
244. Plsikova, Matejova, J.; Spakova, T., Harvanova, D., Lacko, M., Filip, V., Sepitka, R., Mitro, I., Rosocha, J. (2021). A Preliminary Study of Combined Detection of COMP, TIMP-1, and MMP-3 in Synovial Fluid: Potential Indicators of Osteoarthritis Progression. *Cartilage* 2021, 13, 1421S-1430S, doi:10.1177/1947603520946385.
245. Poissy, J., Goutay J., Caplan, M., Parmentier, E., et al. (2020). Pulmonary Embolism in COVID-19 Patients: Awareness of an Increased Prevalence. *Circulation*;epub ahead.
246. Polat, V., Bostanc, G. (2020). Sudden death due to acute pulmonary embolism in a young woman with COVID-19. *J Thromb Thrombolysis*:1.
247. Pollock, A., Lancaster, J. (2020). Asymptomatic transmission of covid-19. *BMJ Glob. Health* 371, m4851.
248. Pons, S., Arnaud, M., Loisele, M., Arrii, E., Azoulay, E., Zafrani, L. (2020). Immune consequences of endothelial cells' activation and dysfunction during sepsis. *Crit Care Clin*. Apr 2020;36(2):401–413.
249. Poyiadi, N., Cormier, P., Pate, I P., Hadied, M., Bhargava, P., Khanna, K. (2020). Acute pulmonary embolism and COVID-19. *Radiology*. May 14 2020;201955.
250. Price, E., MacPhie, E., Kay, L. (2020). Identifying rheumatic disease patients at high risk and requiring shielding during the COVID-19 pandemic. *Clin Med*. 2020 doi: 10.7861/clinmed.2020-0149. Published online May 5.

251. Puntmann, V., Carerj, M., Wieters, I., Fahim, M., Arendt, C., Hoffmann, J. (2020). Outcomes of cardiovascular magnetic resonance imaging in patients recently recovered from coronavirus disease 2019 (COVID-19) *JAMA Cardiol* Jul 27 2020 <https://jamanetwork.com/journals/jamacardiology/fullarticle/2768916>.

252. Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y. (2020). Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.*71(15):762–768.

253. Quartuccio, L., Valent, F., Pasut, E., Tascini, C, De Vita, S. (2020). Prevalence of COVID-19 among patients with chronic inflammatory rheumatic diseases treated with biologic agents or small molecules: a population-based study in the first two months of COVID-19 outbreak in Italy. *Joint Bone Spine.*87:439–443.

254. Rabaan, A., Al-Ahmed, S., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y., Dhama K., Yatoo, M., Bonilla-Aldana, D., Rodriguez-Morales, A. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med.* Ahead Of Print Jun 1;28(2):174-184.

255. Raghavan, S., Gonakoti, S., Asemota, I., Mba, B. (2020). A case of systemic lupus erythematosus flare triggered by severe coronavirus disease 2019. *J Clin Rheumatol.* 26(6):234–5. doi: 10.1097/RHU.0000000000001531.

256. Ramiro, S., Mostard, R., Magro-Checa, C. (2020). Historically controlled comparison of glucocorticoids with or without tocilizumab versus supportive care only in patients with COVID-19-associated cytokine storm syndrome: results of the CHIC study. *Ann Rheum Dis.* 2020;79:1143–1151.

257. Ranucci, M., Ballotta, A., Di Dedda, U., Bayshnikova, E., Dei Poli, M., Resta M. (2020). The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *J Thromb Haemost.*18:1747–1751.

258. Raveendran, A., Jayadevan, R., Sashidharan, S. (2021). Long COVID: An overview. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 15, 869–875, doi:10.1016/j.dsx.2021.04.007.

259. Riphagen, S., Gomez, X., Gonzalez-Martinez, C., Wilkinson, N., Theocharis, P. (2020). Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *The Lancet*. May 2020;395(10237):1607–1608.
260. Rizo-Téllez, S., Sekheri, M., Filep, J. (2023). C-reactive protein: a target for therapy to reduce inflammation. *Front Immunol*. 2023 Jul 26;14:1237729. doi: 10.3389/fimmu.2023.1237729.
261. Rodriguez-Colman, M., Dansen, T., Burgering, BMT. (2024). FOXO transcription factors as mediators of stress adaptation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024 Jan;25(1):46-64. doi: 10.1038/s41580-023-00649-0.
262. Rowley, D., Gutteridge, JMC., Blake, D., Farr, M., Halliwell, B. (1984). Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci* 66:691-5. doi: 10.1042/cs0660691.
263. Rui-Heng, X., Jian-Feng, H., Meiron, R., et al. (2004). Epidemiologic clues to SARS origin in China. 2004 Jun;10(6):1030-7. doi: 10.3201/eid1006.030852.
264. Sabir, J., Lam, T., Ahmed, M., Li, L., et al. (2016). Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science*. 351(6268):81–84.
265. Saito, K., Tatokoro, M., Fujii, Y., et al. (2009). Impact of C-reactive protein kinetics on survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 55 : 1145 – 53.
266. Sagar, D., Gaddipati, R., Ongstad, E., L., Bhagroo, N., An, L., L., Wang, J., Belkhodja, M., Rahman, S., Manna, Z., Davis, M., A., Hasni, S., Siegel, R., Sanjuan, M., Grimsby, J., Kolbeck, R., Karathanasis, S., Sims, G., P., Gupta, R. (2020). LOX-1: A potential driver of cardiovascular risk in SLE patients. *PLoS One.*, 17;15(3):e0229184. doi: 10.1371/journal.pone.0229184. eCollection 2020.
267. Salvarani, C., Bajocchi, G., Mancuso, P. (2020). Susceptibility and severity of COVID-19 in patients treated with bDMARDs and tsDMARDs: a population-based study. *Ann Rheum Dis*. 2020;79:986–988.

268. Sanchez-Lopez, E., Coras, R., Torres, A., Lane, N., Guma, M. (2022). Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nat Rev Rheumatol*. Feb; 14. doi: 10.1038/s41584-022-00749-9.

269. Santa Cruz, A., Mendes-Frias, A., Oliveira, A., Dias, L., Matos, A., Carvalho, A., et al. (2021). Interleukin-6 Is a Biomarker for the Development of Fatal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Pneumonia. *Front Immunol* 2021;12:613422.

270. Sara, I., Sara, F., et al. (2021). Post-COVID-19 arthritis: is it hyperinflammation or autoimmunity? *Eur Cytokine Netw*. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%22Eur+Cytokine+Netw%22%5Bjour%5D021+Dec+1;32\(4\):83-88](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%22Eur+Cytokine+Netw%22%5Bjour%5D021+Dec+1;32(4):83-88). doi: 10.1684/ecn.2021.0471.

271. Saricaoglu, E., Hasanoglu, I., & Guner, R. (2020). The first reactive arthritis case associated with COVID-19 *J. Med. Virol*. 2020 Jul 19, doi: 10.1002/jmv.26296.

272. Syed, F., Li, W., Relich, R.F., Russell, P.M., Zhang, S., Zimmerman, M.K., Yu, Q. (2021). Excessive Matrix Metalloproteinase-1 and Hyperactivation of Endothelial Cells Occurred in COVID-19 Patients and Were Associated With the Severity of COVID-19. *J. Infect. Dis*. 224, 60–69, doi:10.1093/infdis/jiab167.

273. Sharif, M., Shepstone, L., Elson, C., et al. (2000). Increased serum C reactive protein may reflect events that precede radiographic progression in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis*. 2000, Jan; 59(1):71-4. doi: 10.1136/ard.59.1.71.

274. Shahab, U., Ahmad, S., Moinuddin, D., Habib, S., Alam, K., Ali, A. (2012). Hydroxyl radical modification of collagen type II increases its arthritogenicity and immunogenicity. *PLoS One*. 7(2):e31199. doi: 10.1371/journal.pone.0031199.

275. Schett, G., Manger, B., Simon, D., Caporali, R. (2020). COVID-19 revisiting inflammatory pathways of arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 16(8), 465-470. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0451-z>.

276. Schultheiß, C., Willscher, E., Paschold, L., Gottschick, C., Klee, B., Henkes, S., et al. (2022). The IL-1 β , IL-6, and TNF cytokine triad is associated with post- acute sequelae of COVID-19. *Cell Rep Med* 2022;3:100663.
277. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A, Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117:11727–11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117.
278. Sharfstein, J., Becker, S., Mello, M. (2020). Diagnostic testing for the novel coronavirus. *JAMA*. 2020;323:1437–1438.
279. Shi, S., Qin, M., Shen, B., Cai, Y., Liu, T., Yang, F. (2020). Association of cardiac injury with mortality in hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol*. Jul 1 5(7):802.
280. Shi, S.; Su, M.; Shen, G.; Hu, Y.; Yi, F.; Zeng, Z.; Zhu, P.; Yang, G.; Zhou, H.; Li, Q.; et al. (2021). Matrix metalloproteinase 3 as a valuable marker for patients with COVID-19. *J. Med. Virol*. 2021, 93, 528–532, doi:10.1002/jmv.26235.
281. Shimasaki, H. (1994). Assay of fluorescent lipid peroxidation products // *Methods Enzymol*. 233:338-46. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33039-5.
282. Sidelnikova, V., Chernitskii, A., Retsky, M. (2015). Endogenous intoxication and inflammation: A sequence of reactions and markers' informativeness. *Agric. Biol.*, 50:152–161.
283. Sies, H., Jones, D. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 21:363–383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
284. Simopoulou, T., Malizos, K., Tsezou, A. (2007). Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human articular chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol*, 25:605-12.
285. Singh, J., Cameron, C., Noorbaloochi, S. (2015). Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2015;386:258–265.
286. Sisó-Almirall, A., Brito-Zerón, P., Conangla Ferrín, L., Kostov, B., Moragas Moreno, A., Mestres, J, et al. (2021). On Behalf Of The CAMFiC Long

Covid- Study Group. Long Covid-19: Proposed Primary Care Clinical Guidelines for Diagnosis and Disease Management. *Int J Environ Res Public Health* 18:4350.

287. Sizova, O., John, L., S., Ma, Q., Molldrem, J., J. (2023). Multi-faceted role of LRP1 in the immune system. *Front Immunol.*, 14:1166189. doi: 10.3389/fimmu.2023.1166189. eCollection 2023.

288. Smigiel, K.S.; Parks, W.C. (2017). Matrix Metalloproteinases and Leukocyte Activation. In; pp. 167–195.

289. So, H., Mak, J., So J. (2020). Incidence and clinical course of COVID-19 in patients with rheumatologic diseases: a population-based study. *Semin Arthritis Rheum.* 50:885–889.

290. Soheila, M., Seyed, M., Mohammad, S., Vahideh, T., Afsaneh, F., Faramarz, G., Raheleh, F., Tohid G. (2022). COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions *Viol. J* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=%22Viol+J%22%5Bjour%5D>. 2022 May 26;19(1):92. doi: 10.1186/s12985-022-01814-1.

291. Slouma, M., Abbes, M., Mehmlı, T., Dhahri, R., Metoui, L., Gharsallah, I., Louzir, B. (2023). Reactive arthritis occurring after COVID-19 infection: a narrative review. *Infection*, 51(1):37-45. <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01858-z>.

292. Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C. (2019). From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*. 2019;11(1):59.

293. Sproston. N., Ashworth, J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol.* Apr 13;9:754. doi: 10.3389/fimmu.2018.00754.

294. Su, H., Yang, M., Wan, C., Yi, L., Tang, F., Zhu, H. (2020). Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.* 2020;98:219–227.

295. Su, L., Zhang, J., Gomez, H., et al. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Oct 13;2019:5080843. doi: 10.1155/2019/5080843.

296. Su, W., Liu, G., Mohajer, B., Wang, J., Shen, A., Zhang, W., Liu, B., Guermazi, A., Gao, P., Cao, X., Demehri, S., Wan, M. (2022). Senescent preosteoclast secretome promotes metabolic syndrome associated osteoarthritis through cyclooxygenase 2. *Elife.*, 26;11:e79773. doi: 10.7554/eLife.79773.
297. Surveillances, V. (2020). The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) *China CDC Wkly.* 2020;2(8):113–122.
298. Taha, S., Samaan, S., Ibrahim, R., El-Sehsah E., Youssef M. (2021). Post-COVID-19 arthritis: is it hyperinflammation or autoimmunity? // *Eur Cytokine Netw.* 2021 Dec 1;32(4):83-88. doi: 10.1684/ecn.2021.0471.
299. Tang, Q., Song, Y., Shi, M., Cheng, Y., Zhang, W., Xia, X. (2015). Inferring the hosts of coronavirus using dual statistical models based on nucleotide composition. *Sci. Rep.* 2015;5:17155.
300. Tang, Y., Liu, J., Zhang, D., Xu, Z., Ji, J., Wen, C. (2020). Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front Immunol* 2020; 11 : 1708.
301. Tateiwa, Yoshikawa, Kaito. (2019). Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. *Cells* 2019, 8, 818, doi:10.3390/cells8080818.
302. Terkawi, M., Matsumae, G., Shimizu, T., Takahashi, D., Kadoya, K., Iwa- saki, N. (2022). Interplay between Inflammation and Pathological Bone Resorp- tion: Insights into Recent Mechanisms and Pathways in Related Diseases for Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 23:1786.
303. Tikku, M., Shah, R. & Allison G. (2000). Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein. degradation possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *Journal of Biological Chemistry.*275(26):20069-20076.
304. Thorson, C., Galicia, K., Burleson, A., Bouchard, O., Hoppensteadt, D., Fareed, J., Hopkinson, W. (2019). Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors and

Proteoglycan 4 in Patients Undergoing Total Joint Arthroplasty. *Clin. Appl. Thromb.* 25, 107602961982811, doi:10.1177/1076029619828113.

305. To, E., Vlahos, R., Luong, R., Halls, M., Reading, P., King, P. (2017). Endosomal NOX2 oxidase exacerbates virus pathogenicity and is a target for antiviral therapy. *Nat Commun.* Dec 2017;8(1):69.

306. Toniati, P., Piva, S., Cattalini, M. (2020). Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: a single center study of 100 patients in Brescia, Italy. *Autoimmun Rev.* 2020; 19.

307. Townsend, L, Dyer, A., Jones, K., Dunne, J., Mooney, A., Gaffney, F., et al. (2020). Persistent fatigue following SARS-CoV-2 infection is common and independent of severity of initial infection. *PLoS One* 2020;15:e0240784.

308. Turell, L., Zeida, A., Trujillo, M. (2020). Mechanisms and consequences of protein cysteine oxidation: the role of the initial short-lived intermediates. *Essays Biochem*, 64(1), 55-66. <https://doi.org/10.1042/EBC20190053>.

309. Udomsinprasert, W., Mookkhan, N., Tabtimmark, T., Aramruang, T., Ungsudechachai, T., Saengsiwaritt, W., Jittikoon, J., Chaikledkaew, U., Honsawek, S. (2024). Cartilage oligomeric matrix protein as a potential biomarker for knee osteoarthritis. *Bone Joint Res.* 2024 Jun 1;13(6):261-271. doi: 10.1302/2046-3758.136.BJR-2023-0180.R1.

310. Ulrich, K. & Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radic Biol Med*, 140, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>.

311. Umesh, A., Pranay, K., Pandey, R.C., Gupta, M. (2022). Evidence mapping and review of long-COVID and its underlying pathophysiological mechanism. *Infection* 2022, doi:10.1007/s15010-022-01835-6.

312. van Eijk, L., Binkhorst, M., Bourgonje, A., Offringa, A., Mulder, D., et al. (2021). COVID-19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options. *J Pathol.* 2021 Jul;254(4):307-331. doi: 10.1002/path.5642.

313. Varga, Z., Flammer, A.J., Steiger, P., Haberecker, M., Andermatt, R., Zinkernagel, A. (2020). Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 395:1417–1418.
314. Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxid Med. Cell. Longev*. Apr 23;2020:9829176.
315. Verdecchia, P., Cavallini, C., Spanevello, A., Angel, F. (2020). The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection.. *Eur J Intern Med* 76: 14-20.
316. Verdonk, R., Madry, H., Shabshin, N., et al (2016). The role of meniscal tissue in joint protection in early osteoarthritis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc*. 24:1763–1774. doi: 10.1007/s00167-016-4069-2.
317. Violi, F., Oliva, A., Cangemi, R., Ceccarelli, G., Pignatelli, P., Carnevale R. (2020). Nox2 activation in Covid-19. *Redox Biol*. Sep 2020; 36.
318. Vulliamy, P., Jacob, S., Davenport, R. (2020). Acute aorto-iliac and mesenteric arterial thromboses as presenting features of COVID-19. *Br J Haematol*.
319. Xu, X., Chang, X., Pan, H., et al. (2021). Targeting Dysregulation of Metalloproteinase Activity in Osteoarthritis. *Calcif. Tissue Int*. 109(3):277-290. doi: 10.1007/s00223-020-00739-7.
320. Yamamoto, K., Wilkinson, D., Bou-Gharios, G. (2021) Targeting Dysregulation of Metalloproteinase Activity in Osteoarthritis. *Calcif. Tissue Int*. 109(3):277-290. doi: 10.1007/s00223-020-00739-7.
321. Yong, S. (2021). Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative patho- physiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond)* 53:737–54.
322. Wang, C., Shen, J., Ying, J., et al (2020). FoxO1 is a crucial mediator of TGF- β /TAK1 signaling and protects against osteoarthritis by maintaining articular cartilage homeostasis. *PNAS*. 117(48):30488-30497. doi: 10.1073/pnas.2017056117.
323. Wang, Y., Dong, C., Li, C., Zhang, X., Ren, Q., Shi, H., Hu, Y., Zhou, M. (2020). Temporal changes of CT findings in 90 patients with COVID-19 pneumonia: a longitudinal study. *Radiology*. 296(2):E55–E64.

324. Wang, M., Hao, H., Leeper, N., Zhu, L. (2018). Thrombotic regulation from the endothelial cell perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet] Jun 2018;38(6) <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.118.310367>.

325. Wang, M., Zhou, Y., Huang, W., Zeng, Y., Li, X. (2021). Association between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) protein level and the risk of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a meta-analysis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2021, 54, doi:10.1590/1414-431x202010366.

326. Wang, Z., Chen, L., Hao, X., Qu, Z., Huang, S., Ma X., et al. (2019). Elevated levels of interleukin-1 β , interleukin-6, tumor necrosis factor- α and vascular endothelial growth factor in patients with knee articular cartilage injury. *World J Clin Cases* 7:1262–9.

327. Wichmann, D., Sperhake, J., Lütgehetmann, M., Steurer, S., Edler, C., (2020). Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19: A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med.*

328. Wichmann, D. et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* (2020). <https://doi.org/10.7326/M20-2003>.

329. William, H., Christin, M., Qian, W., Harini, R., Rong Mao, T. et al. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.*, Oct;12(10):580-92. doi: 10.1038/nrrheum.2016.136. Epub 2016 Aug 19.

330. Wong, R., Wu, A., To, K., Lee, N., et al. (2003). Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: Retrospective analysis. *Br Med J* 2003;326:1358–1362.

331. Wood, M., Miller, R., Malfait, A. (2022). The genesis of pain in osteoarthritis: inflammation as a mediator of osteoarthritis pain. *Clin Geriatr Med.* 2022, May 38(2);221-238. doi: 10.1016/j.cger.2021.11.013.

332. Woodell-May, J., Sommerfeld, S. (2020). Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J Orthop Res* 38: 253–7.

333. World Health Organization [Электронный ресурс]. – <https://covid19.who.int/>

334. Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J. (2020). Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 27(3):325–328.

335. Wu, Q., Zhong, Z., Zhu, S., Liao, C., et al. (2016). Advanced oxidation protein products induce chondrocyte apoptosis via receptor for advanced glycation end products-mediated, redox-dependent intrinsic apoptosis pathway. *Apoptosis*. Jan;21(1):36-50. doi: 10.1007/s10495-015-1191-4.

336. Wu, S., Mertens, A., Crider, Y., Nguyen, A., et al. (2020). Substantial underestimation of SARS-CoV-2 infection in the United States *Nat. Commun.* 11, 4507.

337. Wu, Y., Potempa, L., El Kebir, D., Filep, J. (2015). C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. *Biol Chem*. 396: 1181–97. doi:10.1515/hsz-2015-0149.

338. Wu, Z., McGoogan, J. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention *JAMA* 2020 Apr 7;323(13):1239-1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648.

339. Wujak, L., Schnieder, J., Schaefer, L., Wygrecka, M. (2018). LRP1: a chameleon receptor of lung inflammation and repair. *Matrix Biol.*, ;68-69:366–381.

340. Xu, X, Chang, X., Pan, H., Su, H., Huang, B., Yang, M., Luo, D., Weng, M., Ma, L., Nie, X., Nie, X. (2020). Pathological changes of the spleen in ten patients with new coronavirus infection by minimally invasive autopsies. *Chinese J Pathol* 49:E014.

341. Xu, Z., Shi, L., Wang, Y. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020;8:420–422.

342. Ymamamoto, K., Troeberg, L., Scilabra, S., Pelosi, M., Murphy C., Strickland, D., Nagase H. (2013). LRP-1-mediated endocytosis regulates extracellular activity of ADAMTS-5 in articular cartilage. *FASEB*, 27(2):511-21. doi: 10.1096/fj.12-216671.
343. Yang J., Zheng Y., Gou X., Pu K., Chen Z., Guo Q., Ji R., Wang H., Wang Y., Zhou Y. (2020). Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 94:91–95.
344. Yamacita-Borin, F., Zarpelon, A., Pinho-Ribeiro, F., Fattori, V., Alves-Filho, J., Cunha, F., Cunha, T., Casagrande, R., Verri, W. (2015). Superoxide anion-induced pain and inflammation depends on TNF α /TNFR1 signaling in mice. *Neurosci Lett*, 605, 53-8. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.015>.
345. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Liu H., Wu Y., Zhang L., Yu Z., Fang M., Yu T. (2020). Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* 8(5):475–481.
346. Yang, M., Ng, M., Li, K. (2005). Thrombocytopenia in patients with severe acute respiratory syndrome (review) *Hematol.* 10:101–105.
347. Yao, X., Li, T., He, Z., Ping, Y., Liu, H., Yu, S. (2020) A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 49:411–417.
348. Yong, S. (2021). Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative patho- physiology, risk factors, and treatments. *Infect Dis (Lond)* 53:737–54.
349. Yoshida, S., Yamada, S., Yokose, K., Matsumoto, H., Fujita, Y., Asano, T., et al. (2021). Interferon- γ induces interleukin-6 production by neutrophils via the Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway. *BMC Res Notes* 14:447.
350. Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., Hu, H. (2020). Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther.* Sep 21;5(1):209. doi: 10.1038/s41392-020-00312-6.

351. Yuriy T., Krenytska, D., Halenova, T., Kot, L., et al. (2023). Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in patients with osteoarthritis after recovery from COVID-19. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 2023; Volume 18, Issue 4, pp. 123-128, doi:10.2174/1574887118666230131141608.
352. Zarei, M., Bose, D., Nouri-Vaskeh, M., Tajiknia, V., Zand. R., Ghasemi, M. (2022). Long-term side effects and lingering symptoms post COVID-19 recovery. *Rev Med Virol*. May;32(3):e2289. doi: 10.1002/rmv.2289.
353. Zahan, O., Serban, O., Gherman, C., and Fodor D. (2020). The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. *Med Pharm Rep*, 93(1), 12–22. <https://doi.org/10.15386/mpr-1422>.
354. Zeng, G., Chen, A., Li, W., Song, J., Gao, C. (2015). High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genet. Mol. Res*. 2015, 14, 14811–14822, doi:10.4238/2015.November.18.46.
355. Zhang, C., Shen, L., Le, K., Pan, M., Kong, L., Gu, Z. (2023). Incidence of venous thromboembolism in hospitalized coronavirus disease 2019 patients: a systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med*. Aug 6 2020;7:151;
356. Zhang, J., Dong, X., Liu, G., Gao, Y. (2023). Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin Rev Allergy Immunol*, 64(1), 90-107. <https://doi.org/10.1007/s12016-022-08921-5>.
357. Zhang, Y., Xiao, M., Zhang, S., Xia, P., Cao, W., Jiang, W. (2020). Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with covid-19. *N Engl J Med*. 2020:e38.
358. Zhou, Z., Zhao, N., Shu Y., et al. (2020). Effect of Gastrointestinal Symptoms in Patients With COVID-19. *Gastroenterology*, 2020,158(8):2294-2297.
359. Zhu, S., Makosa, D., Miller, B., Griffin, T. M. (2020). Glutathione as a mediator of cartilage oxidative stress resistance and resilience during aging and osteoarthritis. *Connect Tissue Res*, 61(1), 34-47. <https://doi.org/10.1080/03008207.2019.1665035>.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача за темою дисертації та відомості про апробацію результатів дисертації

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Тугаров Ю., Юет А., Торгалю Є., Дворщенко К. Концентрація С-реактивного білка та вміст молекул середньої молекулярної маси у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія», Volume 1, Issue 88, 2022, pp. 47-50, doi:10.17721/1728.2748.2022.88.47-50 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).*

2. Borodin S., **Tuharov Y.**, Ostapchenko D., Kot L., Korotkyi O. View of the pathogenetic mechanisms of joint damage in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Visnyk of Taras Shevchenko national university of Kyiv, series «Biology», 2022, 2(89):5-8, doi.org/10.17721/1728_2748 (пошук літератури, підготовка статті до друку).*

3. Huet A., **Tugarov Yu.**, Dvorshchenko K., Grebinyk D., Savchuk O., Korotkyi O., Ostapchenko L. TGFB1, FOXO1, and COMP genes expression in blood of patients with osteoarthritis after SARS-CoV2 infection. *Cytol Genet. 2023;57(2):128-133, doi:10.3103/S009545272302010X (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку) – Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.*

4. **Тугаров Ю.**, Дворщенко К. Показники системи антиоксидантного захисту у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія»*, 2023. 93(2): 29-33, doi:10.17721/1728.2748.2023.93.29-33 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).

5. **Тугаров Ю.**, Юет А., Дворщенко К. Експресія генів LRP1 та OLR1 у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка серія «Біологія»*, 2023, 3(94):35-40, doi:10.17721/1728.2748.2023.94.35-40 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).

6. **Yuriy Tuharov**, Daryna Krenytska, Tetiana Halenova, Larysa Kot, Nataliia Raksha, Olexii Savchuk, Larisa Prysiashniuk, Ruzhena Matkivska, Tetyana Falalyeyeva, and Liudmyla Ostapchenko Plasma levels of MMPs and TIMP-1 in patients with osteoarthritis after recovery from COVID-19. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 2023; Volume 18, Issue 4, pp. 123-128, doi:10.2174/1574887118666230131141608 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку) – Q3 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

7. **Тугаров Ю.**, Дворщенко К. Окисна модифікація білків у плазмі крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія*, 2024, 97(2):22-27, doi:10.17721/1728.2748.2024.97.22-27 (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку).

Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. Короткий О., **Тугаров Ю.**, Дворщенко К. Інтенсивність вільнорадикальних процесів у плазмі крові хворих на остеоартрит. *Міжнародна науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», присвячена Всесвітньому дню науки, 9–11 листопада 2022 року, Чернівці, Україна, с. 60-63.*

2. Остапченко Д.І., **Тугаров Ю.Р.**, Дворщенко К.О., Короткий О.Г. Антиоксидантна ферментативна активність у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *IX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Об'єднані наукою: перспективи міждисциплінарних досліджень», 17-18 листопада 2022 р., Київ, Україна, с. 128-130.*

3. Юет А.С., **Тугаров Ю.Р.**, Гребіник Д.М., Дворщенко К.О. Експресія генів *OLR1*, *ACAN* та *LRP1* у клітинах синовіальної оболонки хворих на остеоартрит після перенесеної SARS-COV2-інфекції. *Міжнародна наукова конференція «Міжгалузеві диспути: динаміка та розвиток сучасних наукових досліджень», 27 січня 2023 р., м. Хмельницький, Україна, с. 173-175.*

4. **Тугаров Ю.Р.**, Юет А.С., Гребіник Д.М., Цибенко Л.Д., Дворщенко К.О. Показники запалення у крові хворих на остеоартрит після SARS-CoV2-інфекції. *XXI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя / advancements in life sciences», 24-26 квітня 2024 р., м. Київ, Україна, с. 230-234.*

5. Huet A. S., Dvorshchenko K.O., Grebinyk D.M., Kostyuk O.S., **Tugarov Y.R.** Aminotransferase activity in patients with osteoarthritis after SARS-COV2 infection. *The 7th International scientific and practical conference*

«*Current trends in scientific research development*», February 13-15, 2025,
BoScience Publisher, c. Boston, USA, p. 52-55.