

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

КРЕНИЦЬКА ДАРИНА ІГОРІВНА

УДК 612.115:[616.98:578.834COV-19]-097.3

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ У
ЛЮДЕЙ, ЩО МАЮТЬ РІЗНУ КОНЦЕНТРАЦІЮ АНТИ-КОВІДНИХ
АНТИТІЛ**

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

_____ Д.І.Креницька

Науковий керівник:

Савчук Олексій Миколайович, доктор біологічних наук, професор

Київ-2024

АНОТАЦІЯ

Креницька Д.І. Особливості функціонування системи гемостазу у людей, що мають різну концентрацію анти-Ковідних антитіл. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2024.

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

Захворювання на коронавірусну хворобу 2019 (coronavirus disease 2019, COVID-19) виникло наприкінці 2019 року та спричинило спалах пандемії XXI століття. Стрімке розповсюдження COVID-19 викликає занепокоєння серед населення, тому що розвиток подій після інфікування відрізняється від звичних для нас респіраторних захворювань. Інфікування коронавірусом, що викликає важкий гострий респіраторний синдром-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2, SARS-CoV-2) може призвести до розвитку післягострого інфекційного синдрому, відомого як тривалий COVID-19. Люди з тривалим COVID-19 часто скаржаться на постійну втому, нездужання після фізичних навантажень та різноманітні когнітивні та вегетативні дисфункції.

Однак біологічні процеси, пов'язані з розвитком і збереженням цих симптомів, залишаються незрозумілими. Переважаючи гіпотези щодо стійких симптомів довготривалого COVID-19 були звужені до імунної дисрегуляції із залученням аутоантитіл, поширеного ураження органів, вірусної персистенції та утворенням фібриноїдних мікротромбів (що захоплюють численні молекули запалення) поряд із гіперактивацією тромбоцитів. Також з'являється все більше доказів того, що аутоантитіла можуть бути причетні до тривалих симптомів у осіб із тривалим перебігом COVID-19. Крім того, небезпека

COVID-19 також полягає в тому, що при перебігу хвороби під час системної запальної відповіді можливий розвиток порушень згортання крові. Як наслідок, дисбаланс системи гемостазу призводить до тромботичних ускладнень уже в постковідному періоді.

Розуміння механізмів змін у системі гемостазу після перенесеного коронавірусного захворювання може бути корисним та надасть можливості потенційного використання отриманих результатів як основи для розробки алгоритму нових терапевтичних підходів у безпосередньому лікуванні COVID-19, що передбачатиме інтенсивну терапію для запобігання тромботичних ускладнень вже в постковідному періоді.

Метою дисертаційної роботи було проаналізувати функціонування системи гемостазу у людей, які перехворіли на COVID-19 та мають в кровотоці різну концентрацію анти-Ковідних антитіл.

У вступі до дисертаційної роботи визначено мету та завдання даного дослідження, обґрунтовано актуальність обраної теми, охарактеризовано предмет та об'єкт дослідження, перелічено методи, які використовувались для досягнення мети роботи. Окрім цього, у даному розділі роботи окреслено аспекти дослідження, що визначають його наукову новизну, а також зазначено основні результати роботи та перспективні напрямки їх практичного використання. Наведено дані щодо апробації результатів, отриманих в ході роботи та виділено особистий внесок здобувача у представлених наукових працях.

Перший розділ роботи містить огляд актуального наукового доробку, присвяченого тематиці дослідження. Так, у ньому розглянуті розлади системи гемостазу, які виникають у патогенезі COVID-19, описано гострий респіраторний дистрес-синдром під час перебігу COVID-19, детально охарактеризовано функціонування системи гемостазу при COVID-19. Розглянуто результати досліджень, які характеризують динаміку змін антитіл до SARS-CoV-2 під час інфікування даним вірусом та одужання від COVID-

19, а також експериментів, у яких вивчалися гематологічні та біохімічні показники у пацієнтів після одужання від COVID-19.

Другий розділ роботи присвячений характеристиці дослідних груп донорів, детальному опису методологій проведення досліджень та матеріалів, що були використані.

Третій розділ включає результати досліджень та їх обговорення і складається із чотирьох блоків. Кожний блок присвячений вивченню певної ланки систему гемостазу. Так, у першому блоці проводиться аналіз ключових параметрів системи зсідання плазми крові у людей, що перехворіли на COVID-19 і мають різну концентрацію анти-Ковідних антитіл в крові. Розглядаються наступні параметри: активований частковий тромбoplastиновий час, тромбіновий час, досліджуються концентрації та активність таких параметрів, як антитромбін III, протеїн C, також проводиться аналіз концентрації трансмембранного рецептору тромбіну – тромбомодуліну. В другому блоці наведена оцінка вмісту молекул фібриногенового походження в плазмі крові людей після перенесеної коронавірусної хвороби та мають різну концентрацію анти-Ковідних антитіл в крові. Детально досліджуються параметри системи гемостазу, які безпосередньо впливають на перетворення фібриногену в фібрин у присутності анти-SARS-CoV-2 IgG в крові. Також надано результати кількісного та якісного аналізів вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів, які були отримані з плазми крові донорів, та дослідження концентрації маркера фібринолізу D-димеру. В третьому блоці аналізується функціонування протромбінової складової системи зсідання крові людей, які перехворіли на COVID-19 та мають різну концентрацію анти-SARS-CoV-2 IgG.

Проведено визначення показника зовнішнього каскаду згортання плазми – протромбінового часу, розраховане міжнародне нормалізоване відношення, досліджено потенційну активність та вміст протромбіну в досліджуваних групах. Наведена оцінка та характеристика якісного складу фракції вітамін K-

залежних білків плазми крові усіх дослідних груп. Вмістом четвертого блоку є результати дослідження фібрінолітичної ланки системи гемостазу. Проаналізовано потенційну активність та кількісний вміст плазміногену в плазмі крові донорів, що перенесли COVID-19 та мають різну концентрацію анти-Ковідних антитіл в крові. Встановлено потенційну активність та кількісний вміст тканиного активатора плазміногену (tissue plasminogen activator, tPA), а також вміст інгібітору активатора плазміногену першого типу (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1). Виміряно інгібіторний потенціал α_2 -антиплазміну, визначено загальну активність ключових інгібіторів протеаз, зокрема α_2 -макроглобуліну та α_1 -антитрипсину.

Четвертий розділ дисертаційного дослідження – заключення – узагальнює отримані результати, наводить можливості їхнього застосування та підкреслює їхню новизну. Наведено можливості практичного застосування результатів дисертаційного дослідження та охарактеризовано їх новизну.

Результатом роботи є проведена всебічна оцінка стану системи гемостазу, що включає аналіз кількісного та якісного складу, активності основних факторів системи гемостазу у людей, які перехворіли на COVID-19 та які мають різну концентрацію анти-Ковідних антитіл в крові.

Отримані результати дозволяють зробити висновок про певний вплив циркулюючих у кровотоці IgG проти SARS-CoV-2 на функціонування системи гемостазу, що може бути потенційною загрозою появи/розвитку гострих коронарних синдромів та порушень мозкового кровообігу. Результати експериментів підтверджують необхідність отримання фракцій IgG та дослідження їх потенційного впливу на функціонування системи гемостазу на модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

Матеріали за результатами виконаних досліджень опубліковано в 12 наукових працях, з них: 3 статті у закордонних фахових періодичних виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз Scopus та Web of

Science (Q2–Q3). Здійснено апробацію результатів у рамках наукових конференцій з опублікуванням 9 тез доповідей.

Ключові слова: COVID-19, IgG, фібриноліз, система гемостазу, фібриноген, плазміноген, протеолітична активність, плазма крові, антитіла, серинові протеази, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Krenytska D.I. People's features of hemostatic system functioning with different concentrations of anti-Covid antibodies. - Manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 091 - Biology. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2024.

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.

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) emerged in late 2019 and caused the outbreak of the pandemic of the 21st century. The rapid spread of COVID-19 is a cause for concern among the population, as the course of events after infection differs from the usual respiratory diseases. Infection with the coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome-2 (SARS-CoV-2) can lead to the development of a post-acute infectious syndrome known as prolonged COVID-19. People with prolonged COVID-19 often complain of persistent fatigue, malaise after exercise, and various cognitive and autonomic dysfunctions.

However, the biological processes associated with the development and persistence of these symptoms remain unclear. The prevailing hypotheses for the persistent symptoms of long-term COVID-19 have been narrowed to immune dysregulation involving autoantibodies, widespread organ damage, viral persistence, and fibrinoid microthrombus formation (trapping numerous inflammatory molecules) along with platelet hyperactivation. There is also growing evidence that autoantibodies may be involved in the prolonged symptoms in individuals with prolonged COVID-19. In addition, the danger of COVID-19 is that during the course of the disease, during a systemic inflammatory response, blood clotting disorders may develop. As a result, the imbalance of the hemostatic system leads to thrombotic complications in the post-COVID period.

Understanding the mechanisms of changes in the hemostatic system after coronavirus disease can be useful and will provide opportunities for the potential use of the results as a basis for developing an algorithm for new therapeutic approaches in the direct treatment of COVID-19, which will include intensive care to prevent thrombotic complications in the post-COVID period.

The purpose of the dissertation was to analyze the functioning of the hemostatic system in people who have contracted COVID-19 and have different concentrations of anti-SARS-CoV-2 antibodies in their bloodstream.

The introduction to the dissertation defines the purpose and objectives of this study, substantiates the relevance of the chosen topic, characterizes the subject and object of the study, and lists the methods used to achieve the goal of the work. In addition, this section of the paper outlines the aspects of the study that determine its scientific novelty, as well as the main results of the work and promising areas of their practical use. The data on the testing of the results obtained in the course of the work are presented and the personal contribution of the applicant in the presented scientific papers is highlighted.

The first section of the paper provides an overview of the current scientific literature on the subject matter of the study. Thus, it discusses the disorders of the hemostatic system that occur in the pathogenesis of COVID-19, describes acute respiratory distress syndrome during COVID-19, and describes in detail the functioning of the hemostatic system in COVID-19. The results of studies characterizing the dynamics of changes in antibodies to SARS-CoV-2 during infection with this virus and recovery from COVID-19, as well as experiments that studied hematological and biochemical parameters in patients after recovery from COVID-19 are reviewed.

The second section of the paper is devoted to the characterization of donor research groups, a detailed description of research methodologies and materials used.

The third section includes the results of the research and their discussion and consists of four blocks. Each blocks is devoted to the study of a specific link in the hemostatic system. Thus, the first block analyzes the key parameters of the plasma coagulation system in people with COVID-19 and different concentrations of anti-SARS-Cov-2 antibodies in the blood. The following parameters are considered: activated partial thromboplastin time, thrombin time, concentrations and activity of such parameters as antithrombin III, protein C, and the concentration of the transmembrane thrombin receptor thrombomodulin are also analyzed. The second block provides an assessment of the content of fibrinogen-derived molecules in the blood plasma of people after coronavirus disease and with different concentrations of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the blood. The parameters of the hemostatic system that directly affect the conversion of fibrinogen to fibrin in the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG in the blood are studied in detail. The results of quantitative and qualitative analyses of the content of soluble fibrin-monomer complexes obtained from donor plasma and the study of the concentration of the fibrinolysis marker D-dimer are also presented. The third block analyzes the functioning of the prothrombin component of the blood coagulation system of people who have had COVID-19 and have different concentrations of anti-SARS-CoV-2 IgG.

The index of the external cascade of plasma coagulation - prothrombin time - was determined, the international normalized ratio was calculated, and the potential activity and content of prothrombin in the study groups were investigated. The qualitative composition of the fraction of vitamin K-dependent plasma proteins in all study groups was evaluated and characterized. The fourth block contains the results of the study of the fibrinolytic link of the hemostatic system. We analyzed the potential activity and quantitative content of plasminogen in the blood plasma of donors who have undergone COVID-19 and have different concentrations of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the blood. The potential activity and quantitative content of tissue plasminogen activator (tPA), as well as the content of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) were determined. The inhibitory potential of α_2 -

antiplasmin was measured, and the total activity of key protease inhibitors, including α_2 -macroglobulin and α_1 -antitrypsin, was determined.

The fourth chapter of the dissertation - the conclusion - summarizes the results obtained, provides opportunities for their application and emphasizes their novelty. The possibilities of practical application of the results of the dissertation research are presented and their novelty is characterized.

The result of the work is a comprehensive assessment of the hemostatic system, including an analysis of the quantitative and qualitative composition, activity of the main factors of the hemostatic system in people who have had COVID-19 and who have different concentrations of anti-SARS-CoV-2 antibodies in the blood.

The obtained results allow us to conclude that circulating IgG against SARS-CoV-2 has a certain effect on the functioning of the hemostatic system, which may be a potential threat to the onset/development of acute coronary syndromes and cerebrovascular disorders. The results of the experiments confirm the need to obtain IgG fractions and study their potential impact on the functioning of the hemostatic system.

The obtained results allow us to conclude that circulating IgG against SARS-CoV-2 has a certain effect on the functioning of the hemostatic system, which may be a potential threat to the onset/development of acute coronary syndromes and cerebrovascular disorders. The results of the experiments confirm the need to obtain IgG fractions and study their potential impact on the functioning of the hemostatic system in *in vitro* and *in vivo* model systems.

Materials based on the results of the research were published in 12 scientific papers, including: 3 articles in foreign professional periodicals included in the international scientometric databases Scopus and Web of Science (Q2-Q3). The results were presented at scientific conferences with the publication of 9 abstracts.

Key words: COVID-19, IgG, fibrinolysis, hemostasis system, fibrinogen, plasminogen, proteolytic activity, blood plasma, antibodies, serine proteases, SARS-CoV-2.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitalii Karbovskyy, Nataliia Raksha, Tetiana Halenova, Tetiana Vovk, Olexii Savchuk and Liudmyla Ostapchenko. A study of fibrinolytic system components in donor groups depending on various titers of circulating anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, Volume 34, Issue 7, 2023, pp. 439-445, [doi:10.1097/MBC.0000000000001248](https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001248) (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.

2. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitalii Karbovskyy, Tetiana Halenova, Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Olexii Savchuk, Dmytro Liubenko, Tetyana Falalyeyeva, Liudmyla Ostapchenko and Ludovico Abenavoli. Characteristics of products of fibrinogen origin in the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. *Reviews on Recent Clinical Trials*, Volume 18, Issue 1, 2023, pp. 69-75, [doi:10.2174/1574887118666221219115856](https://doi.org/10.2174/1574887118666221219115856) (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.

3. Kateryna Strubchevska, Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitalii Karbovskyy, Marko Kozyk, Benjamin Secor, Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Olexii Savchuk, Tetyana Falalyeyava, Rostyslav Kaminsky, Liudmyla Ostapchenko. Coagulation parameters in post-Covid-19 condition in relation to various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. *International Journal of General Medicine*, Volume 16, 2023, pp. 6127—6135, [doi:10.2147/IJGM.S425496](https://doi.org/10.2147/IJGM.S425496)

(особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку) – Q2 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, and Olexiy Savchuk. Levels of proinflammatory cytokines in blood plasma of patients suffered from COVID-19. *18th Horizons in molecular biology*, Gottingen, Germany, 13-16 September 2021, p. 107.

2. Maryna Kalashnikova, **Daryna Krenytska**, Olexiy Savchuk. Collagen-containing enzyme-electrophoresis in detection of proteolytic activity in blood plasma of donors with different titers of anti-SARS-CoV-2. *Open Readings*, Vilnius, Lithuania, 18-13 April 2023, p. 293.

3. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitaliy Karbovskiy. Concentrations of fibrinogen and D-dimer in blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. *Open Readings*, Vilnius, Lithuania, 18-13 April 2023, p. 400.

4. **Krenytska D.**, Nechiporenko B. Protein C content in donors blood plasma with different anti-SARS-CoV-2-IgG titers. *XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології"*, м. Полтава, Україна, 26–28 квітня 2023 року, стр. 44.

5. Kalashnikova M., Rachkovska A., **Krenytska D.** Comparison of plasminogen/plasmin content between blood plasma samples of donors with and without streptokinase addition. *XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології"*, м. Полтава, Україна, 26–28 квітня 2023 року, стр. 43.

6. Rachkovska A., Kalashnikova M., **Krenytska D.** Analysis of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) in blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. *XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології"*, м. Полтава, Україна, 26–28 квітня 2023 року, стр. 48.

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

8. Калашнікова М., Рачковська А., **Креницька Д.** Аналіз змін у плазміновому пулі в зразках плазми крові донорів, які перехворіли на COVID-19. *XX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених "Шевченківська весна: досягнення в науках про життя"*, м. Київ, Україна, 27-28 квітня 2023, стр.121-124.

9. Рачковська А.М. **Креницька Д.І.**, Калашнікова М.В. Оптимізація методики ензим-електрофорезу для дослідження ферментативної активності у плазмі крові донорів за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG. *XVII Міжнародна науково-практична конференція "Біотехнологія XXI століття"*, м. Київ, Україна, 19 травня 2023 року, стр.171-173.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	17
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Гострий респіраторний дистрес-синдром при COVID-19	28
1.2. Система гемостазу при COVID-19	32
1.3. Динаміка зміни антитіл до SARS-CoV-2 під час коронавірусної хвороби та одужання від COVID-19	39
1.4. Гематологічні та біохімічні показники у пацієнтів після одужання від COVID-19	41
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	44
2.1. Характеристика дослідних груп донорів	44
2.2. Реагенти та матеріали	45
2.3. Обладнання	46
2.4. Визначення активованого часткового тромбопластинового часу плазми крові	46
2.5. Визначення тромбінового часу зсідання плазми крові	47
2.6. Визначення активності антитромбіну III в плазмі крові.....	47
2.7. Визначення концентрацій антитромбіну III в плазмі крові.....	48
2.8. Визначення активності протеїну C у плазмі крові	48
2.9. Метод імуноферментного аналізу в дослідженні показників гемостазу.....	49
2.10. Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові.....	50

2.11. Визначення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів в плазмі крові.....	51
2.12. Аналіз якісного складу фракцій розчинних фібрин-мономерних комплексів та виділення вітамін К-залежних білків (фракцій) методом хроматографії, що поділяє за розміром.....	51
2.13. Визначення концентрації D-димерів у плазмі крові.....	52
2.14. Визначення протромбінового часу плазми крові та міжнародного нормалізованого відношення плазми крові.....	53
2.15. Визначення потенційної активності молекул протромбіну в плазмі крові	54
2.16. Визначення потенційної активності плазміногену в плазмі крові.....	54
2.17. Визначення потенційної активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові.....	55
2.18. Визначення інгібіторного потенціалу α_2 -антиплазміну в плазмі крові.....	55
2.19. Визначення інгібіторного потенціалу α_2 -макроглобуліну в плазмі крові..	56
2.20. Визначення інгібіторного потенціалу α_1 -антитрипсину в плазмі крові.....	56
2.21. Визначення концентрації білка методом Бредфорд.....	57
2.22. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфат натрію.....	58
2.23. Статистична обробка результатів дослідження.....	58
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	60
3.1. Аналіз ключових параметрів системи зсідання плазми крові у людей, що перехворіли на COVID-19 і мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG у крові...	60
3.2. Оцінка вмісту молекул фібриногенового походження в плазмі крові людей після перенесеної коронавірусної хвороби з різними рівнями анти-SARS-CoV-2 IgG у крові.....	75

3.3. Дослідження функціонування протромбінової ланки системи зсідання крові людей, які перехворіли на COVID-19 та мають в кровотоці різну кількість анти-SARS-CoV-2 IgG.....	84
3.4. Аналіз фібринолітичної ланки системи гемостазу в людей, що перенесли COVID-19 та мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці	96
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	112
ВИСНОВКИ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	119
Додаток А	140

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

анти-SARS-CoV-2 IgG	анти-Ковідні антитіла;
АПФ-2	ангіотензинперетворювальний фермент-2;
АТ III	антитромбін III;
АЧТЧ	активований частковий тромбопластиновий час;
ГРВІ	гостра респіраторна вірусна інфекція;
ГРДС	гострий респіраторний дистрес-синдром;
ДВЗ	дисеміноване внутрішньосудинне згортання;
ДСН	додецилсульфат натрія;
ІФА	імуноферментний аналіз;
ЛДГ	лактатдегідрогеназа;
МНВ	міжнародне нормалізоване відношення;
ПС	протеїн С;
ПЧ	протромбіновий час;
РФМК	розчинні фібрин-мономерні комплекси;
ТЕУ	тромбоемболічні ускладнення;
ТЕЛА	тромбоемболія легеневої артерії;
ТМ	тромбомодулін;
ТЧ	тромбіновий час;
α_2 -АП	α_2 -антиплазмін;
α_1 -АТ	α_1 -антитрипсин;
α_2 -МГ	α_2 -макроглобулін;

ADAMTS-13	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (дезінтегрин і металопротеїназа з тромбоспондиновим мотивом);
BAPNA	N α -benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (N α -бензоїл-L-аргінін 4-нітроанілід гідрохлорид)
COVID-19	coronavirus disease-2019 (короновірусна хвороба-2019);
DAD	diffuse alveolar damage (дифузне альвеолярне пошкодження);
ЕДТА	Ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота)
FiO ₂	fraction of inspired oxygen (фракція вдихуваного кисню);
IL	interleukin (інтерлейкін);
PaO ₂	partial pressure of oxygen (парціальний тиск артеріального кисню);
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1 (інгібітор активатору плазміногену-1);
PEEP	positive end-expiratory pressure (позитивний тиск наприкінці видиху);
PIVKA-II	protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (білок, індукований відсутністю або антагоністами вітаміну К-II);
RBD	receptor-binding domain (рецептор-зв'язувальний домен);

SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 (важкий гострий респіраторний синдром-2);
TFPI	tissue factor pathway inhibitor (інгібітор шляху тканинного фактору);
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2 (трансмембранна протеаза, серин 2);
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha (фактор некрозу пухлини- α);
tPA	tissue-type plasminogen activator (активатор плазміногену тканинного типу);
uPA	urokinase-type plasminogen activator (активатор плазміногену урокіназного типу);
vWF	von Willebrand factor (фактор фон Віллебранда).

ВСТУП

Інфікування SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2, важкий гострий респіраторний синдром-2) може призвести до розвитку післягостро інфекційного синдрому, відомого як тривалий COVID-19. Люди з тривалим COVID-19 (coronavirus disease-2019, коронавірусна хвороба-2019) часто скаржаться на постійну втому, нездужання після фізичних навантажень та різноманітні когнітивні та вегетативні дисфункції [1–3].

Однак біологічні процеси, які пов'язані з розвитком і збереженням цих симптомів, залишаються незрозумілими. Переважаючі гіпотези щодо стійких симптомів довготривалого COVID-19 були звужені до імунної дисрегуляції із залученням аутоантитіл, поширеного ураження органів, вірусної персистенції та утворенням фібриноїдних мікротромбів (що захоплюють численні молекули запалення) поряд із гіперактивацією тромбоцитів. Також з'являється все більше доказів того, що аутоантитіла можуть бути причетні до тривалих симптомів у осіб із тривалим перебігом COVID-19 [4–5].

Обґрунтування вибору теми дослідження: достеменно невідомі механізми, що призводять до порушень у процесах згортання крові після COVID-19 і впливають на їхній розвиток після повного одужання, тому глибоке і детальне дослідження особливостей функціонування системи гемостазу в людей, що перенесли коронавірусну хворобу і мають різну концентрацію анти-Ковідних антитіл, наразі є актуальним.

Адже інформація, отримана під час аналізу усіх можливих змін у роботі системи гемостазу у постковідному періоді, може бути корисною при створенні/редагуванні стандартних протоколів лікування COVID-19 з метою передбачення ризику можливих ускладнень з боку процесів коагуляції.

Мета і завдання дослідження: метою дисертаційної роботи було проаналізувати функціонування системи гемостазу у людей, які перехворіли на COVID-19 та мають в кровотоці різну концентрацію анти-Ковідних антитіл.

Для досягнення поставленої мети було поставлено такі завдання:

1. Проаналізувати ключові параметри системи зсідання крові (протеїн С (ПС), антитромбін III (АТIII), тромбомодулін (ТМ), скринінгові тести – активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ), тромбіновий час (ТЧ) та протромбіновий час (ПЧ) у людей, які перехворіли на COVID-19 та мають у кровотоці різну кількість анти-Ковідних антитіл (анти-SARS-CoV-2 IgG).

2. Оцінити вміст молекул фібриногенового походження (фібриноген, розчинні фібрин-мономерні комплекси, Д-димер) у плазмі крові людей після перенесеної коронавірусної хвороби з різними рівнями анти-SARS-CoV-2 IgG у крові.

3. Дослідити функціонування протромбінової ланки системи зсідання крові людей, що перенесли COVID-19 і мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG у крові.

4. Проаналізувати фібринолітичну ланку системи гемостазу у людей, що перенесли COVID-19 та мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці.

Об'єкт дослідження: плазма крові донорів, що перехворіли на COVID-19 та мають у кровотоці різну кількість анти-SARS-CoV-2 IgG.

Предмет дослідження: параметри системи гемостазу крові донорів, що перенесли COVID-19 та мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці.

Методи дослідження: для проведення досліджень було застосовано найсучасніші методи дослідження, зокрема, клотингові (АЧТЧ, ТЧ, ПЧ, МНВ), спектрофотометричні (вміст і активність антитромбіну III, активність протеїну С, концентрація фібриногену, потенційні активності протромбіну, плазміногену, тканинного фактору плазміногену, інгібіторні потенціали α_2 -антиплазміну, α_2 -макроглобуліну, α_1 -антитрипсину), імунохемилюмінесцентні

(вміст D-димеру) методи, імуноферментний аналіз (вміст протеїну С, тромбомодуліну, плазміногену, інгібітора активатору плазміногену-1, тканинного активатору плазміногену, молекул протромбінового пулу), а також хроматографічні (виділення фракцій антитромбіну III й вітамін К-залежних білків, розділення фракцій розчинних фібрин-мономерних комплексів) й електрофоретичні (визначення чистоти виділених білкових фракцій антитромбіну III та вітамін К-залежних білків) методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено всебічну оцінку стану системи гемостазу, що включає аналіз скринінгових тестів, кількісного й якісного складу, а також активностей основних факторів системи гемостазу у донорів після перенесеної коронавірусної хвороби у кровотоці яких присутні різні титри анти-SARS-CoV-2 IgG. Встановлено, що у деяких групах донорів спостерігається пролонгованість ПЧ, АЧТЧ та ТЧ, що вказує на дисфункцію процесів згортання крові. При цьому для групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 та 95 ± 5 Індекс (S/C) характерне подовження як ПЧ, так і ТЧ, що може свідчити про розвиток патологічних станів зовнішнього та завершального шляхів згортання крові. В усіх групах донорів, окрім титру 125 ± 5 Індекс (S/C), зростала потенційна активність протромбіну. Методом хроматографії, що поділяє за розміром, вдалося з'ясувати, що при розділенні фракцій вітамін К-залежних білків у експериментальних групах донорів збільшується кількість хроматографічних піків, площа під піками та присутні високомолекулярні білкові фракції, чого не було характерно для контрольної групи донорів. Встановлено підвищення активності АТIII у групі донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 Індекс (S/C), і зниження – в групі 75 ± 5 Індекс (S/C) порівняно з контрольною групою, а також виявлено зміни концентрації АТIII у плазмі крові: підвищення – у групі донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 175 ± 5 Індекс (S/C), і зниження – в групі із титром антиковідних антитіл 75 ± 5 Індекс (S/C). Визначено зростання активності ПС у групі донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C), тоді як група з титрами анти-Ковідних антитіл

95 ± 5 Індекс (S/C) характеризувалися зниженням даного показника. Щодо кількісного аналізу, у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) підвищувався вміст ПС; однак у донорів з рівнем антитіл 85 ± 5 Індекс (S/C) - знизився порівняно з контрольною групою. При цьому активність ТМ знижувалася у групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3, 75 ± 5 Індекс (S/C).

Практичне значення одержаних результатів. Знання про механізми змін у системі гемостазу після перенесеної коронавірусної хвороби надасть можливість потенційного використання отриманих результатів як основи для розробки нових терапевтичних, діагностичних підходів та протоколів лікування COVID-19, які повинні включати інтенсивну терапію для профілактики тромботичних ускладнень у посткоїдному періоді.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним дослідженням автора. Здобувачем особисто виконано пошук та проаналізовано наукову літературу за темою роботи, самостійно виконано експериментальні дослідження, проведено статистичний аналіз отриманих результатів та підготовку матеріалів до публікації.

Формування ідеї роботи, планування схем експериментальних робіт, аналіз та обговорення отриманих результатів і узагальнення висновків було проведено спільно з науковим керівником, проф., д.б.н. Савчуком О.М.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи було представлено на таких конференціях: 18th Horizons in molecular biology (Gottingen, Germany, 13-16 September 2021), Open Readings (Vilnius, Lithuania, 18-13 April 2023), XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м.Полтава, Україна, 26–28 квітня 2023 року), Актуальні питання біології та медицини (м. Лубни, Україна, 2 червня 2023 року), XX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя" (м. Київ, Україна, 27-

28 квітня 2023), XVII Міжнародна науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття, (м. Київ, Україна, 19 травня 2023 року).

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 «Тромбози як фактор ризику виникнення ускладнень у пацієнтів, що хворіли на Covid-19», 2021-2023 рр., № ДР 0121U109854.

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 2020 року.

Уточнення теми дисертаційної роботи затверджено на засіданні Вченої ради Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 5 від 10 листопада 2023 року.

Публікації. За темою дисертаційного дослідження опубліковано 3 статті у наукових виданнях, які належать до міжнародної наукометричної бази Scopus, з них 1 публікація у періодичному науковому виданні, віднесеному до другого квартилю (Q2) та 2 публікації у періодичному науковому виданні, віднесеного до третього квартилю (Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank), а також 9 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація містить такі розділи: Вступ, Огляд літератури, Матеріали та методи досліджень, Результати досліджень та їх обговорення, Заклучення, Висновки, Список використаних джерел та Додатки. Дисертацію викладено на

142 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 25 рисунками та 2 таблицями. Список літератури включає 169 найменування.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

COVID-19 – це захворювання, спричинене коронавірусом SARS-CoV-2. У грудні 2019 року новий коронавірус, який, як вважають, походить з міста Ухань, Китай, став збудником вірусної пневмонії (коронавірусної хвороби) у людини, що призвело до пандемії [6].

Ця ситуація стала серйозним викликом для систем охорони здоров'я, економіки та соціального життя у багатьох країнах. Світова спільнота продовжує працювати над стратегіями контролю та лікування COVID-19, а також відновленням глобальної стабільності.

Небезпека для здоров'я населення, зокрема, полягає у тому, що, окрім респіраторного ураження, при COVID-19 можуть розвиватися порушення згортання крові, які нерідко залишаються тривалий час недіагностованими у лікувальній практиці.

Одужання після гострих вірусних інфекцій відбувається неоднорідно, а хронічні симптоми у деяких людей можуть зберігатися від кількох місяців до кількох років. Більше того, після гострої інфекції можуть розвинутися стійкі наслідки, спричинені низкою вірусів з різних вірусних родин [7–11].

Важливо, що дисфункція згортання крові при інфікуванні SARS-CoV-2 відрізняється від синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ-синдром) тим, що характеризується переважно легеневою локалізацією, тому прийнято вважати, що порушення процесів гемостазу на фоні інфікування SARS-CoV-2 відбувається за механізмом легеневої внутрішньосудинної коагулопатії з яскраво вираженим тромбозапаленням [12–13]. До ознак коагулопатії, що супроводжує COVID-19, відносять зміни (подовження/укорочення) ПЧ та АЧТЧ, зростання концентрації Д-димеру, фібриногену та продуктів деградації фібрину, зменшення вмісту АТ III.

Рекомендовано, щоб при підтвердженому діагнозі COVID-19, для передбачення можливих ускладнень з боку системи гемостазу здійснювалась

діагностика пацієнтів, що включає збір клінічної інформації про основні параметри коагуляції [12–14].

SARS-CoV-2 переважно зв'язується з клітинами, що характеризуються високою експресією рецепторів АПФ-2 (ангіотензинперетворювальний фермент-2) і TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2; трансмембранна протеаза, серин 2), наприклад, клітинами вільної носової порожнини та/або епітеліальними клітинами дихальних шляхів [15–16], з підвищеною експресією АПФ-2 у клітинах альвеолярного типу II [17]. Після проникнення вірусу в клітину та реплікації SARS-CoV-2 може виникнути обширне пошкодження тканин ендотеліальних і епітеліальних структур, що призводить до підвищення їх проникності та альвеолярного інтерстиціального накопичення багатих на білок рідин (набряку) [18].

У ранній ексудативній фазі спостерігається інактивація сурфактанту, відкладення фібрину [19] і утворення гіалінової мембрани, велике запалення тканин і порушення клітинного гомеостазу, включаючи апоптоз і некроз (наприклад, у пневмоцитах II типу) [20], що часто призводить до дифузного альвеолярного пошкодження (diffuse alveolar damage, DAD). У такому контексті, DAD може викликати серйозні порушення в обміні газів, оскільки гіалінова мембрана та велике запалення тканин значно ускладнюють газообмін в альвеолах. Це може спричинити суттєве зниження ефективності легеневої функції та призвести до подальшого ускладнення стану пацієнта.

Крім того, часто посилюється проліферація фібробластів і міофібробластів, що може призвести до органічної пневмонії. На додаток до ексудації, проліферації та легеневої васкулопатії (через індукований вірусом ендотеліт, мікроангіопатію та тромбоз) [20], також може розвинути фіброз легенів із незворотним руйнуванням легеневої архітектури.

1.1. Гострий респіраторний дистрес-синдром при COVID-19

Пандемія SARS-CoV-2, що розпочалася на початку 2020 року, спричинила мільйони смертей від важкого ураження легень та дихальної недостатності, часто ускладненої полісистемними ураженнями. SARS-CoV-2 переважно передається повітряно-крапельним шляхом і зазвичай викликає симптоми втоми, нездужання, лихоманки, кашлю, болю в горлі та задишки внаслідок пневмоніту, гіпоксемії та дихальної недостатності. Хворіють люди різного віку та походження. Фактори ризику погіршення результатів лікування COVID-19 включають старший вік, чоловічу стать, куріння, ожиріння, діабет, гіпертонію, серцево-судинні захворювання, рак, аутоімунні розлади тощо. Найгірший прогноз мають люди з обмеженими резервами, особливо у функції легень. Хоча COVID-19 був описаний як атипова форма гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС), це питання залишається дуже суперечливим, оскільки патофізіологічна схожість із ГРДС, викликаним іншими причинами, переважає над будь-якими відмінностями. Багато в чому поява COVID-19 як тригера ГРДС знову відкрила питання щодо патофізіології самого ГРДС [21].

Результати численних клінічних досліджень свідчать про можливість розвитку ГРДС під час перебігу COVID-19. ГРДС і легенева недостатність є основними захворюваннями легенів у хворих на COVID-19. ГРДС виникає внаслідок як прямого вірусного впливу, так і речовин, що виробляються клітинами хазяїна. Активовані клітини імунної системи вивільняють ряд продуктів, таких як мієлопероксидази нейтрофілів та інші протеїнази, основні білки еозинофілів та катіонні білки, а також надмірно продукують прозапальні цитокіни, включаючи інтерлейкін (interleukin, IL) IL-6 та фактор некрозу пухлин- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), що може призвести до погіршення перебігу ГРДС та обширного пошкодження тканин, поліорганної дисфункції та летальності [21].

ГРДС – це гострий початок гіпоксемії (відношення парціального тиску артеріального кисню (P_{aO_2}) до фракції вдихуваного кисню (F_{iO_2}) ≤ 200 мм рт.ст.) [22]. Це фатальне ускладнення COVID-19. Смертність хворих на COVID-19 з ГРДС коливається від 23 до 56% [23]. Індукований COVID-19 ГРДС є основною причиною госпіталізації до відділень інтенсивної терапії. Лікування ГРДС потребує більш тривалого перебування в стаціонарі, сучасного медичного обладнання та медикаментозної терапії. Ризики розвитку ГРДС, спричиненого COVID-19, є багатофакторними, але вони зазвичай пов'язані з похилим віком та наявністю супутніх захворювань, таких як цукровий діабет, серцеві захворювання, хронічні обструктивні захворювання легень та коагулопатії. Інші фактори ризику включають ожиріння, куріння та прийом імунодепресантів.

ГРДС при COVID-19 є складним медичним станом, що виникає внаслідок запалення легень, зумовленого інфекцією вірусом SARS-CoV-2. Цей стан може виникнути внаслідок поширення запалення з нижчих ділянок легенів до альвеолярних просторів, що може призвести до порушення обміну газами та зменшення оксигенізації організму. Навіть потужні фактори регуляції згортання крові, якими володіє організм, у гострій фазі ГРДС перестають функціонувати оптимально, що все більше і більше ускладнює процеси запалення та коагуляції, що викликає пошкодження клітин [24].

Під час ГРДС набуває особливого значення вивчення взаємодії між вірусом та організмом хазяїна, включаючи вплив імунологічних, васкулярних та молекулярних механізмів на розвиток важкого респіраторного захворювання. Найчастіше ГРДС розвивається на фоні вірусної/бактеріальної пневмонії. Цікаво те, що порушення у системі гемостазу, індуковане ГРДС при COVID-19, володіє багатофакторними особливостями та значно підвищує ймовірність летальних наслідків. Зокрема, було виявлено три характерних ознаки ускладнення цього процесу у пацієнтів, які хворіли COVID-19 та в результаті мали летальні наслідки: важке пошкодження ендотелію, що

супроводжується руйнуванням мембран ендотеліальних клітин, тромбоз судин з мікроангіопатією та інвагінальний ангиогенез [25].

Патогенез ураження легень, спричиненого COVID-19, включає пряме вірусне ураження та захисну реакцію організму з тромботичними та запальними реакціями в легенях та інших органах [26]. Альвеолярний епітелій та ендотелій судин експресують АПФ-2, до якого приєднується вірус, а потім інтерналізується разом із мембранозв'язаним АПФ-2. Внаслідок цього виникає пошкодження клітин, яке еволюціонує в інтерстиціальний набряк і заповнення альвеол рідиною, подібно до процесу альвеолярного набряку при ГРДС. Дані аутопсії, що відображають розвинену хворобу, виявляють типові ознаки ГРДС, включаючи ексудативно-проліферативну та фібротичну фази дифузного пошкодження альвеол, гіалінові мембрани, альвеолярний та інтерстиціальний набряк, атипичну гіперплазію пневмоцитів, альвеолярні крововиливи, інфаркт, ушкодження ендотеліальних клітин, а також закупорку капілярів з мікротромбозом і розширенням [27].

Слід зазначити, що при COVID-19 та ранній гострій респіраторній вірусній інфекції (ГРВІ) спостерігається більша васкулопатія, включаючи макро- та мікротромбози, пошкодження ендотеліальних клітин, розширення судин та аберантний ангиогенез [25–27], ніж при грипі H1N1 та пізніх стадій ГРВІ [28]. Однак біопсії легень на початку COVID-19 [29-30] не показують вираженої судинної патології, що відзначається при розтині. Обмежені дані бронхоальвеолярного лаважу демонструють переважання моноцитів і лімфоцитів у повітряному просторі, характерне для вірусних пневмоній [31], порівняно з переважанням нейтрофільних клітин при ГРДС [32]. Розуміння респіраторної патофізіології ураження легень, спричиненого COVID-19, та ГРДС має фундаментальне значення для покращення клінічної допомоги та підтримки.

Пацієнти, у яких діагностовано ГРДС на фоні COVID-19, можуть мати як нормальні, так і атипичні еластичні властивості легень, що не характерно для

класичного поширення цього процесу. Хворих на COVID-19 з ознаками ГРДС поділяють на три групи залежно від фізіологічного стану людей – легка, помірна та важка форма ураження [33].

Дослідження ГРДС, що виникає на фоні інфікування SARS-CoV-2, ще тривають, і питання в тому, чи пацієнти, які хворіють на COVID-19, мають аналогічну патофізіологію для “типового” РДС, залишається відкритим. Головним фактором індукції зазначеного процесу при інфікуванні SARS-CoV-2 вважається цитокіновий шторм, що суперечить протоколу діагностики ГРДС, викликаного іншими захворюваннями. Початок ГРДС, пов’язаного з COVID-19, складає від 8 до 12 днів [34], однак берлінський критерій – 7 днів [33].

На основі Берлінського визначення діагноз ГРДС вимагає наявності таких характеристик: прогресування легневих симптомів протягом тижня, двосторонні легневі інфільтрати (при рентгенологічному дослідженні) без будь-яких інших пояснень, відсутність серцевої недостатності/гіперволемії та порушення функції оксигенації (при рівнях позитивного тиску наприкінці видиху (positive end-expiratory pressure, PEEP) 5 мм рт. ст.) на будь-якому з трьох етапів: 1) легкий ГРДС з $[PaO_2/FiO_2] = 201-300$ мм рт. ст., 2) помірний ГРДС з $[PaO_2/FiO_2] \leq 200$ мм рт. ст. і 3) тяжкий ГРДС у випадках $[PaO_2/FiO_2] < 100$ мм рт. ст. [35].

Патофізіологія гострого респіраторного синдрому та ураження легень, спричиненого COVID-19, має багато спільних аспектів: зниження податливості легеневої паренхіми, васкулопатія, альвеолярний набряк та порушення газообміну, що виникають як внаслідок прямих інфекційних причин, так і неінфекційних ушкоджень. Надмірна захисна запальна реакція організму призводить до пошкодження ендотеліальних та епітеліальних клітин і втрати нормального щільного альвеолярно-капілярного бар'єру та його здатності підтримувати сухість альвеолярного простору для ефективного газообміну. Різноманітний ступінь ураження регіональних областей створює

стресові чинники для оточуючих тканин легенів, що може ще більше погіршити пошкодження при використанні механічної вентиляції та, можливо, при активних спонтанних дихальних зусиллях. Хоча можуть існувати певні відмінності між ГРДС та пошкодженням легень, спричиненим COVID-19, в аспектах легеневого комплаєнсу, легневих судинних реакцій, а також відчуття гіпоксії та реакцій, які лежать в основі феномену "тихої гіпоксемії", залишаються значні суперечки щодо того, чи є вони дійсно відмінними та достатньо важливими для того, щоб виправдати різні стратегії надання допомоги. Патолофізіологічні особливості обох пошкоджень легень мають важливі наслідки для підтримуючої терапії, і є надія, що фармакологічна терапія може знизити смертність і покращити функціональні результати [36].

1.2. Система гемостазу при COVID-19

Гемостаз – це складний процес, спрямований на забезпечення нормальної кровотечі та уникнення надмірної втрати крові внаслідок пошкодження судин. Це процес, який включає кілька взаємопов'язаних етапів. Механізм гемостазу можна розділити на чотири основні етапи:

- 1) Звуження кровоносної судини.
- 2) Утворення тимчасової «тромбоцитарної пробки».
- 3) Активація коагуляційного каскаду.
- 4) Утворення «фібринової пробки», або остаточного згустку.

Цей згусток ущільнює пошкоджену ділянку, контролює та запобігає подальшій кровотечі, поки відбувається процес регенерації тканин [37]. Коли рана починає загоюватись, пробка повільно перебудовується і з часом розчиняється з відновленням нормальної тканини на місці пошкодження.

Наукові дослідження вказують на два потенційних механізми, які можуть призвести до активації коагуляційного каскаду в контексті захворювання COVID-19:

1. гострий запальний процес та цитокиновий шторм, зумовлений ГРДС;
2. специфічні вірусні механізми.

Проникнення в організм SARS-CoV-2 стимулює імунну відповідь, яка пов'язана з нагромадженням прозапальних цитокінів, активацією мононуклеарних та ендотеліальних клітин, що опосередковує експресію тканинного фактору (tissue factor, TF), який супроводжує запуск коагуляційного каскаду та тромбоутворення внаслідок дисфункції системи гемостазу при COVID-19. Патологічний дисбаланс функціонування ендотеліальних клітин, спричинений циркуляцією SARS-CoV-2 в організмі, викликає збільшення продукції тромбіну та зупинку фібринолізу, що призводить до стану гіперкоагуляції [38].

Існує декілька механізмів, за допомогою яких інфекція SARS-CoV-2 може призвести до мікросудинного та макросудинного тромбозу, включаючи цитокиновий шторм з активацією лейкоцитів, ендотелію та тромбоцитів, щ підвищення регуляції TF, активації коагуляції, утворення тромбіну та фібрину [39], порушення гемостазу з дисбалансом інгібітора активатора плазміногену-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), інгібітора шляху тканинного фактора (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) та активованого ПС, який сприяє утворенню фібрину та обмежує фібриноліз, гіпоксична вазооклюзія та прямі вірусні ефекти з активацією клітин.

Варто підкреслити, що численні дослідження підтверджують: білкові частинки SARS-CoV-2 можуть безпосередньо взаємодіяти з каскадом комплементу та коагуляції. Зокрема, шипоподібний білок SARS-CoV-2 здатний активувати протеолітичний процесинг С3-компоненту комплементу, що призводить до утворення С3а та С3b з наступним розщепленням С5-компоненту на С5а та С5b. Зазначається, що С3а та С5а – відомі індуктори

продукції запальних цитокінів, які викликають пошкодження легеневої тканини, а структурні зміни клітинних мембран спричиняють активацію тромбоцитів, що є важливим етапом утворення фібринового згустку [40].

У близько половини пацієнтів з важким перебігом COVID-19 виявляється коагулопатія. Коагулопатія часто визначається як будь-яке порушення гемостазу, що призводить до надмірної кровотечі або згортання крові, хоча найчастіше це визначається як порушення утворення тромбу [41].

Цей стан відрізняється від коагулопатії, характерної для ДВЗ-синдрому, підвищенням рівня фібриногену (зазвичай більше 1 г/л, у той час як у класичному ДВЗ цей рівень зазвичай менше 1 г/л), помірною тромбоцитопенією (кількість тромбоцитів зазвичай менше $50 \cdot 10^9/\text{л}$) та невеликим зростанням ПЧ до 1–2 секунд (на відміну від $>3–6$ секунд при ДВЗ [42]). У пацієнтів з COVID-19 тромбоемболічні ускладнення (ТЕУ), зокрема тромбоемболія легеневої артерії (ТЕЛА), виникають частіше порівняно з хворими на ГРДС без COVID-19 (відповідно, на 11,7% та 2,1%).

Сучасні дослідження виявляють наявність маркерів, що свідчать про високий ризик тяжкого перебігу COVID-19 та схильність до тромбозу. Серед виявлених аномалій у пацієнтів відзначається лімфопенія, лейкоцитоз, підвищення аланінамінотрансферазної та лактатдегідрогеназної активностей, вмісту високочутливого тропоніну I, сечовини та креатиніну у крові, подовження ПЧ, зниження концентрації фібриногену, підвищення значень прокальцитоніну, а також високі показники D-димеру [43].

Особливу увагу зосереджують на вимірюванні рівня D-димеру в крові пацієнтів. D-димер – це один із продуктів деградації нерозчинного фібрину. Встановлено, що цей показник корелює з критичним перебігом хвороби та вищою смертністю. Показано, що рівень D-димеру виявляється вищим у пацієнтів з важким перебігом COVID-19 порівняно з тими, у кого хвороба протікає легко. Таким чином, рекомендується госпіталізація для пацієнтів зі

значним зростанням рівня D-димеру ($y \geq 3-4$ рази), навіть якщо не виявлено вираженої симптоматики [44].

Поміж іншого відзначено, що D-димер виступає як показник відкладення фібрину у легенях. Дослідження іспанських медиків підтвердило, що пацієнти, у яких виявлено підвищені рівні D-димеру та С-реактивного білка, частіше потребували госпіталізації та переведення на штучну вентиляцію легень [45].

Ендотеліальні клітини поєднують і регулюють процеси системи гемостазу, фібринолізу та контролюють цілісність судинної стінки. Пошкодження ендотеліальних клітин, спричинене ураженням SARS-CoV-2, ускладнює згортання крові та ініціює розвиток тромботичних подій. Дисфункція ендотелію може бути викликана перш за все цитокиновим штормом, що активує потужний синтез прозапальних цитокінів, таких як IL-1, IL-6, TNF- α . Останні посилюють накопичення TF, що сприяє тромбозу мікросудин, включаючи закупорювання мікроциркулярного кровообігу легень та виникнення легеневої емболії, оскільки TF запускає зовнішній шлях коагуляційного каскаду і, як наслідок, відкладення фібрину у різних органах, включаючи бронхоальвеолярну систему. Зовнішній шлях складається з трансмембранного рецептора тканинного фактора (ТФ) і плазматичного фактора VII/VIIa (FVII/FVIIa), а внутрішній шлях складається з плазматичних FXI, FIX і FVIII. За фізіологічних умов ТФ конститутивно експресується адвентиційними клітинами, що оточують кровоносні судини, та ініціює згортання крові.

Крім того, на фоні COVID-19 спостерігається активація PAI-1 та пригнічення активатора плазміногену урокіназного типу (uPA), що блокує функціонування фібринолітичної системи. Наостанок, прозапальні цитокіни та пошкодження ендотелію призводять до активації та агрегації тромбоцитів, що сприяє формуванню тромбоцитарної пробки, яка згодом укріплюється полімерною фібриновою сіткою [46].

У пацієнтів, для яких характерна легка форма COVID-19, концентрація фібриногену та D-димеру значно зростала у гострій фазі запалення, але значення АЧТЧ, ПЧ, ТЧ та АТШ все ще були у межах норми. Усі обстежувані пацієнти одужали, та рівні зазначених показників після лікування поступово поверталися в норму [47]. Інше дослідження [46] підкреслює, що COVID-19 характеризується такими змінами процесів згортання крові, як зниження активності фібринолізу, поширенням мікротромбозів судин легень, та пов'язує такі події з розвитком ГРДС. Очевидно, зниження активності фібринолізу відіграє важливу роль у розвитку гіперкоагуляційного стану.

Активация коагуляційного каскаду призводить до посиленого синтезу протромбіну під час COVID-19. Протромбін спочатку підлягає посттрансляційній модифікації - вітамін К-залежному γ -карбоксилюванню глутамінових залишків, після чого перетворюється на тромбін за дії протромбінази, а безпосередньо тромбін забезпечує відщеплення фібринопептидів А та В від молекули фібриногену з утворення фібрин-мономерів з подальшим формуванням фібринового згустку. При коронавірусній хворобі також можливе порушення процесів модифікації протромбіну та його перетворення в тромбін з нагромадженням аномальних форм протромбіну, таких як протромбін, індукований відсутністю або антагоністами вітаміну К-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, PIVKA-II) [48].

Виокремлюють три стадії клінічної коагулопатії, що виникає за умови інфікування SARS-CoV-2. Перша стадія описується легко вираженими симптомами без потреби штучної подачі кисню чи іншої респіраторної допомоги, легким системним запальним процесом та легкою системною коагулопатією. На другій стадії у пацієнтів спостерігаються важкі симптоми, та часто необхідна додаткова подача кисню. Перебіг захворювання на цій стадії характеризується прогресуванням запалення легень та локальною коагулопатією зі зростанням числа мікротромбів. На третій стадії стан

пацієнтів ще більше погіршується, обов'язковою є штучна вентиляція легень та підтримка кровообігу. Цей етап описується сильною прозапальною реакцією, що супроводжується цитокиновим штормом, а також яскраво вираженою локальною та системною коагулопатією, часто спостерігається легенева емболія та тромбоз глибоких вен [49].

Повідомляється, що за розвитку патологічного коагуляційного процесу, індукованого SARS-CoV-2, можливе аномальне накопичення розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) у кровотоці. РФМК представляють собою комплекси молекул фібрин-мономеру з фібриногеном. За фізіологічної норми, РФМК присутні у кровотоці у мінімальній концентрації, адже постійно працює система фібринолізу, яка запобігає нагромадженню попереджує нагромадження фібринових згустків у судинах. Підвищені концентрації РФМК виявляються в усіх частинах тіла, наслідком чого може бути пошкодження різних типів клітин в організмі внаслідок спонтанної оклюзії ділянок мікроциркуляції. Вважається, що РФМК можуть бути більш зручним біомаркером розвитку тромбозів, ніж D-димер при COVID-19 [50].

Інфекція SARS-CoV-2 індукує зміни коагуляції і, у важких випадках, може викликати ДВЗ і тромботичні події, особливо в мікросудинах легень, що сприяє розвитку дисфункції в цьому органі [51]. Механізми, які призводять до цього клінічного прояву, до кінця не вивчені, але ймовірно, що інтенсивне вивільнення прозапальних цитокинів сприяє активації коагуляційного каскаду. У цьому сенсі під час цитокинового шторму, спричиненого інфекцією SARS-CoV-2, спостерігається значне вивільнення IL-1 та IL-6, а також TNF- α [52]. Найкраще здатність активувати коагуляцію описана для IL-6, який сприяє синтезу фібриногену, фактору VIII і TF [53]. Крім того, інфікування SARS-CoV-2 знижує кількість АПФ-2, що призводить до підвищення рівня ангіотензину II в плазмі крові, яке в свою чергу сприяє активації коагуляції та пригніченню фібринолітичної системи, що зумовлює розвиток протромботичного стану при COVID-19 [54–55]. Загалом, коагуляційні тести,

такі як АЧТЧ і ПЧ, як правило, вищі у симптоматичних пацієнтів з COVID-19, ніж у здорових осіб [56–57]. При цьому, хоча кілька досліджень вказують на те, що АЧТЧ і особливо ПЧ також значно вищі у пацієнтів, які померли, ніж у людей, які мали менш тяжкі випадки COVID-19, метааналіз показав, що результати, описані в літературі, дуже неоднорідні, що вимагає обережності та більшої кількості даних для встановлення чіткого взаємозв'язку між тяжкістю COVID-19 і значеннями ПЧ та АЧТЧ [58].

У пацієнтів із COVID-19, особливо з тяжким перебігом і тих, хто помер, також спостерігався підвищений рівень фібриногену плазми. Цей висновок суттєво відрізняється від того, що зазвичай спостерігається у випадках дисемінованої коагулопатії, асоційованої з сепсисом, за якої падіння рівня фібриногену асоціюється зі смертністю [59]. Крім того, коагулопатія, спричинена сепсисом, зазвичай характеризується більш вираженим подовженням часу згортання крові, ніж у випадках COVID-19 [58]. Таким чином, зміни в коагуляційному каскаді, спричинені COVID-19, видаються досить відмінними від цього захворювання.

Ще однією зміною, яка зазвичай спостерігається у пацієнтів із COVID-19, є збільшення активності та кількості фактора фон Віллебранда (von Willebrand factor, vWF). vWF – це циркулюючий адгезивний глікопротеїн, який сприяє агрегації тромбоцитів, бере участь у зортанні крові, утворюючи комплекс з фактором VIII, регулює ангиогенез та проникність судин. Рівень vWF підвищується при запаленні, старінні, діабеті та інших захворюваннях, пов'язаних з дисфункцією ендотелію [60–61]. Крім того, у пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 спостерігається зниження активності металопротеїнази ADAMTS-13 (від “a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs”, “дезінтегрин і металопротеїназа з тромбоспондиновим мотивом”), яка в нормі залучається у деградацію vWF через різні механізми, з підвищенням рівня їх інгібіторів. Більше того, відомо, що плазматичний розподіл

мультимерів vWF у цих пацієнтів подібний до такого у хворих на гостру тромботичну тромбоцитопенічну пурпуру [62].

1.3. Динаміка зміни антитіл до SARS-CoV-2 під час коронавірусної хвороби та одужання від COVID-19

Діагностика COVID-19 в основному базується на тестуванні навантаження РНК SARS-CoV-2 за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (RT-PCR) [63].

Однак, результати тестування залежать від багатьох факторів, зокрема місце взяття зразка, тип, якість, стан пацієнта, а також умови зберігання зразків. Таким чином, деякі особи, хворі на COVID-19, залишаються недіагностованими, якщо діагноз базується виключно на вірусному навантаженні [64]. З огляду на велику кількість хибнонегативних результатів визначення кількості вірусної РНК, згодом до протоколу діагностики та лікування було додано визначення специфічних до SARS-CoV-2 IgM та IgG, як альтернативні методи діагностики при підозрі на корона вірусну інфекцію. Виявлення антитіл є простішим і швидшим, ніж тестування на вірусне РНК-навантаження, тестові зразки є більш стабільними і їх легше зберігати [65]. Таким чином, тести на антитіла можуть стати важливим додатковим методом для діагностики COVID-19.

Крім того, генерація та підтримка нейтралізуючих антитіл проти SARS-CoV-2 відіграють важливу роль у протистоянні інфікуванню з боку хазяїна [66]. SARS-CoV-2 належить до роду *Betacoronavirus* родини *Coronaviridae*. Частина коронавірусу організовані з довгих полімерів РНК, щільно упакованих у центрі частини і оточених захисним капсидом, який являє собою решітку з повторюваних білкових молекул, що називаються білками оболонки або капсидними білками. У коронавірусі ці білки називаються нуклеокапсид (N). Ядро частинки коронавірусу далі оточене зовнішньою мембранною

оболонкою, що складається з ліпідів (жирів) із вставленими білками. Ці мембрани походять з клітин, в яких вірус був востаннє зібраний, але модифіковані, щоб містити специфічні вірусні білки, включаючи шип (S), мембрану (M) і білки оболонки (E). Білок S складається з субодиниць S1 та S2, причому субодиниця S1 відповідає за зв'язування між вірусом і рецепторами клітини-хазяїна. Вона містить рецептор-зв'язувальний домен (receptor-binding domain, RBD), який взаємодіє з клітинами людини, що експресують АПФ-2, та індукує проникнення вірусу в клітину [66]. Нейтралізуючі антитіла часто націлені на RBD білка S, щоб заблокувати взаємодію між вірусом і рецептором хазяїна [67], а антитіла проти S-протеїну, особливо RBD SARS-CoV-2, слугують мішенню для розробки вакцин та терапії [68].

Нещодавні дослідження повідомили про значний прогрес у розробці терапії COVID-19 та вакцин на основі білка S або RBD. Зокрема, Chi et al. виділили та охарактеризували нейтралізуюче моноклональне антитіло, що зв'язується з S-протеїном SARS-CoV-2 від десяти пацієнтів, які одужали від COVID-19. Dai et al., у свою чергу, повідомили про універсальний дизайн бетакоронавірусних вакцин на основі структури RBD-димеру проти COVID-19, близькосхідного респіраторного синдрому та тяжкого гострого респіраторного синдрому [69–72].

Метою одного із досліджень, які провели вчені із Китаю, було дослідити часові динамічні зміни імунної відповіді після інфікування SARS-CoV-2, та проаналізувати рівні загальних антитіл, а також S-, RBD-, N-специфічних антитіл у різні часові періоди після появи симптомів [73–76].

Рівень загального IgM був відносно низьким протягом першого тижня і поступово підвищувався до 5-го тижня, після чого відбувалося безперервне зниження до початкового значення. Вміст загального IgG був вищим, ніж IgM, протягом першого тижня і безперервно підвищувався до 5-го тижня, утримувався на такому ж рівні до 7-го тижня, а потім поступово знижувався, починаючи з 8-го тижня, але все ще був значно підвищеним наприкінці

періоду спостереження (12-й тиждень). Відповідно до попередніх спостережень [77], рівень IgG швидко зростає протягом ранньої фази інфекції. Крім того, в даному дослідженні було виявлено, що рівень S- та RBD-специфічних IgG був значно вищим у пацієнтів, які одужали від COVID-19 і були негативними до SARS-CoV-2, що вказує на те, що антитіла відіграють важливу роль у вірусному кліренсі. Нижчі рівні S-, RBD- та N-IgG були асоційовані з нижчим відсотком лімфоцитів, вищим відсотком нейтрофілів та довшою тривалістю вірусного навантаження. Важливо, що пацієнти, які мають низький рівень антитіл на момент одужання, можуть мати високий ризик повторного виявлення РНК SARS-CoV-2 при проведенні полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією, що демонструє прогностичне значення рівня антитіл для виписаних пацієнтів після перенесеного COVID-19. Загалом, ці результати свідчать про те, що ці IgG, особливо S-специфічні та BD-специфічні, відіграють важливу роль у вірусному кліренсі та одужанні пацієнтів з коронавірусною інфекцією.

1.4. Гематологічні та біохімічні показники у пацієнтів після одужання від COVID-19

Після перенесеного COVID-19 пацієнти, які одужали, можуть продовжувати повідомляти про різноманітні скарги. Період одужання, ймовірно, буде довшим у тих пацієнтів, які перенесли важку форму хвороби та у тих, хто мав попередні захворювання. Багато пацієнтів відчують занепокоєння і звертаються до медичного центру для пост-обстеження після одужання. Однак не всі вони мають клінічні показання для лабораторних або радіологічних досліджень після одужання.

Попередні дослідження показали, що такі клінічні ознаки, як ж лихоманка, кашель, біль у горлі або втома, можуть зберігатися або повторюватися у пацієнтів, які одужали [78–79].

Підвищення рівня аланінамінотрансферази в сироватці крові в 36,7% у пацієнтів, які одужали, було виявлено в дослідженні вчених з Непалу [80]. Ступінь підвищення був помірним. Ураження печінки є загальновизнаною ознакою інфекції SARS-CoV-2, і це пов'язане з прямим впливом вірусу на гепатоцити та (або) епітелій жовчовивідних шляхів, пошкодженням печінки, пов'язаним із посиленою імунною відповіддю, медикаментозною токсичністю, гемодинамічною нестабільністю та ішемічним гепатитом, який може виникнути при інфікуванні SARS-CoV-2 [81–83].

Підвищення рівня трансаміназної активності сироватки крові після одужання від COVID-19 слід розглядати як поствірусний ефект, і подальше обстеження не потрібне, якщо антитіла до SARS-CoV-2 є позитивними. Однак, точну тривалість підвищення активності ферментів слід вивчати у подальших дослідженнях.

Сироваткові маркери запалення, такі як С-реактивний білок, феритин і лактатдегідрогеназна активність, були підвищені у 12% пацієнтів, що одужали. Ступінь підвищення цих маркерів був незначним. С-реактивний білок є важливим регулятором запальних процесів, оскільки він модулює імунну відповідь через індукцію протизапальних цитокінів та обмеження вільнорадикального пошкодження [84]. Багато цитокінів швидко виробляються під час активної вірусної інфекції, що стимулює гепатоцити та макрофаги до секреції феритину [85]. Лактатдегідрогеназа – це внутрішньоклітинний фермент, який міститься майже в усіх системах органів. Аномальні значення його сироваткової активності бути наслідком поліорганного ураження, включаючи легені, та зниження оксигенації. Ці запальні лабораторні показники були пов'язані з гіршими у пацієнтів з інфекцією SARS-CoV-2 [86–87].

Антитіла IgG до SARS-CoV-2 були виявлені у 98,7% пацієнтів, що одужали. Про аналогічні результати повідомлялося у двох більш масштабних дослідженнях, проведених в Ісландії та Іспанії [88].

Таким чином, різні біохімічні та гематологічні відхилення можуть зберігатися після одужання від COVID-19. Помірне підвищення активностей печінкових ферментів та вмісту маркерів запалення у сироватці крові, а також збільшення кількості клітин та морфологічні зміни в лейкоцитарній ланці крові після одужання від COVID-19 у легких та середньотяжких випадках слід розцінювати як поствірусний ефект. Подальше дослідження цих порушених параметрів у пацієнтів, які одужали, необхідне лише в тому випадку, якщо вони мають тенденцію до зростання, або якщо пацієнт має будь-яке хронічне захворювання, або антитіла до SARS-CoV-2 відсутні. Це особливо важливо для пацієнтів, які одужали від COVID-19 і пізніше виконали лабораторний тест з іншої причини. Точний час, протягом якого зростають ці показники та триває захисний ефект від антитіл, слід вивчати у подальших дослідженнях.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика дослідних груп донорів

У даному дослідженні брали участь люди, які перехворіли на COVID-19 та після повного одужання погодилися стати донорами плазми крові для біотехнологічних цілей у ТОВ "БІОФАРМА-ПЛАЗМА" (Київ, Україна). На момент забору крові всі учасники були здорові. Вік донорів коливався від 25 до 45 років. Плазма крові була зібрана у донорів, які одужали від COVID-19 3-6 місяців тому. Перед використанням плазми крові для виробництва цільових біотехнологічних препаратів донорів перевіряли за допомогою скринінгових тестів. Плазма крові донорів була передана нам з визначеними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG для наукових досліджень.

Титри анти-SARS-CoV-2 IgG у плазмі крові визначали за допомогою хемілюмінесцентного мікрочастинкового імуноферментного аналізу (Abbott Laboratories, Abbott Park, Іллінойс, США) відповідно до інструкцій виробника. Всі донори були відібрані на основі титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. Ми мали групи донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG: 0 (n = 20); 10 ± 3 (n = 20); 55 ± 5 (n = 20); 65 ± 5 (n = 20); 75 ± 5 (n = 20); 85 ± 5 (n = 20); 95 ± 5 (n = 20); 125 ± 5 (n = 20); 175 ± 5 (n = 20) Індекс (S/C). З дослідження були виключені особи з тяжкими серцево-судинними та цереброваскулярними захворюваннями, дефіцитом вітаміну К, травматичними порушеннями згортання крові, особи, які приймають антикоагулянтну терапію, а також особи з іншими захворюваннями, що можуть впливати на систему гемостазу.

Усі донори добровільно погодилися на участь у дослідженні та надали письмову інформовану згоду. Дослідження було узгоджено комітетом з питань біоетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

2.2. Реагенти та матеріали

У роботі було використано наступні реактиви та матеріали: цитрат натрію, 0,1 М фосфатний буфер (pH 7,0), 0,04 М моноіодоцтова кислота, 1,5 % розчин оцтової кислоти, 0,78 % розчин о-фенантроліну, 0,05 М трис-НСІ буфер (pH 7,4), Tween-20, 5 % розчин знежиреного молока, поліклональні антитіла для імунодетекції молекул протромбінового пулу, о-фенілендіамін, бензамідин, ЕДТА (Ethylenediaminetetraacetic acid, етилендіамінтетраоцтова кислота), акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, ТЕМЕД (N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін) (GE Healthcare AB, Швеція), акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, DAB (diaminobenzidine, діамінобензидин) та pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate, пара-нітрофенілфосфат) (Sigma, Німеччина), β-меркаптоетанол, BAPNA (Nα-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, Nα-бензоїл-L-аргінін 4-нітроанілід гідрохлорид) (Sigma-Aldrich, США), хромогенні субстрати, реагенти для проведення хронометричних тестів та плазмикалібратори ("РенаУ", Україна), маркери молекулярної маси білків для електрофорезу (Prestained Protein Ladder) (Fermentas, Литва), протеїн А сефароза (Amersham Biosciences, AB, Швеція), реагенти Dade Actin та Dade Trombin (Siemens, Німеччина).

Антитіла для імунодетекції PAI-1, тканинного активатора плазміногена (tissue-type plasminogen activator, tPA). Антитіла, кон'юговані з лужною фосфатазою (Bio-Rad Laboratories, США). Реактиви для забарвлення електрофоретичних гелів (GE Healthcare AB, Швеція).

Хімічні реактиви вітчизняного виробництва, такі як солі, кислоти та луки були кваліфікації «чда» та «хч».

2.3. Обладнання

У роботі використовували апарат для препаративного вертикального диск-електорофорезу (BioRad, USA), хроматограф середнього тиску (BioLogic DuoFlow, BioRad, USA), спектрофотометр (SmartSpec Plus, BioRad, USA), мікропланшетний спектрофотометр (μ Quant BioTek Instruments, BioTek, USA), автоматичний хемілюмінесцентний імуноаналізатор (Maglumi 1000, Snibe Co., Ltd., China), автоматичний аналізатор гемостазу Sysmex CS-2000i (Sysmex Corporation, Japan), центрифуга CM-6M (ELMI, Латвія), центрифуга Allegra (Beckman Coulter, США).

Магнітні мішалки, вортекс, піпетки автоматичні, термостати, шейкери тощо є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу, епендорфи, пробірки та інше) отримано від фірми Sente-Lab. Скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

2.4. Визначення активованого часткового тромбoplastинового часу плазми крові

АЧТЧ є маркером внутрішнього шляху зсідання крові. Даний показник вимірювали на коагуляційному аналізаторі Sysmex CS-2000i з використанням реагенту Dade Actin (Siemens, Німеччина). Принцип методу визначення АЧТЧ полягає в тому, що фактори внутрішнього шляху системи згортання крові активуються при інкубації плазми з кількістю фосфоліпідів (кефалінів) та поверхневого активатора (каолін). Додавання іонів кальцію запускає процес

коагуляції, після чого вимірюється час згортання. Детекцію проводили відповідно до інструкцій виробника та результати виражали в секундах.

2.5. Визначення тромбінового часу зсідання плазми крові

ТЧ є маркером кінцевого (загального) етапу зсідання крові. Даний показник вимірювали на коагуляційному аналізаторі Sysmex CS-2000i з використанням реагентів Dade Trombin (Siemens, Німеччина). Принцип методу полягає в тому, що фермент тромбін перетворює розчинний білок плазми крові фібриноген у його нерозчинний полімер – фібрин. Час згортання розведеної плазми обернено пропорційний концентрації фібриногену в плазмі. Застосовуючи вказаний принцип, Клаусс розробив просту методологію визначення рівня фібриногену, яка ґрунтується на вимірюванні часу згортання розведеної плазми після додавання тромбіну. Отриманий час згортання в подальшому порівнюється з часом згортання стандартизованого препарату фібриногену. Детекцію проводили відповідно до інструкцій виробника та результати виражали в секундах.

2.6. Визначення активності антитромбіну III в плазмі крові

АТIII є маркером системи згортання крові. Для визначення активності АТIII плазму розводили 1:30 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 7,4). Додавали тромбін з гепарином у кінцевій концентрації 0,2 МО. Залишок тромбіну вимірювали за допомогою хромогенного субстрату S₂₂₃₈ у кінцевій концентрації 3 мМ. Як реактиви використовували ліофілізовані комерційні препарати (РЕНАУ, Україна). Оптичну густину зразків вимірювали при

довжині хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі BioTek Instruments, Inc. Активність АТІІІ розраховували за кількістю вивільненого пара-нітроаніліну, яка була обернено пропорційна активності АТІІІ у зразку плазми та виражали у % по відношенню до контрольної групи.

2.7. Визначення концентрацій антитромбіну ІІІ в плазмі крові

Для початку фракції АТІІІ отримували методом афінної хроматографії гепарин-сефарозі з використанням хроматографа BioLogic DuoFlow (Bio-Rad, США) на колонці з гепарин-сефарозою. Врівноваження колонки та нанесення зразків проводили 0,1 М трис-НСl буфером, 0,01 М натрій цитратним буфером (рН 7,4), що містив 0,225 М NaCl, потім колонку промивали 0,1 М трис-НСl, 0,01 М натрій цитратним буфером (рН 7,4), що містив 0,33 М NaCl. Елюювання проводили 0,1 М трис-НСl, 0,01 М натрій цитратним буфером (рН 7,4), що містив 2 М NaCl. Стабільна швидкість потоку становила 3 мл/хв. Концентрацію АТІІІ визначали за допомогою методу Бредфорда [89]. Для калібрування колонок використовували стандартні речовини-маркери з відомою молекулярною масою. Перевірку чистоти фракцій АТІІІ проводили методом диск- електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію за методом Лемлі. Концентрацію АТІІІ виражали в мг/мл.

2.8. Визначення активності протеїну С у плазмі крові

Для визначення активності ПС у плазмі крові активатор ПС додавали по 50 мкл до зразків згідно з інструкціями виробника. Хромогенний субстрат S₂₃₆₆ додавали до суміші у кінцевій концентрації 3 мМ. Як реактиви

використовували ліофілізовані комерційні препарати (РЕНАУ, Україна). Оптичну густину зразків вимірювали при довжині хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі BioTek Instruments, Inc. Активність протеїну С розраховували за кількістю вивільненого пара-нітроаніліну, яка була прямо пропорційна активності протеїну С у зразку плазми [90], та виражали у % по відношенню до контрольної групи.

2.9. Метод імуноферментного аналізу в дослідженні показників гемостазу

Методом імуноферментного аналізу (ІФА) у даній роботі були виміряні наступні показники: вміст протеїну С, тромбомодуліну, плазміногену, інгібітора активатору плазміногену-1, тканинного активатору плазміногену, молекул протромбінового пулу.

На мікропланшети для ІФА наносили зразок донорської плазми, розведений 1:100 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 7,4), та інкубували при 37°C протягом 1 години. Мікропланшети промивали 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 7,4), що містив 0,1% твіну-20, потім покривали 3% розчином знежиреного сухого молока для блокування будь-яких вільних ділянок зв'язування та інкубували протягом ночі. Мікропланшети знову промивали та додавали поліклональні антитіла (Sigma-Aldrich, США) проти цільових антигенів та інкубували при 37°C протягом 1 години. Після чого мікропланшети відмивали та інкубували з відповідними вторинними антитілами (Sigma-Aldrich, США), кон'югованими з пероксидазою хрому при 37°C протягом 1 години. Реакцію візуалізували за допомогою субстрату пероксидази хрому (о-фенілендіамін та пероксид водню). Реакцію зупиняли 2,5 М Н₂SO₄. Оптичне поглинання вимірювали за допомогою мікропланшетного спектрофотометра (μQuant

BioTek Instruments, BioTek, США) при довжині хвилі 492 нм. Концентрацію досліджувальних показників виражали в ум.од./мл.

2.10. Визначення концентрації фібриногену в плазмі крові

Визначення концентрації фібриногену здійснювали спектрофотометрично відповідно до методу [91]. У скляну пробірку додавали 0,2 мл плазми, 1,7 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7, 0,1 мл тромбіну (2 NIH) та 0,1 мл 0,04 М монойодоцтової кислоти. Скляною паличкою суміш перемішували ретельно і ставили у термостаті при 37°C протягом 30 хв. Сформований згусток фібрину викручуванням на паличку виймали. Після цього згусток на паличці промивали декілька разів холодним розчином 0,13 М NaCl, фільтрувальним папером видаляли надлишок рідини. У 5 мл 1,5% розчину оцтової кислоти розчиняли одержаний згусток.

Спектрофотометрично встановлювали концентрацію білка за довжин хвилі 280 та 320 нм.

Концентрацію фібриногену у плазмі крові розраховували відповідно до формули:

$$\Phi = (E_{280} - E_{320}) 255 / 1,506, \quad (2.1)$$

де Φ – концентрація фібриногену, г/л; 255 – коефіцієнт перерахунку концентрації фібриногену в об'ємі зразка на його концентрацію в плазмі; 1,506 – коефіцієнт екстинкції поглинання 1% розчину фібрину у кислому середовищі за довжини хвилі 280 нм. Концентрацію фібриногену виражали у мг/дл.

2.11. Визначення концентрації розчинних фібрин-мономерних комплексів в плазмі крові

Концентрацію РФМК встановлювали з використанням о-фенантролінового тесту [91]. Дана методика визначення базується на оцінці часу появи у досліджуваній плазмі фібринових часток після додавання 0,78% розчину о-фенантроліну (1:1). Результати оцінювали напівкількісно за часом від моменту додавання о-фенантроліну до початку появи перших частинок і за формою осаду: дрібні частинки – 0,035 мг/мл (1 у.о.), пластівчаста муть – 0,07 мг/мл (2 у.о.), пластівці, нитки – 0,105 мг/мл (3 у.о.), гелеподібний осад – 0,14 мг/мл (4 у.о.).

Потім здійснювали подальше доочищення отриманих комплексів промиванням 0,9% розчином NaCl. З цією метою спочатку РФМК осаджували центрифугуванням при 3000 g протягом 10 хв., потім додавали 0,9% розчин NaCl до осаду у об'ємі, що дорівнював початковому внесеному об'єму плазми крові. Ретельно перемішували проби та знову центрифугували (3000 g, 15 хв.). Тричі повторювали процедуру відмивки. Для майбутньої роботи зливали надосадову рідину, а 1 М КОН додавали до утвореного при центрифугуванні осаду. Результати виражали в мкг/мл.

2.12. Аналіз якісного складу фракцій розчинних фібрин-мономерних комплексів та виділення вітамін К-залежних білків (фракцій) методом хроматографії, що поділяє за розміром

Розділення фракцій РФМК та фракцій вітамін К-залежних білків здійснювали методом хроматографії, що розподіляє за розміром, застосовуючи хроматограф BioLogic DuoFlow, BioRad, на колонці HiLoad

16/60, Superdex 200 pg. Для аналізу якісного складу фракцій розчинних фібрин-мономерних комплексів аліквоти об'ємом в 1 мл наносили на колонку з відповідним носієм в 0,05 М Трис-НСІ буфері, рН 7,4, з додаванням 130 мМ NaCl. Стабільна швидкість нанесення складала 0,75 мл/хв. Для калібрування колонки використовували стандартні маркерні речовини з відомою молекулярною масою.

Фракції вітамін К-залежних білків отримували з плазми крові методом сорбування вітамін К-залежних білків на сірчаноокислому бар'ї з розрахунку 120 г BaSO₄ на 1 л плазми. Інкубували проби на льоду протягом 60 хв, кожні 10 хв перемішуючи обережно. Центрифугували суміш при 2 000 g протягом 15 хв. Елюцію протромбінового пулу здійснювали за допомогою 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містить 200 мМ NaCl, 20 мМ ЕДТА та 10 мМ бензамідин [94].

Контроль якості виділених фракцій вітамін К-залежних білків проводили методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (ДСН) відповідно до методу Лемлі [95].

2.13. Визначення концентрації D-димерів у плазмі крові

Визначення концентрації D-димерів проводили, використовуючи прилад Maglumi 1000. В основі тесту на D-димери лежить імунохемілюмінесцентний аналіз за типом сендвіча. Реакційна суміш складалась зі зразку, буферного розчину та магнітних мікросфер, що вкриті моноклональним антитілами до анти-D-димерів, суміш ретельно перемішували й інкубували при температурі 37°C, утворені імунокомплекси за типом «сендвіча» в подальшому осаджувались в магнітному полі, після цього зливали супернатант і виконували цикл відмивання. Потім додавали стартери 1 і 2 для запуску

швидкої хемілюмінесцентної реакції. Інтенсивність світлового сигналу, що є пропорційною до концентрації D-димерів у досліджуваному зразку (або в калібраторі/контрольному зразку) вимірювали фотоелектронним помножувачем упродовж 3 секунд у відносних світлових одиницях (BSO).

Аналізатор автоматично розраховує концентрацію D-димерів у кожному зразку на підставі калібрувальної кривої, яка будується за методом двоточкового калібрування й референсною кривою. Одиницею вимірювання є мкг ФЕО/мл (мікрограми фібриноген-еквівалентних одиниць на мілілітр) [92].

2.14. Визначення протромбінового часу плазми крові та міжнародного нормалізованого відношення плазми крові

ПЧ вимірювали на коагуляційному аналізаторі Sysmex CS-2000i з використанням реагенту Dade Innovin Reagent. Реагент Dade® Innovin® виготовлений з очищеного рекомбінантного ТФ людини, отриманого з *E. coli*, у поєднанні з синтетичними фосфоліпідами (тромбопластином), кальцієм, буферами та стабілізаторами. Реагент ініціює згортання крові зовнішнім та загальним шляхами.

Принцип методу полягає в тому, що коагуляційний каскад активується шляхом інкубації плазми з оптимальною кількістю тромбопластину та кальцію, а потім вимірюється час згортання.

МНВ (мкг ФЕО/мл) визначали згідно з наведеною нижче схемою:

$$\text{МНВ} = (A)^{\text{МІЧ}}, \text{ де } A = \frac{\text{ПЧ досліджуваний}}{\text{ПЧ контрольний}}, \quad (2.2)$$

де МІЧ – це міжнародний індекс чутливості використаного тромбопластину, що зазначається у інструкції набору реагентів.

2.15. Визначення потенційної активності молекул протромбіну в плазмі крові

Для визначення потенційної активності молекул протромбіну в плазмі крові, як екзогенний активатор для активації протромбіну ми використовували екамулін з отрути змії *Echis multisquamatus*. Плазму розводили 1:10 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 7,4). До кожного зразка додавали 20 мкл екамуліну. Утворення тромбіну вимірювали за допомогою хромогенного субстрату S₂₂₃₈ у кінцевій концентрації 3 мМ, результати виражали у % по відношенню до контрольної групи.

2.16. Визначення потенційної активності плазміногену в плазмі крові

Потенційну активність плазміногену вимірювали за допомогою екзогенного специфічного ферменту, відомого як стрептокіназа. Плазму розводили 1 : 50 0,05 моль/л трис-НСІ буфером (рН 7,4). Стрептокіназу додавали у кінцевій концентрації 50 МО/мл стрептокінази. Хромогенний субстрат S₂₂₅₁ додавали у кінцевій концентрації 3 ммоль/л. Об'єм реакційної суміші з додаванням 0,05 моль/л трис-НСІ буфера (рН 7,4) становив 250 мл. Як реактиви використовували ліофілізовані комерційні препарати (РЕНАУ, Харків, Україна). Плазміноген здатний утворювати комплекс зі стрептокіназою, яка гідролізує хромогенний субстрат пептидів. Оптичну густину зразків вимірювали за довжини хвилі 405 нм на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, США). Кількість вільного пара-нітроаніліну прямо пропорційна потенційній активності плазміногену [96]. Кінцеві результати виражали у % по відношенню до контрольної групи.

2.17. Визначення потенційної активності тканинного активатора плазміногену в плазмі крові

Для визначення потенційної активності tAP в плазмі крові у робочі лунки вносили плазміноген у кінцевій кількості 25 мг. Еуглобулінову фракцію плазми крові додавали в об'ємі 25 мл. Полі-D-лізин додавали у кінцевій кількості 12,5 мг. Суміш інкубували протягом 5 хв. при 37° С. Потім додавали хромогенний субстрат S₂₂₅₁ у кінцевій концентрації 3 ммоль/л. Об'єм реакційної суміші з додаванням 0,05 моль/л трис-НСІ буфера (рН 7,4) становив 250 мл. Оптичну густину зразків вимірювали при 405 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра (BioTek Instruments, Inc.). Потенційну активність тканинного активатора плазміногену (tPA) визначали за допомогою калібрувальної кривої розчину tPA [97]. Кінцеві результати виражали у % по відношенню до контрольної групи.

2.18. Визначення інгібіторного потенціалу α_2 -антиплазміну в плазмі крові

Інгібіторний потенціал α_2 -АП вимірювали з використанням хромогенного субстрату S₂₂₅₁. В інкубаційне середовище послідовно вносили 0,05 М Трис-НСІ буфер, рН 7,4; 25 мкл плазми; 0,5 к.о./мл плазміну; та 3 мМ S₂₂₅₁. Інкубацію проводили протягом 2 – 5 хв. при 37° С. Об'єм інкубаційного середовища становив 250 мкл. Реєстрацію поглинання вивільненого п-нітроаніліну проводили у двохвильовому режимі за довжини хвилі 405 нм та 492 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів SmartSpec Plus через визначені проміжки часу. В плазмі практично здорових донорів активність α_2 -АП становила 80 – 110% [98]. Кінцеві результати виражали у % по відношенню до контрольної групи.

2.19. Визначення інгібіторного потенціалу α_2 -макроглобуліну в плазмі крові

Для визначення інгібіторного потенціалу α_2 -МГ в плазмі крові трипсин додавали до нерозведеної плазми у кінцевій кількості 0,1 мг. Суміш інкубували протягом 5 хв. при 37°C. Потім до реакції додавали розчин соєвого інгібітора трипсину в кінцевій кількості 0,03 мг, інкубували 5 хв. при 37°C. До реакційної суміші додавали BAPNA у кінцевій кількості 0,13 мг. Об'єм реакційної суміші з додаванням 0,05 моль/л трис-НСІ буфера (рН 7,4) становив 250 мл. Поглинання реєстрували при довжині хвилі 405 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра (BioTek Instruments, Inc.). Розрахунок інгібіторного потенціалу активності α_2 -МГ проводили в інгібіторних одиницях в 1 мл плазми крові (МО/мл), використовуючи формулу:

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

де D_{405}^{60} – збільшення оптичної щільності зразку за 60 хвилин; 2.73 – коефіцієнт перерахунку; 60 – час реакції; 0.01 – об'єм плазми крові.

2.20. Визначення інгібіторного потенціалу α_1 -антитрипсину в плазмі крові

Для визначення інгібіторного потенціалу α_1 -АТ в плазмі крові до плазми додавали трипсин у кінцевій кількості 0,1 мг у розведенні 1 : 10. Суміш інкубували протягом 5 хв. при 37°C. До реакційної суміші додавали BAPNA у кінцевій кількості 0,13 мг. Контролем слугував зразок без плазми крові. Об'єм реакційної суміші з додаванням 0,05 моль/л трис-НСІ буфера (рН 7,4) становив 250 мл. Оптичну густину визначали при довжині хвилі 405 нм за допомогою

мікропланшетного спектрофотометра (BioTek Instruments, Inc.). Розрахунок інгібіторного потенціалу α_1 -АТ проводили в інгібіторних одиницях в 1 мл плазми крові (МО/мл), використовуючи формулу:

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

де V_0 , V_s – швидкість гідролізу ВАРНА трипсином в контрольному та дослідному зразку; 2.73 – коефіцієнт перерахунку; 0.01 – об'єм плазми крові; 10 – коефіцієнт розведення.

2.21. Визначення концентрації білка методом Бредфорд

Кількість білка визначали за методом Бредфорд [89]. Для цього до 20 мкл проби додавали 10 мкл 10% NaOH, 70 мкл дистильованої води та 2 мл робочого розчину. Робочий розчин готували шляхом змішування 6 мл стокового розчину (який містив 10 мл 95% етанолу, 20 мл 85% H_3PO_4 , 35 мг кумасі діамантового синього), 3 мл 95% етанолу, 6 мл 85% H_3PO_4 , об'єм доводили дистильованою водою до 100 мл. Концентрацію білка в пробі вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 595 нм проти контрольної проби, яка замість проби містила дистильовану воду. Кількість білка в визначали за калібрувальним графіком і виражали у мкг/мл.

2.22. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфат натрію

Електрофоретичний аналіз білків проводили використовуючи метод диск-електрофорезу у 7,5-12% поліакриламідному гелі в присутності ДСН у системі Лемлі в денатуруючих умовах [95]. За необхідності, для відновлення дисульфідних зв'язків застосовували 5% β -меркаптоетанол. Електрофорез проводили у апараті для вертикального препаративного диск-електрофорезу (BioRad) у скляних пластинах завтовшки 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 35 мА для розділяючого гелів. Гелі фарбували 0,125% розчином кумасі G-250 у 25% ізопропанолі та 10% оцтовій кислоті. Відмивку від надлишку барвника проводили, використовуючи розчин 0,8% оцтової кислоти.

Використовували маркерну суміш білків з наступними молекулярними масами: 94 кДа (фосфорилаза В), 67 кДа (альбумін), 43 кДа (овальбумін), 30 кДа (ангідраза), 20,1 кДа (соевий інгібітор трипсину), 14,4 (лактальбумін) (GE Healthcare).

2.23. Статистична обробка результатів дослідження

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерних програм OriginLab Origin Pro 9.1 та Statsoft Statistica 10. Підраховували показники середньої арифметичної (M), середньої квадратичної помилки середньої арифметичної (m). Перевірку гіпотези нормального розподілу вибірки здійснювали за допомогою критеріїв Шапіро-Уїлка та Колмогорова-Смірнова. Було встановлено, що усі групи донорів підпорядковуються закону

нормального розподілу, тому відмінності між вибірками визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу. Достовірними вважались різниці при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз ключових параметрів системи зсідання плазми крові у людей, що перехворіли на COVID-19 і мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG у крові

Стан після COVID-19 (тривалий COVID-19) – це новий симптом у людей, які перехворіли на COVID-19 4-6 місяців тому. Зовнішніми ознаками цієї стадії є втома, м'язова слабкість та задишка [101]. У пацієнтів із тривалим перебігом COVID-19 можуть розвиватися тяжкі поліорганні дисфункції, такі як печінкова недостатність, легенева недостатність та гостре ураження нирок [102].

Крім того, вчені зосередилися на вивченні пошкоджень гемостазу після COVID-19, оскільки порушення коагуляції є чи не найбільшою загрозою для здоров'я людини. Щодо випадків у клінічній практиці, які стосуються тривалого гіперкоагуляційного статусу після COVID-19, на сьогодні недостатньо інформації. Механізми, що лежать в основі розвитку хронічної коагуляційної патології, вивчаються з метою виявлення факторів, які спричиняють дисбаланс у регуляції згортальної та антизгортальної систем. Кілька досліджень встановили наявність великих аномальних (амілоїдних) відкладень фібрин(оген)у в крові після перенесеного COVID-19 [103]. Відповідно, коагуляційний потенціал, зумовлений гострими запальними процесами, зберігається і після одужання від COVID-19. Таким чином, вивчення дисфункції природної антикоагуляційної системи набуває все більшої актуальності. Дослідження постковідних розладів повинні бути спрямовані на оцінку як коагуляційного, так і антикоагуляційного статусів у пацієнтів.

Розуміння процесу коагуляції починається з гемостазу та системи гемостазу. Циркуляція крові з тонко збалансованою в'язкістю є критично важливою для здорового функціонування організму [104]. У разі травми кровотеча повинна бути обмежена, а механізм, що забезпечує це, відомий як гемостаз [105]. Цей нормальний і пристосувальний процес є адаптивним, але може також надмірно активуватися, що призводить до неадаптивного порушення кровотоку. Наприклад, якщо в'язкість крові занадто висока, або якщо у кровоносних судинах є дефекти, можуть утворюватися тромби. Система управління цим балансом відома як система гемостазу, що складається з коагуляції, фібринолізу та тромбоцитів.

У здоровому організмі підтримується фізіологічний баланс між системами згортання та протизгортання крові. Викликані запальними реакціями на вірусні або бактеріальні захворювання, будь-які відхилення в обох системах можуть призвести до надзвичайно інтенсивного згортання крові або кровотечі. У протоколах лікування COVID-19 пацієнтам призначають антикоагулянти та антитромботичні засоби [106]. Однак відхилення коагуляції можуть зберігатися після одужання від COVID-19, що є потенційним фактором ризику тромбозу. Клінічних та наукових досліджень все ще недостатньо, щоб запобігти розвитку ускладнень гемостазу в пост-ковідному періоді. Аналіз ключових параметрів системи зсідання плазми крові у людей, які перехворіли на COVID-19 та мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG може надати інформацію про стан різних ланок системи гемостазу у пацієнтів після одужання.

Фізіологічний механізм антикоагуляції відіграє важливу роль у забезпеченні стабільності процесу утворення та розпаду фібринового згустку. Активація цього механізму призводить до зниження рівня тромбіну і, відповідно, перешкоджає накопиченню нерозчинного фібрину. У цьому процесі відіграють ключову роль три антикоагуляційні білки: АТІІІ, ТМ і ПС [107]. АТІІІ є найпотужнішим інгібітором серинових протеаз серед

антикоагуляційних білків, що взаємодіє з тромбіном, фактором Ха та ІХа, нейтралізуючи їхню активність [108]. АТШ – це дволанцюговий глікопротеїн, молекулярна маса якого становить 58,2 кДа, він циркулює в плазмі крові, його біосинтез відбувається в печінці. АТШ здійснює поступовий прогресуючий вплив на тромбін або на фактор Ха шляхом утворення еквімолярних комплексів, які видаляються з кровотоку через рецептор-опосередкований шлях. Реакція інгібування ферментів АТШ значною мірою залежить від присутності аніонних глікозаміногліканів, таких як гепарин і гепарансульфат. Дефіцит антитромбінової активності найчастіше супроводжується розвитком тромбозів глибоких вен.

До важливих регуляторних ключових елементів згортання крові належить складна багатofункціональна система ПС, яку розглядають як один із найбільш ранніх і швидких механізмів, що включаються в процес регуляції гемостазу при загрозі тромбоутворення. Активація системи згортання крові призводить до швидкого споживання основного компонента цієї ланки – ПС, що нині розглядається як один з основних показників розвитку тромбофілії. Активованій ПС є одним з основних білків антитромботичного регуляторного механізму, що функціонує як антикоагулянт, дія якого принципово відрізняється від специфічних інгібіторів факторів згортання крові та від системи фібринолізу.

ПС бере участь у інактивації тенази і утворенні протромбіназних комплексів, що є важливими для інгібування загального шляху згортання крові, подібно до АТШ. Важливо зауважити, що активація ПС можлива тільки за умови взаємодії тромбіну із ТМ. Активація ПС здійснюється комплексом тромбін-ТМ на фосфоліпідній мембрані клітин. ТМ є високоафінним рецептором тромбіну і виконує роль кофактора в процесі активації ПС. Він експресується в ендотеліальних клітинах судин, тромбоцитах, моноцитах, макрофагах. Зв'язування тромбіну з ТМ блокує прокоагулянтну активність тромбіну. Таким чином, ТМ діє як свого роду "перемикач" субстратної

специфічності тромбіну. Отже, ПС і ТМ є взаємозалежними антикоагулянтами.

Наше дослідження розпочалося з оцінки функціонального стану внутрішнього та загального механізмів згортання крові. Для цього ми проводили вимірювання АЧТЧ і ТЧ в плазмі крові донорів. АЧТЧ є одним із найінформативніших і найпоширеніших скринінгових тестів, що відображає зміну активності чинників внутрішнього шляху згортання крові та порушення рівноваги між прокоагулянтною та антикоагулянтною ланками системи гемостазу. Подовження часу згортання в тесті АЧТЧ спостерігається при дефіциті або аномаліях високомолекулярного кініногену, прекалікреїну, факторів згортання крові XII, XI, VIII, V, X, X, I, а також у присутності гепарину, продуктів деградації фібриногену/фібрину, люпус-антикоагулянтів. У разі подовження АЧТЧ при нормальному вмісті фібриногену проводять корекційно-інгібіторні проби.

ТЧ характеризує процес перетворення фібриногену на фібрин під дією екзогенного тромбіну. Подовження ТЧ спостерігається за вродженої аномалії фібриногену, гіпофібриногенемії, наявності інгібіторів тромбіну.

На рис. 3.1 видно, що у групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 та 85 ± 5 Індекс (S/C) були зафіксовані найвищі і найнижчі значення АЧТЧ, відповідно. При цьому у донорів з титром 75 ± 5 Індекс (S/C) АЧТЧ був вищим на 35,35 %, ніж у донорів з титром 0 Індекс (S/C), проте не було виявлено статистично значущих різниць між групами з титром 0 та 85 ± 5 Індекс (S/C). Варто зауважити, що максимальне значення АЧТЧ збільшилося на 35,02 % порівняно з мінімальним.

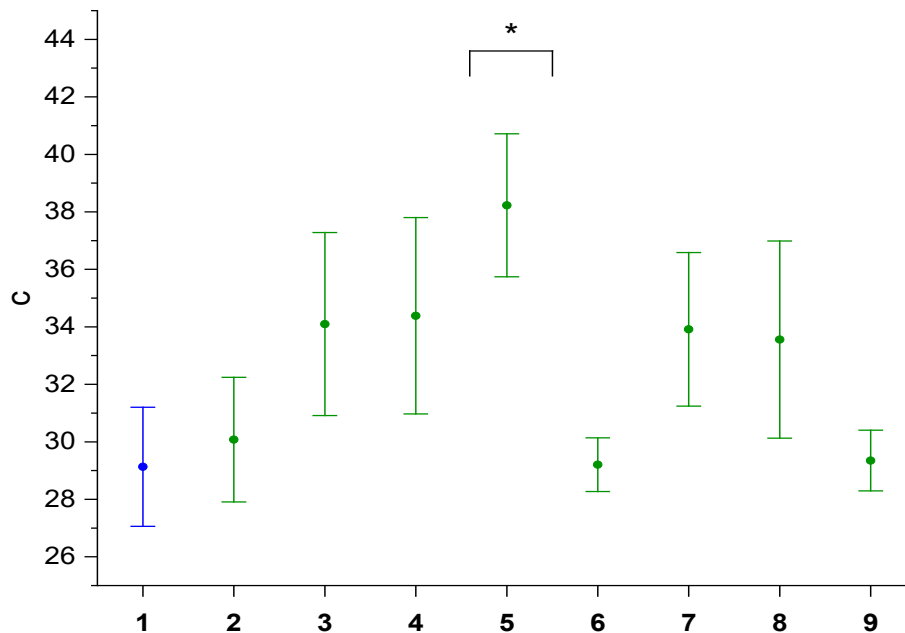


Рис. 3.1. Активований частковий тромбопластиновий час плазми крові донорів у групах з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 65 ± 5 ; 5 – 75 ± 5 ; 6 – 85 ± 5 ; 7 – 95 ± 5 ; 8 – 125 ± 5 ; 9 – 175 ± 5 . * - $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 0 Індекс (S/C).

На рис. 3.2 можна побачити, що значення ТЧ були найвищими у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 та 95 ± 5 Індекс (S/C). При цьому в групі з титром 10 ± 3 Індекс (S/C) значення ТЧ були вищими на 17,47 % та 16,12 %, порівняно з донорами з титрами 0 та 65 ± 5 Індекс (S/C) відповідно. Найнижче значення ТЧ було зафіксовано у донорів з титром 65 ± 5 Індекс (S/C), проте не було виявлено статистично значущих відмінностей між групами з титрами 0 і 65 ± 5 Індекс (S/C).

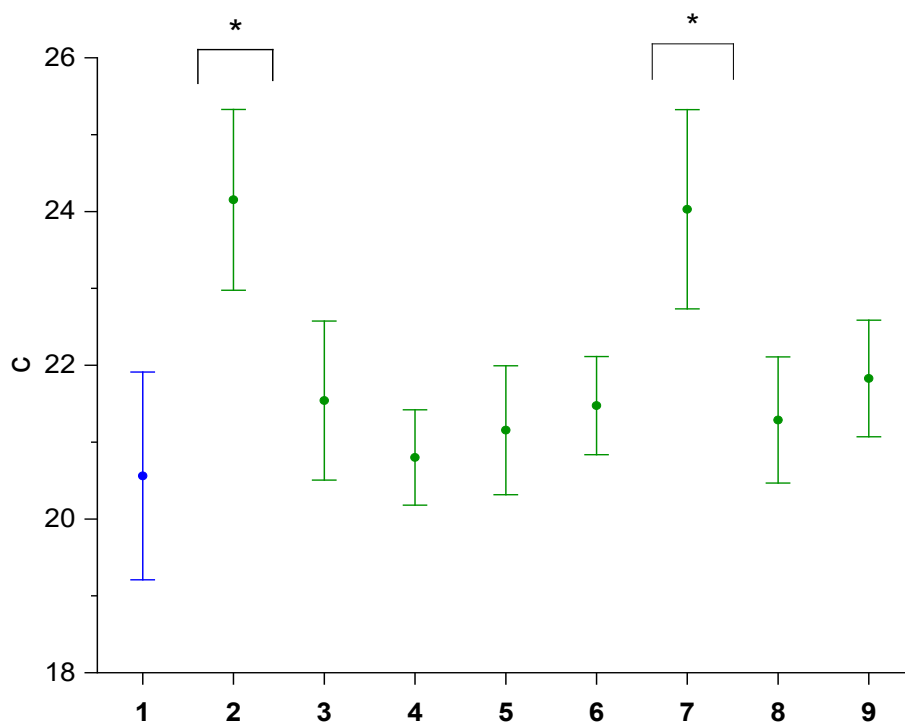


Рис. 3.2. Тромбіновий час у плазмі крові донорів з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 65 ± 5 ; 5 – 75 ± 5 ; 6 – 85 ± 5 ; 7 – 95 ± 5 ; 8 – 125 ± 5 ; 9 – 175 ± 5 . * - $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 0 Індекс (S/C).

Згідно отриманих результатів, у донорів спостерігалось достовірне подовження АЧТЧ і ТЧ у пост-Ковідному періоді. У літературі виділяють декілька причин подовження АЧТЧ, включаючи дефекти прокоагулянтних факторів, особливо VIII і X [109]. Крім того, в деяких випадках АЧТЧ може знижуватися за умов дефіциту активності АТІІІ та ПС [110]. У групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG $\geq 10 \pm 3$ Індекс (S/C) АЧТЧ і ТЧ не були нижчими, ніж у контрольній групі донорів. Ми припускаємо, що зміни шляхів коагуляції можуть бути зумовлені про- та антикоагуляційним дисбалансом залежно від титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. З цією метою ми вирішили детально вивчити антикоагулянтні параметри серед груп донорів.

Тому після того, як ми провели оцінку функціонального стану коагуляційного шляху системи гемостазу, ми вирішили дослідити антикоагуляційні параметри донорської плазми. Для цього була визначена активність та кількісний склад таких білків, як АТІІІ, ПС та ТМ.

АТІІІ є основним антикоагуляційним фактором, який сприяє приблизно 80% інгібуванню процесу коагуляції. У літературі повідомляється, що АТІІІ є потужним інгібітором тромбіну і безпосередньо інактивує накопичений тромбін, запобігаючи утворенню фібрину в кровоносних судинах. Наше дослідження АТІІІ складалося з двох методів: вимірювання активності в зразках плазми крові донорів і кількісного аналізу очищених білків з плазми крові.

Максимальна та мінімальна активність АТІІІ була зафіксована у групах донорів з титром анти-SARS-CoV-2 65 ± 5 та 75 ± 5 Індекс (S/C), відповідно (рис.3.3). Серед усіх груп донорів із титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, рівними або більшими за 10 ± 3 Індекс (S/C), ці дві групи вирізнялися.

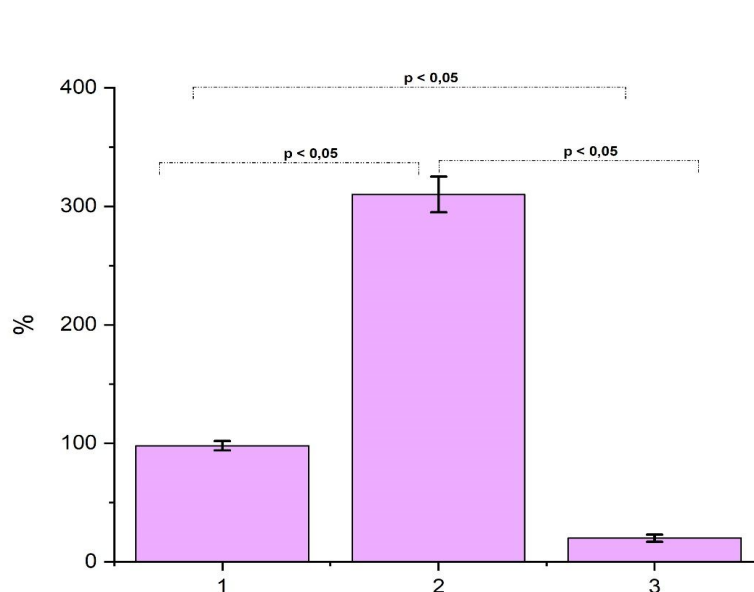


Рис. 3.3. Активність антитромбіну ІІІ у крові донорів з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 65 ± 5 ; 3 – 75 ± 5 .

Зокрема, донори із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 Індекс (S/C) мали вищу активність АТШ, що перевищувала активність у донорів із титром - 0 Індекс (S/C) на 209,55 %. У той час як у донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) активність АТШ була нижчою на 74,40% порівняно із донорами із титром - 0 Індекс (S/C). Наші результати показали, що активність АТШ варіювала в групах донорів залежно від титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. Таким чином, значні зміни в активності АТШ були виявлені в групах донорів з діапазоном титрів анти-SARS-CoV-2 IgG від 65 ± 5 до 75 ± 5 Індекс (S/C). При цьому максимальна активність АТШ в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 $\geq 10 \pm 3$ Індекс (S/C) була статистично вищою, ніж у донорів з титром - 0 Індекс (S/C). Зазвичай, надмірна активація АТШ може виникнути у випадках, коли розвиваються тромботичні ускладнення, такі як глибока венозна тромбоз, легенева емболія чи інші судинні проблеми. В цьому контексті може виникнути компенсаторна активація АТШ як відповідь на спробу організму запобігти утворенню небезпечних тромбів.

Для виділення фракції АТШ з донорської плазми застосовували метод афінної хроматографії. Потім здійснювали кількісний аналіз концентрації АТШ в плазмі за допомогою методу, описаного Бредфордом. Дисковий електрофорез використовували для визначення чистоти виділеної білкової фракції у всіх групах донорів. Ми отримали подібні результати електрофоретичного розподілу між групами донорів, детальні результати представлені на рис. 3.4.

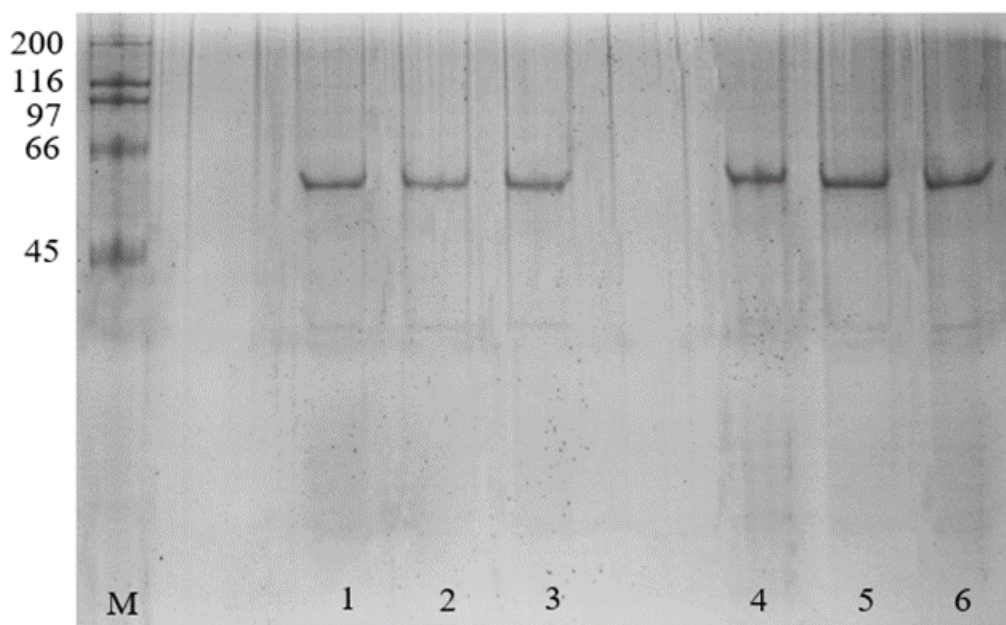


Рис. 3.4. Типова електроферограма отриманих фракцій антитромбіну III за допомогою афінної хроматографії: М – сукупність білків-маркерів молекулярної маси, кДа; 1 – 3 – дослідні зразки донорів з титром анти-SARS-CoV-2 на рівні 75 ± 5 Індекс (S/C); 4-6 дослідні зразки донорів з титром анти-SARS-CoV-2 на рівні 175 ± 5 Індекс (S/C);

З'ясовано, що група донорів з титром анти-SARS-CoV-2 на рівні 175 ± 5 Індекс (S/C) відзначається найвищою концентрацією АТІІІ, тоді як група донорів з титром 75 ± 5 Індекс (S/C) мала найнижчу концентрацію АТІІІ серед усіх донорських груп з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, що перевищують 10 ± 3 Індекс (S/C).

За отриманими даними, у групі з титрами 175 ± 5 Індекс (S/C) концентрація АТІІІ була вищою в 2,7 раза у порівнянні з донорами із титром 0 Індекс (S/C) та в 6,2 раза у порівнянні з донорами із титром 75 ± 5 Індекс (S/C) (рис. 3.5). У той час, коли донори з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) мали нижчу концентрацію АТІІІ в 2,3 рази у порівнянні з групою з титром 0 Індекс (S/C).

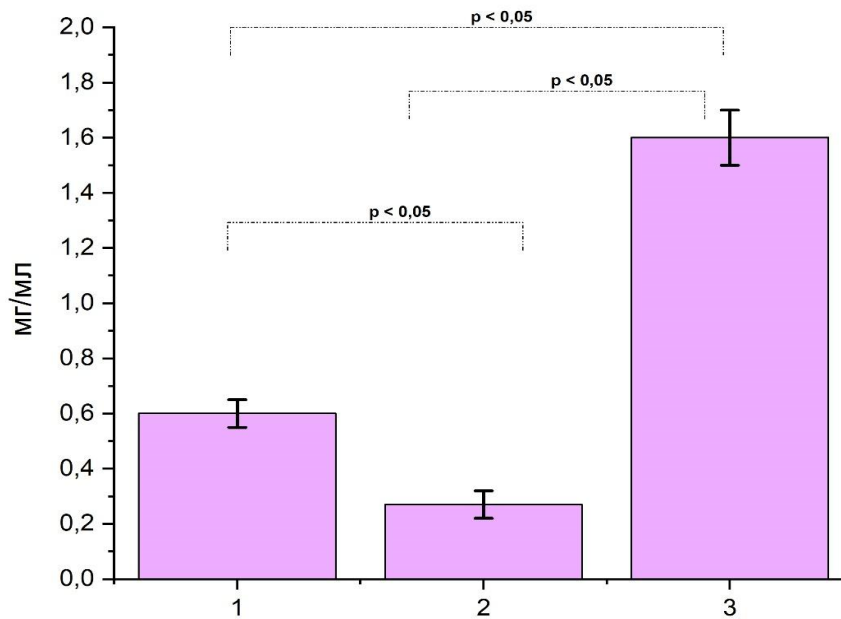


Рис. 3.5. Концентрація антитромбіну III у плазмі крові донорів в групах з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 75 ± 5 ; 3 – 175 ± 5 .

Підкреслимо, що активність і концентрація досліджуваних білків можуть бути незалежними параметрами, і АТІІІ не є винятком. Крім того, результати кількісних вимірювань підтвердили, що зміни концентрації АТІІІ залежали від титрів анти-SARS-CoV-2 IgG у групах донорів. Це може бути пов'язано з утворенням функціонально неспроможних білкових молекул, що призводить до розвитку патології антикоагуляційної системи. Можливою гіпотезою є наявність постковідних факторів, таких як аномальна деградація коагуляційних молекул та/або субпопуляцій антитіл, які можуть впливати на коагуляційні та антикоагуляційні розлади.

У той же час, ми також дослідили активність ПС в усіх групах донорів. На рис. 3.6 видно, що найвищий рівень активності ПС зафіксований у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG на рівні 55 ± 5 Індекс (S/C), серед усіх донорів

із титром анти-SARS-CoV-2 IgG, що перевищує 10 ± 3 Індекс (S/C). Активність у цій групі була на 44,06 % вищою, ніж у донорів із титром - 0 Індекс (S/C).

З іншого боку, мінімальний рівень активності ПС був виявлений у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG на рівні 95 ± 5 Індекс (S/C). Активність в цій групі була нижчою на 77,19 % порівняно з донорами із титром - 0 Індекс (S/C) та на 84,17 % порівняно із донорами із титром 55 ± 5 Індекс (S/C) (рис. 3.6).

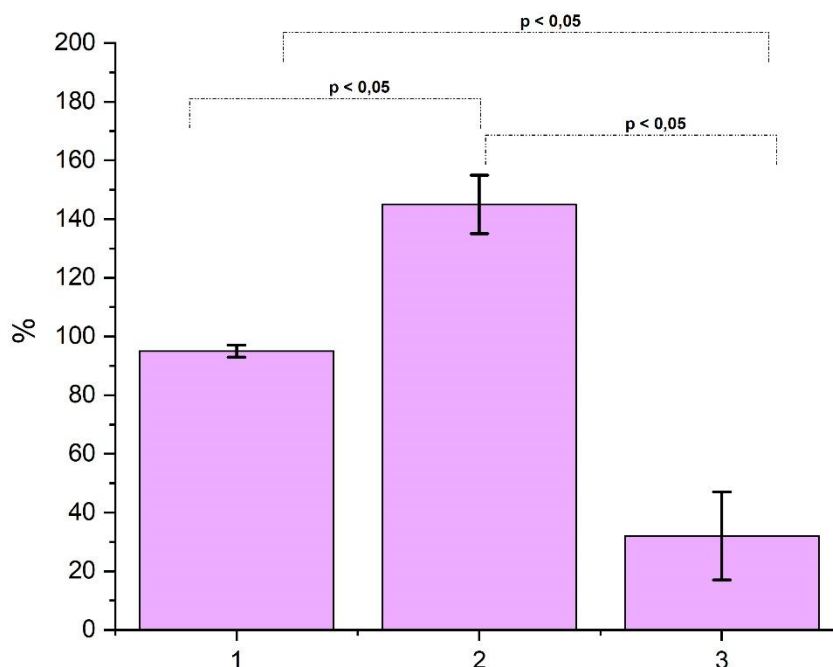


Рис. 3.6. Активність протеїну С у плазмі крові донорів з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 55 ± 5 ; 3 – 95 ± 5 .

За допомогою методу ІФА ми провели аналіз рівня ПС у плазмі крові донорів. Було встановлено, що найвищий рівень ПС відзначався у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C), серед усіх груп донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG, які перевищували 10 ± 3 Індекс (S/C). Рівень ПС у цій групі був вищим на 34,01 % порівняно з донорами із титром - 0 Індекс (S/C) та на 82,32 % порівняно з донорами із титром 85 ± 5 Індекс (S/C) (рис. 3.7). Група донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 85 ± 5 Індекс (S/C) мала

нижчу концентрацію ПС на 26,50 % порівняно з донорами із титром - 0 Індекс (S/C).

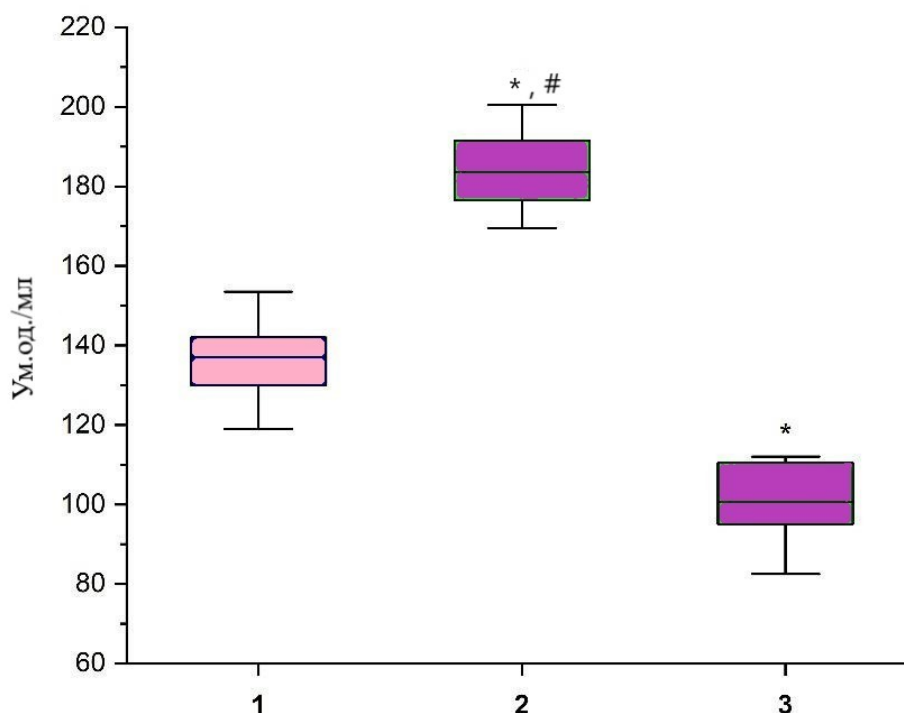


Рис. 3.7. Концентрація протеїну С у плазмі крові донорів з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 85 ± 5 .

* – $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 0 Індекс (S/C),

– $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 85 ± 5 Індекс (S/C).

Крім того, зміни антикоагуляційних параметрів підтверджувалися різною активністю та кількісним складом ПС між групами донорів. Хоча деякі донори характеризувалися підвищеною активністю на протипагу цьому, активність ПС у групах інших донорів мала тенденцію до зниження. Це виражалось у значенні мінімальної активності ПС у плазмі крові донорів з титром 85 ± 5 Індекс (S/C), яка була найнижчою серед усіх груп донорів, включаючи титр анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індeksu (S/C). Ці процеси можуть бути зумовлені зниженням здатності ТМ зв'язуватися з тромбіном, оскільки утворення цього

комплексу необхідне для активації ПС. З цією метою було вирішено проаналізувати вміст ТМ у плазмі крові донорів.

ТМ – трансмембранний рецептор тромбіну, який спричиняє в молекулі останнього конформаційні зміни, що призводять до пригнічення його коагуляційної активності та здатності активувати фактор V системи згортання крові. Зв'язування тромбіну з ТМ спричиняє прискорення активації ПС. Так, як ендотелій судин синтезує одноланцюговий глікопротеїн – тромбомодулін, що виконує функцію рецептора тромбіну, то ТМ визначає швидкість і напрямок процесу гемостазу. У фізіологічному стані ендотелій інактивує процеси згортання ще й за іншими механізмами. Одним із них є синтез АТІІІ, який у комплексі з гепарином інгібує тромбін і низку інших активованих факторів системи згортання крові. Утворюється гепарин у печінці, легенях базофілами, опастистими клітинами. Створення на клітинах ділянок зв'язування АТІІІ прискорює нейтралізацію тромбіну.

На заключному етапі було проведено аналіз концентрації ТМ. Важливо підкреслити, що групи донорів із титром анти-SARS-CoV-2 IgG, що дорівнюють або перевищують 10 ± 3 Індекс (S/C), характеризувалися меншою концентрацією ТМ порівняно з донорами із титром 0 Індекс (S/C). Максимальний та мінімальний рівні ТМ були виявлені у донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 та 75 ± 5 Індекс (S/C) відповідно.

Рівень ТМ у донорів із титром 75 ± 5 Індекс (S/C) був на 41,01 % та 32,42 % нижчий порівняно з донорами із титром 0 та 10 ± 3 Індекс (S/C) відповідно. Водночас концентрація ТМ у донорів із титром - 10 ± 3 Індекс (S/C) знизилася на 12,70 % порівняно із донорами із титром- 0 Індекс (S/C) (рис. 3.8).

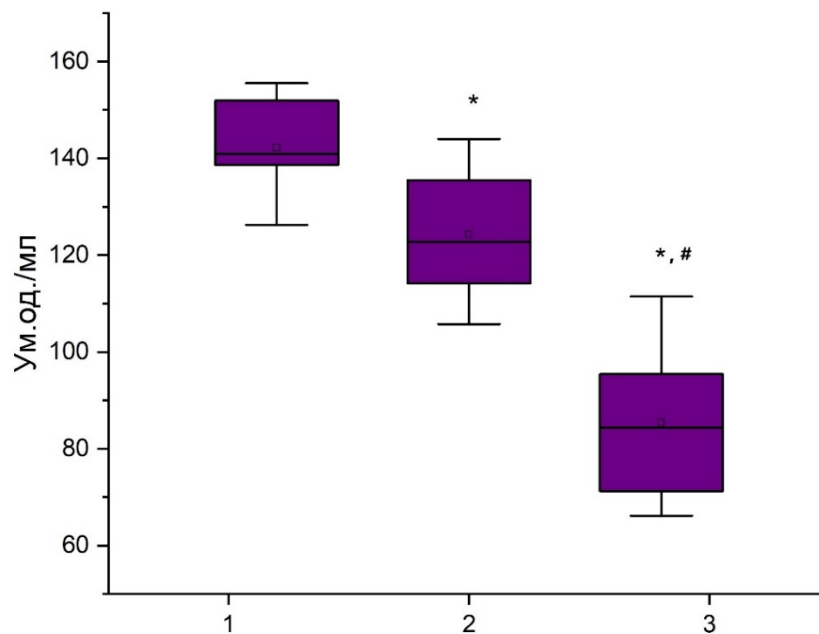


Рис. 3.8. Концентрація тромбомодуліну в плазмі крові донорів з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 75 ± 5 .

* – $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 0 Індекс (S/C),

- $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 10 ± 3 Індекс (S/C).

Наше припущення підтверджується зниженням рівня ТМ серед усіх груп донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG $\geq 10 \pm 3$ Індекс (S/C) порівняно з групою донорів з титром - 0 Індекс (S/C). Тромбомодулін має антикоагуляційні властивості в кровоносних судинах. Він здатний зв'язувати накопичений тромбін у відповідь на гіперкоагуляцію і запобігати розвитку тромбозу. Тромбомодулін-тромбіновий комплекс активує ПС, що впливає як на зниження коагуляційного статусу, так і на запуск протизапальних реакцій.

Підсумок.

У даному блоці вивчалися можливі відхилення в системі антикоагуляції. Ми хотіли дослідити наявність або відсутність змін у рівнях критичних

антикоагуляційних параметрів, таких як АЧТЧ, ТТ, АТШ, ПС та ТМ, у групах з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG. Підкреслимо, що аналізувався стан плазми крові людей без будь-яких інфекційних захворювань або патологічних процесів. Як наслідок, зміни досліджуваних параметрів теоретично можуть залежати від одного фактора впливу, а саме титру анти-SARS-CoV-2 IgG.

Літературні дані свідчать про вплив субпопуляцій антитіл, спричинених інфекцією чи запаленням, на стан системи гемостазу. В даний час розвиток порушень коагуляції є наслідком накопичення аутоантитіл при таких захворюваннях, як вірусний гепатит [111], інфекція Епштейна-Барр [112] системний склероз [113] та ішемічний інсульт [94]. Нещодавнє дослідження показало, що у пацієнтів з COVID-19 можна виявити аутоантитіла. Було ідентифіковано щонайменше три типи аутоантитіл: антифосфоліпіди, антицитоплазматичні нейтрофіли та антинуклеарні антитіла [114]. Ми визначили залежність показників антикоагуляції та титрів анти-SARS-CoV-2 IgG у донорів, які одужали від COVID-19. Ми припускаємо, що субпопуляції IgG можуть призводити до розвитку тривалого постковідного періоду, який супроводжується хронічними порушеннями системи гемостазу. Як наслідок, імунна система може виробляти аутоантитіла проти факторів згортання крові.

Ймовірно, зміни коагуляційних шляхів можуть виникати через про- та антикоагуляційну неврівноваженість, залежно від титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. Виявлено, що зміни концентрації та активності АТШ, ПС і ТМ залежать від титру анти-SARS-CoV-2 IgG. Це може сприяти виникненню довготривалих тромботичних ускладнень після одужання.

3.2. Оцінка вмісту молекул фібриногенового походження в плазмі крові людей після перенесеної коронавірусної хвороби з різними рівнями анти-SARS-CoV-2 IgG у крові

Фібриноген і фібрин мають важливе значення для гемостазу і є основними факторами тромбоутворення, загоєння ран та деяких інших біологічних функцій і патологічних станів. Рентгеноструктурний аналіз основних частин фібриногену, а також комп'ютерні реконструкції відсутніх частин і численні біохімічні та біофізичні дослідження надали багато даних для інтерпретації молекулярних механізмів утворення фібрину, його організації та властивостей. При відщепленні фібринопептидів тромбіном фібриноген перетворюється на мономери фібрину, які взаємодіють за допомогою "ручок", що утворюються в результаті видалення фібринопептиду в центральній частині, причому на кінцях молекул завжди залишаються отвори. Отримані в результаті дволанцюгові олігомери подовжуються в протофібрили, які агрегують в бічному напрямку, утворюючи волокна, які потім розгалужуються, утворюючи тривимірну мережу. Зараз багато відомо про структурні витоки механічних властивостей згустку, включаючи зміни в орієнтації волокон, розтягнення і згинання, а також примусове розгортання молекулярних доменів. Дослідження генетичних варіантів, пов'язаних з альтернативним сплайсингом, фібриногену та посттрансляційних модифікацій поглибили наше розуміння структури та функцій фібрин(оген)у. Фібринолітична система, в якій плазміноген зв'язується з фібрином разом з tPA для сприяння утворення активного протеолітичного ферменту плазміну, призводить до розщеплення фібрину за певними залишками лізину. Незважаючи на значне зростання наших знань про всі ці взаємопов'язані процеси, багато чого про молекулярні механізми біологічних функцій фібриногену залишається невідомим, включаючи деякі основні аспекти згортання крові, фібринолізу та молекулярні витоки механічних властивостей

фібрину. Ще менше відомо про більш складні (пато)фізіологічні наслідки фібриногену та фібрину [115].

Ендотеліальні клітини відіграють ключову роль у регулюванні процесів гемостазу та функціонування фібринової системи, які контролюють цілісність стінок судин. Порушення функції ендотеліальних клітин може призвести до посиленої продукції тромбіну та обмеження розщеплення фібрину, що призводить до гіперкоагуляції [116].

Ми дослідили параметри гемостазу, які безпосередньо беруть участь у перетворенні фібриногену на фібрин у зразках плазми донорів з визначеними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Виділено групи донорів з максимальними та мінімальними значеннями досліджуваних параметрів гемостазу. Зокрема, це було зроблено для того, щоб оцінити потенційний вплив анти-SARS-CoV-2 IgG на коагуляцію.

Ключовими показниками, які зазвичай використовуються для оцінки гемостазу, є концентрація фібриногену, РФМК та рівень D-димеру.

Було встановлено, що концентрація фібриногену в усіх експериментальних групах збільшилася порівняно з донорами без анти-SARS-CoV-2 IgG в крові. Так, у пацієнтів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) концентрація фібриногену була найвищою серед усіх досліджувальних груп та на 90 % вищою ніж в групі донорів без анти-SARS-CoV-2 IgG в крові, тоді як у пацієнтів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 Індекс (S/C) – концентрація фібриногену була найнижчою серед усіх досліджуваних груп з різними титром анти-SARS-CoV-2 IgG (рис.3.9).

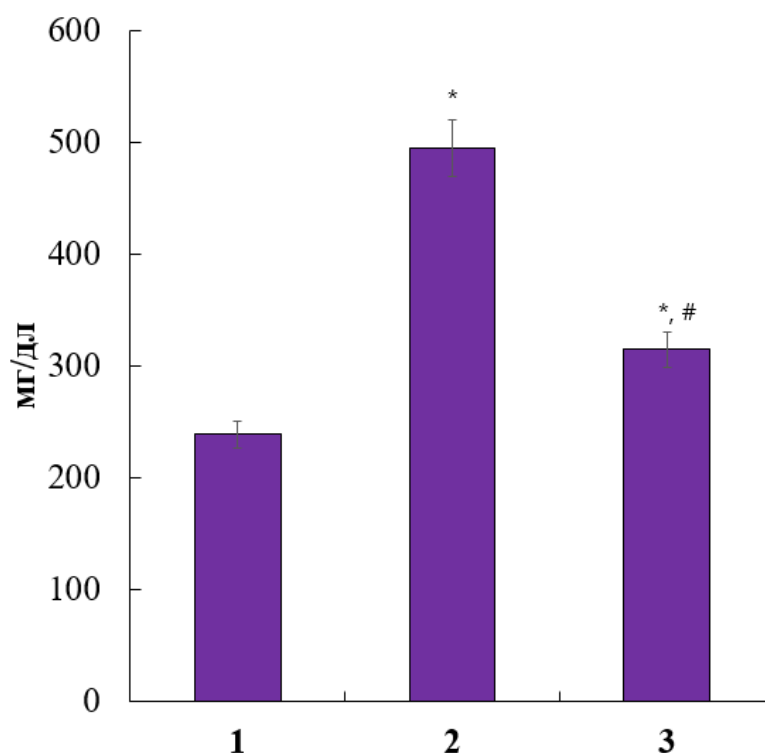


Рис. 3.9. Концентрація фібриногену в плазмі крові донорів з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 65 ± 5;

* – $p < 0,05$ відносно донорів без антитіл Індекс (S/C),

- $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 10 ± 3 Індекс (S/C).

Згідно з отриманими даними, постковідний період характеризується збереженням загрози тромбоемболічних ускладнень, про що опосередковано свідчило підвищення рівня фібриногену в усіх групах, незалежно від титру анти-SARS-CoV-2 IgG. Найбільш виражені зміни були виявлені в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C). Крім того того, що фібриноген є найбільш значущим маркером в оцінці коагуляційного потенціалу, підвищений рівень фібриногену вказує на персистуюче запалення – стан, що є одним з ключових тригерів порушень гемостазу. Кілька досліджень показали, що гіперкоагуляція виникає не тільки при гострому запаленні але й при хронічних запальних станах, які є характерні для постковідного періоду [117].

Наше дослідження РФМК складалося з кількісного та якісного аналізу. Кількісний аналіз показав, що висока концентрація РФМК була виявлена у всіх групах донорів, зокрема, найбільшою вона була у донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 (S/C) та була вищою в 2,6 разів ніж в групі донорів без анти-SARS-CoV-2 IgG в крові, а найнижчою – з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 (S/C) (рис. 3.10).

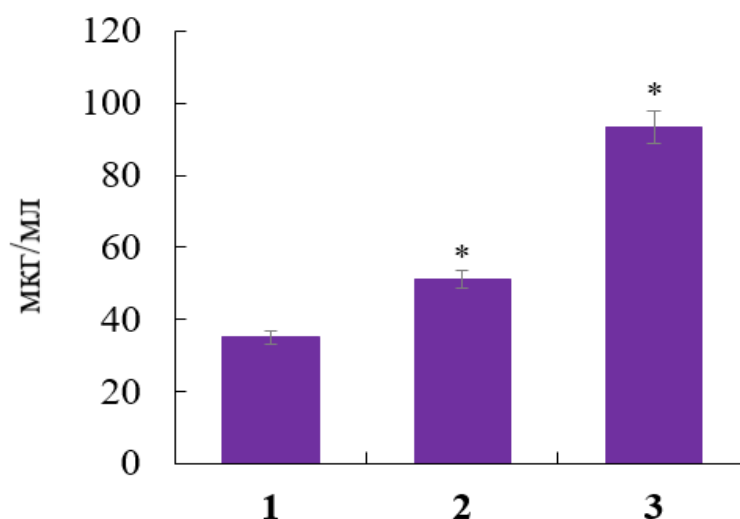


Рис. 3.10 Концентрація розчинних фібрин-мономерних комплексів у плазмі крові донорів з різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C):

1 – 0; 2 – 55 ± 5 ; 3 – 125 ± 5 ; * – $p < 0,05$ відносно донорів без антитіл Індекс (S/C).

Доцільно було провести аналіз якісного складу фракцій РФМК, у дослідних груп донорів яких було виявлено у ході кількісного аналізу максимальні та мінімальні концентрації РФМК – з титрами IgG проти SARS-CoV-2 55 ± 5 Індекс (S/C) та 125 ± 5 Індекс (S/C), відповідно.

На рис. 3.11 зображено типову хроматограму розділення фракції РФМК, отриманої з плазми крові донорів за наявності анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці. Для усіх проаналізованих груп донорів загальний вигляд

хроматограм був однаковим, але більшість відрізнялися між собою появою додаткових невеликих хроматографічних піків та збільшенням площі під піками.

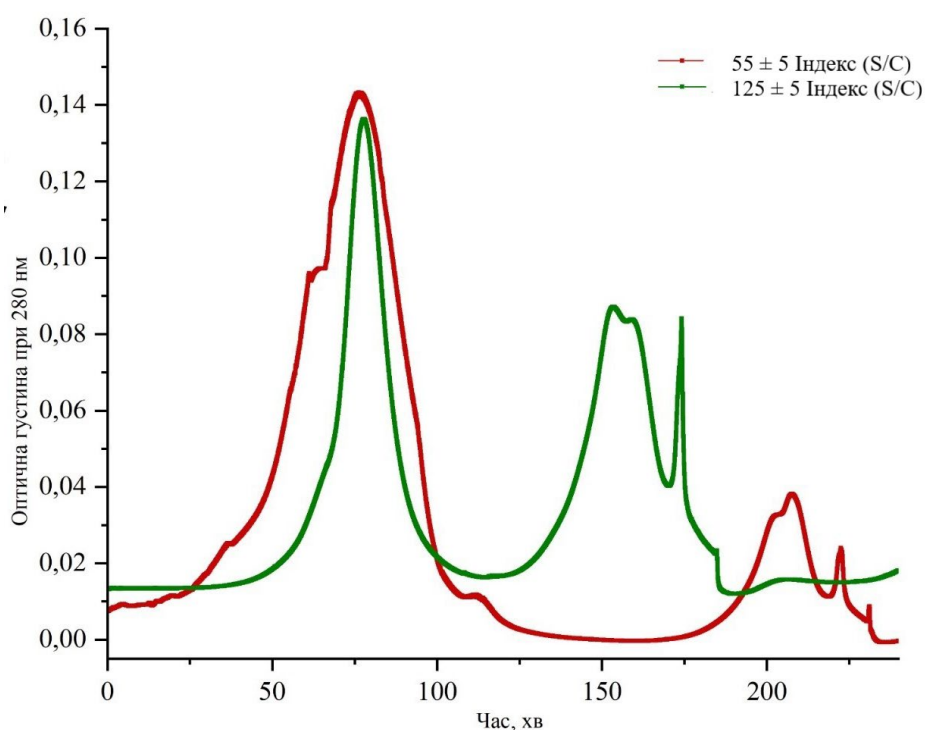


Рис. 3.11. Типова хроматограма розділення фракцій розчинних фібрин-мономерних комплексів, отриманих з плазми крові донорів за наявності антиковідних антитіл (анти-SARS-CoV-2 IgG).

Детальнішу характеристику білкових фракцій РФМК зазначених вище донорських груп наведено у табл. 3.1. Групи донорів, у кротоваці яких були присутні IgG проти SARS-CoV-2, характеризувалися більшою кількістю хроматографічних піків та зростанням площі під піками порівняно з групою донорів без анти-SARS-CoV-2 IgG. До того ж, за наявності анти-SARS-CoV-2 IgG в крові донорів у фракціях РФМК були присутні низькомолекулярні фрагменти.

Таблиця 3.1

**Характеристика якісного складу фракцій РФМК, отриманих з
плазми крові донорів**

Групи донорів, Індекс (S/C)	Кількість піків	Площа під піками, ум.од.	Молекулярна маса, кДа
0	1	0,18918	330
	2	0,02729	280
	3	0,06337	260
	4	0,17065	200
55 ± 5	1	0,94025	345
	2	0,46707	177
	3	0,25159	167
	4	0,0725	155
	5	0,00025	146
125 ± 5	1	1,42478	273
	2	1,92659	251
	3	1,80097	173
	4	0,11247	169
	5	0,17762	157
	6	0,31734	129

Найважливішою клінічною ознакою порушеного процесу коагуляції є накопичення РФМК, що є результатом розщеплення фібриногену. Тому наявність у крові донорів з різними титрами антитіл РФМК у вищих концентраціях, ніж у групі донорів без анти-SARS-CoV-2 IgG, може свідчити про активацію коагуляції в постковідному періоді. Встановлено, що РФМК можуть бути виявлені у здорових осіб у дуже низьких концентраціях, що ми і спостерігали в нашому експерименті (група донорів без анти-SARS-CoV-2 IgG). Небезпека накопичення РФМК полягає в тому, що вони мають тенденцію до полімеризації, утворюючи протофібрили (20-25 мономерів), також випадати в осад і утворювати мікрозгустки крові. Розчинні форми первинних фібрин-мономерних комплексів зумовлюють можливість їхнього надходження в усі частини тіла, сприяючи неконтрольованому поширенню тромбозу. Підвищення концентрації РФМК може бути наслідком запального процесу [118], який корелює з підвищеною концентрацією фібриногену.

Слід зазначити, що для комплексної оцінки схильності плазми до коагуляції важливо не тільки визначити концентрацію РФМК, але й проаналізувати якісний склад фракції. Різна кількість білкових фракцій у плазмі донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG свідчить про гетерогенність фракції РФМК. Присутність білків з молекулярною масою нижче 270 кДа відображає наявність фрагментів фібрину/фібриногену різного ступеня деградації. Завдяки наявності сайтів зв'язування для різних факторів гемостазу та їх регуляторів, зокрема, антитіл, ці фрагменти можуть бути залучені до механізмів порушень фібринолізу у людей в постковідний період. У більш широкому сенсі, фрагменти різної молекулярної маси можуть свідчити про неконтрольовану активацію біохімічних процесів на всіх рівнях, в яких беруть участь молекули фібриногенного походження. З іншого боку, значне підвищення рівня білків з молекулярною масою понад 200 кДа у фракції РФМК донорів з анти-SARS-CoV-2 IgG порівняно з результатами в групі донорів без анти-SARS-CoV-2 IgG, може бути непрямим свідченням

схильності до утворення нерозчинних комплексів внаслідок латеральної асоціації протофібрил.

У донорів з титром IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) спостерігається найвища концентрація D-димерів серед усіх дослідних груп (рис. 3.12). Концентрація D-димерів у донорів із титром 55 ± 5 Індекс (S/C) була на 4,8 разів вищою порівняно із донорами із титром- 0 Індекс (S/C). Попередньо було зазначено (рис. 3.10), що у цієї дослідної групи було виявлено РФМК у найменших кількостях відносно інших донорів, тому не дивним є зростання у кровотоці вмісту D-димерів, що є проявом активного фібринолізу, чого не було зафіксовано у більшості груп.

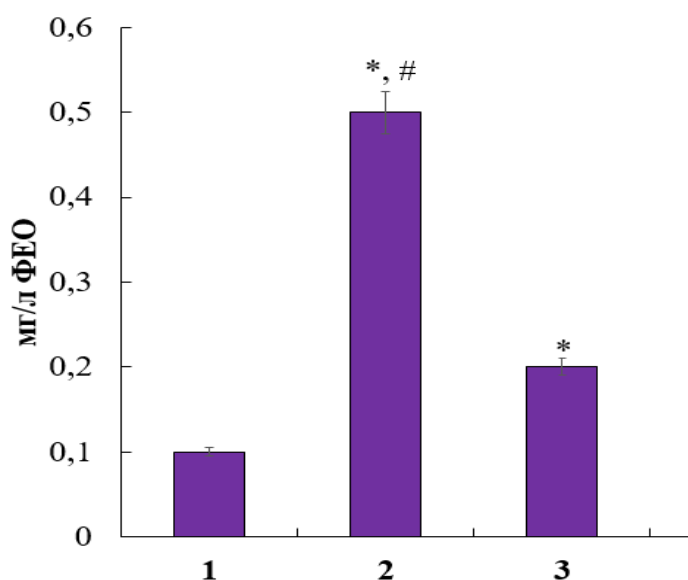


Рис. 3.12. Концентрація D-димерів у плазмі крові донорів різним титром анти-SARS-CoV-2 IgG: 1 – 0 Індекс (S/C); 2 – 55 ± 5 Індекс (S/C); 3 – 85 ± 5 Індекс (S/C); 3 – 175 ± 5 Індекс (S/C);

* – $p < 0,05$ відносно донорів без антитіл Індекс (S/C),

- $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 175 ± 5 Індекс (S/C).

Більше того, система фібринолізу не може розпізнати атипові фібринові згустки, що утворюються під час впливу SARS-CoV-2, що може перешкоджати розщепленню розчинних продуктів деградації. Повну інформацію про стан системи гемостазу у людей, які одужали від COVID-19 інфекції та мають різні титри анти-SARS-CoV-2 IgG, можна отримати, вимірявши концентрацію D-димеру як маркера фібринолізу. Слід підкреслити, що інтерпретація змін концентрації D-димеру є досить суперечливою і потребує додаткової інформації. Підвищення концентрації D-димеру є свідченням активного фібринолізу та розщеплення фібринових згустків. У той же час, підвищений рівень цього маркера опосередковано вказує на підвищення згортання крові.

Підсумки: Нашими дослідженнями встановлено, що зміни параметрів коагуляції залежать від титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. Було виявлено підвищення концентрації фібриногену у донорів плазми з різними титрами анти SARS-CoV-2 IgG, накопичення РФМК в крові донорів на тлі незначного підвищення рівня D-димеру, це може підтверджувати певні порушення в системі гемостазу, які зберігаються через 3-6 місяців після захворювання. З огляду на отримані дані, можна припустити, що донори з вищим титром анти-SARS-CoV-2 IgG ($>55 \pm 5$ Індекс (S/C)) більш схильні до тромботичних ускладнень у постковідному періоді, оскільки для них характерний виражений дисбаланс рівнів РФМК та D-димеру – ключових маркерів коагуляції та тромбоутворення відповідно. Отримані нами результати потребують пильної уваги клініцистів для удосконалення діагностичних стратегій для моніторингу стану пацієнтів у постковідному періоді з огляду на літературні дані про здатність антитіл прямо або опосередковано впливати на активність факторів гемостазу.

3.3. Дослідження функціонування протромбінової ланки системи зсідання крові людей, які перехворіли на COVID-19 та мають в кровотоці різну кількість анти-SARS-CoV-2 IgG

Протромбін є основним компонентом зовнішнього шляху і попередником тромбіну, який перетворює розчинний фібриноген у нерозчинний фібриновий згусток через загальний шлях коагуляції. Протромбін (фактор II) - це вітамін К-залежний білок плазми крові, що синтезується в печінці. У кінцевому загальному шляху згортання фактор Ха у складі протромбіназного комплексу (фактори Ха, Va і фосфоліпід) відщеплює активаційний пептид (фрагмент протромбіну 1.2) від протромбіну з утворенням тромбіну, який розщеплює фібриноген з утворенням фібрину, активує тромбоцити і фактори V, VIII, XI і XIII, що сприяє утворенню нерозчинної гемостатичної пробки. Потенційна активність протромбіну в плазмі коливається від 70% до 130%, а кількість тромбіну, що утворюється, прямо пропорційна концентрації протромбіну в плазмі.

Оскільки ми ще дуже мало знаємо про коагулопатію в постінфекційному періоді COVID-19, необхідно вивчати всі можливі шляхи дестабілізації системи згортання крові, включаючи показники протромбіну.

Для початку дослідження функціонування протромбінової ланки ми визначили ПЧ показник зовнішнього шляху згортання плазми серед описаних груп донорів. Максимальним значенням ПЧ серед усіх груп донорів, що на 17,5% перевищувало значення ПЧ в групі донорів без антитіл, характеризувались групи з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 та 75 ± 5 Індекс (S/C). Мінімальний показник ПЧ серед груп донорів, що мали антитіла до SARS-CoV-2, виявлено в групі з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 175 ± 5 Індекс (S/C), при цьому статистично значущої різниці порівняно з референтною групою донорів не було. Водночас, ПЧ плазми крові групи

донорів з максимальним значенням цього показника на 16,3 % перевищував такий у групі донорів з мінімальним його значенням (Рис. 3.13).

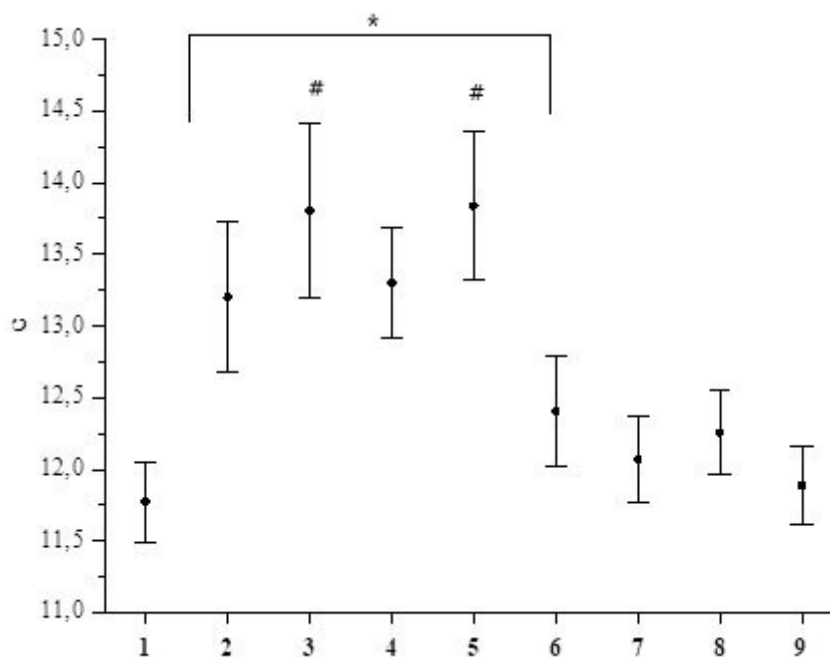


Рис.3.13 Протромбіновий час у плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 65 ± 5 ; 5 – 75 ± 5 ; 6 – 85 ± 5 ; 7 – 95 ± 5 ; 8 – 125 ± 5 ; 9 – 175 ± 5 ;

* – $p < 0,05$ відносно групи донорів з титром 0 Індекс (S/C),

– $p < 0,05$ відносно групи донорів 175 ± 5 Індекс (S/C).

Вимірювання ПЧ дозволило визначити загальний стан зовнішнього шляху згортання крові. Деякі групи донорів характеризувалися подовженим ПЧ порівняно з референтною групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 0 Індекс (S/C). Ці результати можуть бути предиктором дисбалансу факторів згортання крові, що беруть участь у зовнішньому шляху, особливо в протромбіновому пулі. За даними літератури, за відсутності вітаміну К зниження рівнів факторів II, V, VII, X є причиною тривалого ПЧ [120]. Тому, вимірюючи ПЧ, ми підкреслили ймовірну наявність коагуляційних ускладнень

у пост-ковідному періоді, що пов'язані з екстернальним шляхом згортання крові.

Далі ми розраховали МНВ для стандартизації коагуляційних вимірювань. Максимальне значення МНВ було визначено в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 , Індекс (S/C), значення якого на 20,8% перевищувало таке у референтній групі донорів. Значення МНВ у групі донорів із максимальним ПЧ (титр 75 ± 5 Індекс (S/C)) було на 13,72% вищим, ніж у контролі. Мінімальне значення-МНВ спостерігалось в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 175 ± 5 Індекс (S/C), але статистично не відрізнялося від контрольних значень (Рис. 3.14).

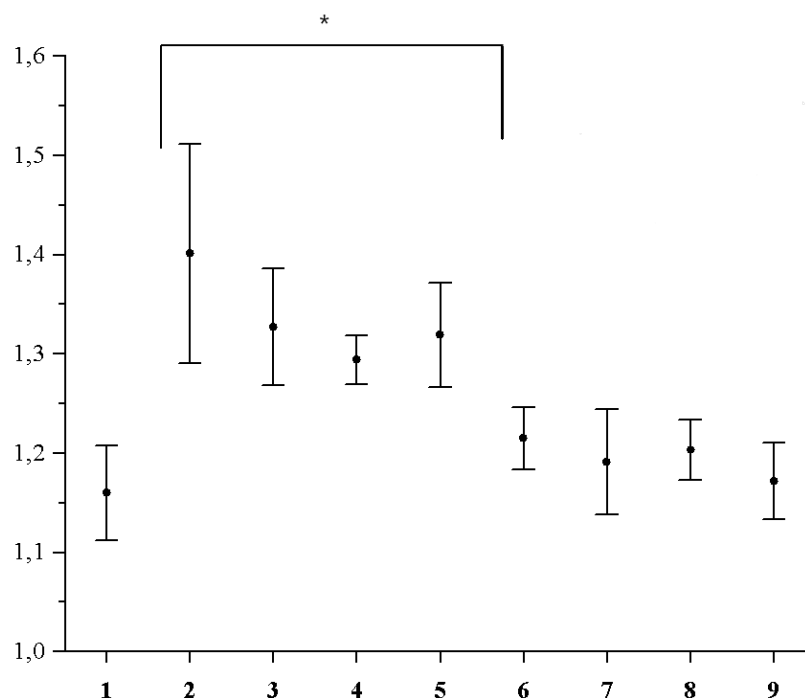


Рис. 3.14 Міжнародне нормалізоване співвідношення плазми крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 ; 4 – 65 ± 5 ; 5 – 75 ± 5 ; 6 – 85 ± 5 ; 7 – 95 ± 5 ; 8 – 125 ± 5 ; 9 – 175 ± 5 ; * - $p < 0,05$ порівняно з групою донорів з титром 0 Індекс (S/C).

Протромбін – це ключовий вітамін К-залежний білок, який бере участь у згортанні крові як попередник тромбіну і сприяє утворенню фібринового згустку. Вірусні інфекції, включаючи COVID-19, можуть викликати зміни параметрів протромбіну, які призводять до місцевих та загальних порушень коагуляції. Багато клінічних досліджень виявили тривалий ПЧ у пацієнтів з COVID-19, але широкомасштабних досліджень пулу молекул протромбіну раніше не проводилося, особливо у людей, які одужали від COVID-19 протягом останніх 3-6 місяців. Під час пандемії COVID-19 вчені наголошували, що SARS-CoV-2 може викликати поліорганну дисфункцію, що призводить до негативних наслідків у коагуляційному каскаді [121]. Хоча параметрам коагуляції приділяється особлива увага в лабораторній діагностиці в період хвороби та одужання пацієнтів, ми припускаємо, що для визначення причин коагулопатії у пацієнтів, які одужали від COVID-19, необхідно більш детально вивчити параметри коагуляції, такі як протромбіновий пул. З цією метою ми дослідили потенційний дисбаланс у складі молекул протромбіну в межах коагуляційного каскаду.

Екзогеним активатором виступив екамулін – протеаза, яка отримана з отрути змії *Echis multisquamatis*. Її дія спрямована на ізольовану активацію протромбіну без залучення цілого каскаду згортання крові з метою дослідження безпосередньої активності протромбіну та його попередників [122]. Ми мали на меті дослідити можливі зміни потенційної активності протромбіну залежно від титру анти-SARS-CoV-2 IgG серед досліджуваних груп.

Згідно з отриманими результатами, максимальна потенційна активність протромбіну спостерігалася в групах з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 та 95 ± 5 Індекс (S/C) серед усіх груп донорів. Ці показники були вищими на 72,21% та 73,95% відповідно, порівняно з референтними донорами. Мінімальна потенційна активність протромбіну була виявлена в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), що на 33,0% нижче, ніж

у референтній групі донорів (рис. 3.15). У цій групі донорів спостерігалось зниження потенційної протромбінової активності до 61,1 % та 61,5 % порівняно з групами з титрами 55 ± 5 та 95 ± 5 Індекс (S/C) відповідно.

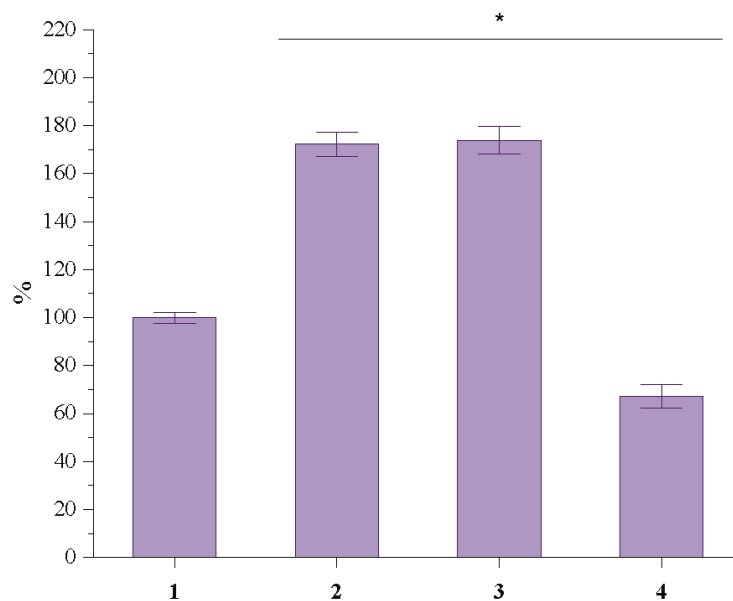


Рис. 3.15 Потенційна активність протромбіну в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2, індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 55 ± 5 ; 3 – 95 ± 5 ; 4 – 125 ± 5 ; * – $p < 0,05$ відносно донорів з титром 0 Індекс (S/C).

На відміну від тромбопластину, екамулін здатний безпосередньо активувати протромбін, для чого немає потреби присутності йонів кальцію, фосфоліпідів чи інших кофакторів. Особливість екамуліну - активує не лише протромбін, але і його функціонально неактивні форми [123]. Даний діагностичний тест показав, що у всіх дослідних групах, окрім донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), потенційна активність протромбіну та його функціонально неактивних форм вища порівняно з контрольною групою донорів. За фізіологічних умов тромбопластин активує фактор VII, який разом із фактором X забезпечує перетворення протромбіну у тромбін, тоді як нефізіологічний активатор екамулін активує безпосередньо

протромбін, який перетворюється у мезотромбін, а останній у тромбін. Відомо, що тромбін – критичний фактор розвитку запальної реакції, адже може активувати protease-activated receptor-1 (рецептор, активований протеазою-1) на ендотеліальних клітинах та фібробластах, що ініціює вироблення monocyte chemoattractant protein-1 (моноцитарний хемоаттрактантний білок-1), TNF- α , IL-1 β , IL-6. Разом ці сполуки опосередковують рекрутинг тромбоцитів та лейкоцитів, їх адгезію на ендотелії, що стає тригером для запалення та прокоагулянтних процесів на поверхні судин [124].

Ми припускаємо, що запальна реакція, викликана проникненням вірусу SARS-CoV-2 у клітини, призводить до надмірної активації протромбіну, внаслідок чого накопичується тромбін, який буде використовуватися для імунних потреб організму. Підкреслимо, тромбін може розщепляти протромбін до проміжного продукту – претромбіну 1, який вважається фізіологічно неактивним [125]. Екамулін як активатор може активувати претромбін 1, що утворюється під час розщеплення тромбіном. Таким чином, активне накопичення тромбіну може негативно впливати на процеси згортання крові у подальшому, адже сприятиме нагромадженню функціонально неактивних форм та блокуватиме утворення фізіологічно активного протромбіну.

У групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C) зменшується потенційна активність протромбіну порівняно з контрольною групою. Можливим поясненням цього можуть бути антифосфоліпідні антитіла, що, відповідно до літературної інформації [126–127], з'являються у кровотоці людей, які хворіють COVID-19. Серед таких є антитіла проти протромбіну, що можуть викликати інгібування функціонально активного протромбіну. Таким чином, дослідні групи донорів з анти-SARS-CoV-2 IgG характеризуються зміною фізіологічної активності протромбіну. Ми припускаємо, що ці зміни пов'язані з наслідками запальних процесів під час

перебігу захворювання COVID-19, залежать від IgG, що були напрацьовані в організмі та впливають на потенційну активність протромбіну у постковідному періоді.

Також нами було досліджено кількісний вміст молекул протромбіну в плазмі крові донорських груп. Максимальний рівень протромбіну серед усіх груп спостерігався в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), який був на 11,4% вищим, ніж у референтній групі донорів. Мінімальний рівень протромбіну серед усіх груп був виявлений у групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 Індекс (S/C), що було на 37,5% нижче, ніж у референтній групі донорів (рис. 3.16). Крім того, максимальний і мінімальний рівні протромбіну відрізнялися на 43,9 %.

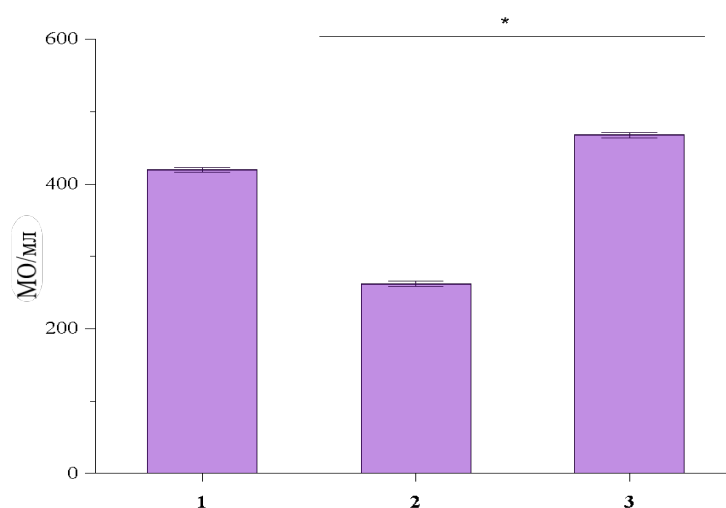


Рис. 3.16 Рівень протромбіну в плазмі донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 65 ± 5 ; 3 – 125 ± 5 ; * – $p < 0,05$ відносно донорів з титром 0 Індекс (S/C).

Використання поліклональних антитіл для ІФА дає можливість кількісно оцінити склад пулу молекул протромбінового походження. Як видно з результатів аналізу, підвищення або зниження рівня молекул протромбіну серед груп донорів не вдалося чітко визначити. Крім того, спостерігалася

відмінність між кількісним вмістом та активністю молекул протромбіну в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C), яка характеризувалася максимальним рівнем та мінімальною активністю молекул протромбіну. Це може бути зумовлено наявністю функціонально неактивних молекул протромбінового походження, які можуть дестабілізувати процеси коагуляції та активувати імунну відповідь проти факторів коагуляції в постковідний період.

Для більш детального дослідження змін вмісту протромбіну у плазмі крові дослідних груп, було проведено оцінку якісного складу фракцій вітамін К-залежних білків плазми крові усіх дослідних груп донорів. Сімейство вітамін К-залежних білків включає фактори системи згортання крові – II, VII, IX, X, протеїн С та протеїн S, характерною особливістю структури яких є наявність у N-кінцевій частині молекули так званого Gla-домену, який містить від 37 до 46 амінокислотних залишків, що є гомологічними відповідним доменам цієї групи білків та включають від 9 до 12 залишків γ -карбоксиглутамінової кислоти. Вітамін К-залежні білки спочатку синтезуються у формі попередників, що містять на N-кінці молекули додаткові послідовності (лідерні пре-сегменти і про-пептиди). Виявлено, що у донорів з максимальним та мінімальним вмістом молекул протромбінового пулу, відповідно до кількісного аналізу, спостерігається гетерогенність білкового складу фракцій вітамін К-залежних білків (рис. 3.17).

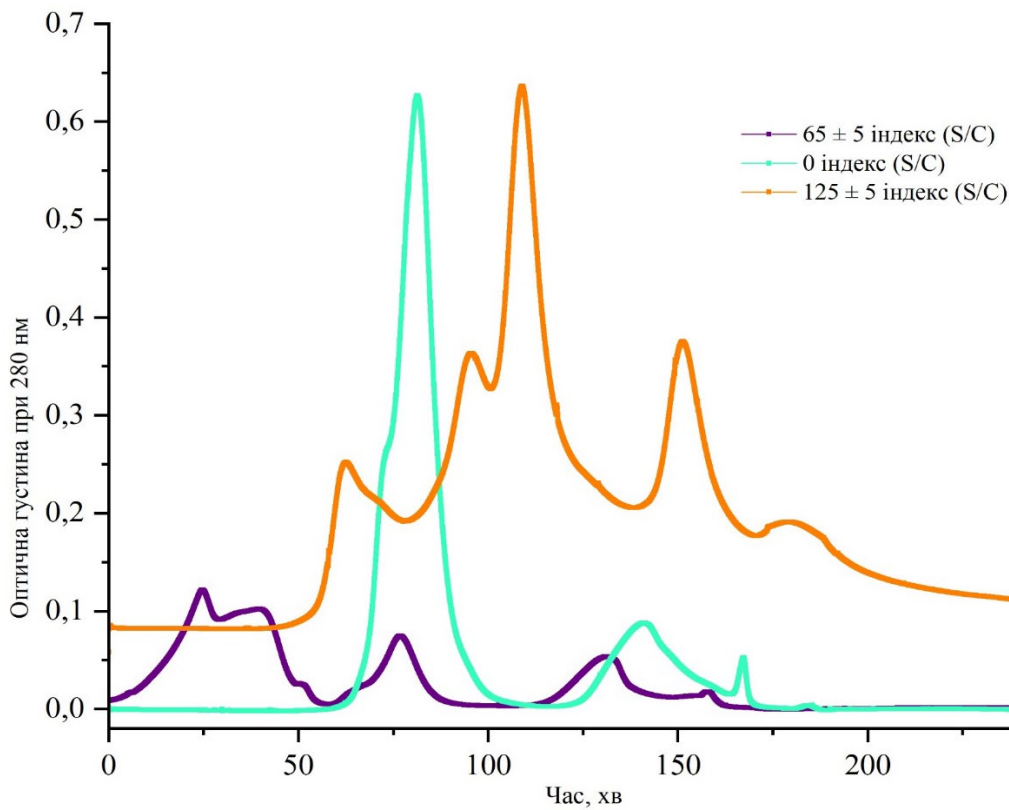


Рис. 3.17. Хроматограма розділення фракцій вітамін К-залежних білків, отриманих з плазми крові донорів з такими титрами IgG проти SARS-CoV-2: 1 – 0 Індекс (S/C); 2 – 125 ± 5 Індекс (S/C); 3 – 65 ± 5 Індекс (S/C).

Відповідно до табл. 3.2, у плазмі крові вищезазначених донорних груп було виявлено білкову фракцію з молекулярною масою 70 кДа, що відповідає молекулярній масі протромбіну. Крім того, для донорів з титром IgG проти SARS-CoV-2 – 65 ± 5 Індекс (S/C) були характерні високомолекулярні білкові фракції – 361 та 225 кДа, що не виявлено у якісному складі фракції вітамін К-залежних білків здорових донорів. У групах донорів, у кровотоці яких були присутні анти-SARS-CoV-2 IgG, зростала кількість піків та площа під піками порівняно з донорами без анти- SARS-CoV-2 IgG.

Таблиця 3.2

Характеристика якісного складу фракцій вітамін К-залежних білків, отриманої з плазми крові донорів з різними титрами антиковідних антитіл (анти-SARS-CoV-2 IgG)

Групи донорів, Індекс (S/C)	Кількість піків	Площа під піками, ум.од	Молекулярна маса, кДа
0	1	6,69	112
	2	0,58	70
	3	0,01	54
10 ± 3	1	0,22	141
	2	2,75	122
	3	8,52	102
	4	19,37	76
	5	3,18	54
	6	2,02	47
55 ± 5	1	3,45	103
	2	1,75	84
	3	3,76	60
	4	7,02	42
65 ± 5	1	7,72	361
	2	11,54	225
	3	26,07	177
	4	4,89	118
	5	0,34	69
	6	11,80	57

75 ± 5	1	0,04	823
	2	0,32	132
	3	1,81	117
	4	1,09	64
	5	20,82	53
85 ± 5	1	1,66	143
	2	0,08	79
	3	0,01	61
95 ± 5	1	0,85	139
	2	2,32	90
	3	0,76	80
	4	1,13	56
	5	0,16	47
125 ± 5	1	7,78	80
	2	4,76	73
	3	1,84	65
	4	1,93	45
175 ± 5	1	10,30	97
	2	1,87	55
	3	0,17	43

Якісний аналіз молекул протромбіну проводили шляхом дослідження фракцій вітамін К-залежних білків у плазмі крові всіх груп донорів. Поява фракцій білків з високою молекулярною масою (> 80 кДа) може свідчити про порушення протеолізу білків у донорів, які перенесли COVID-19. Можна припустити, що наявність таких білків є аномальною і може бути показником дисбалансу пулу молекул протромбіну у донорів з титрами анти-SARS-CoV-2

IgG $\geq 10 \pm 3$ Індекс (S/C). Накопичення високомолекулярних білків може призвести до розвитку патологічної коагуляції в пост-ковідному періоді.

Підсумки: Дослідження продемонструвало суттєві відмінності у складі та функціях молекул протромбінового походження на всіх етапах їхньої дії в системі гемостазу. Виявлені відмінності у складі цих молекул свідчать про потенційну зміну функціонування гемостатичного каскаду, що може призвести до виникнення патологічних станів в організмі. Відмінності в пулах молекул протромбіну та хронометричних тестах підтвердили нашу гіпотезу. Враховуючи, що досліджувані групи донорів були практично здоровими і не мали хронічних захворювань, а єдиною відмінністю була різниця в титрах анти-SARS-CoV-2 IgG, можна припустити потенційний вплив IgG на описані параметри. Ця гіпотеза потребує підтвердження *in vitro* з використанням очищених фракцій IgG.

Майбутні дослідження плазми донорської крові з анти-SARS-CoV-2 IgG можуть бути корисними для вивчення множинних ускладнень у пост-ковідному періоді. Глобальні дослідження в цьому напрямку важливі для розробки стратегій контролю за станом системи гемостазу у людей, які перехворіли на COVID-19, та можливості виникнення інших подібних захворювань, які можуть призводити до присутності різної кількості аутоантитіл у кровотоці.

3.4. Аналіз фібринолітичної ланки системи гемостазу в людей, що перенесли COVID-19 та мають різні рівні анти-SARS-CoV-2 IgG у кровотоці

Фібрин відіграє важливу роль у гемостазі як первинний продукт коагуляційного каскаду та кінцевий субстрат для фібринолізу. На ефективність фібринолізу значною мірою впливають структура згустку, ізоформи та поліморфізми фібриногену, швидкість утворення тромбіну, реактивність тромбоцитів та загальне біохімічне середовище. Регуляція фібринолітичної системи, як і коагуляційного каскаду, здійснюється за допомогою широкого спектру кофакторів, рецепторів та інгібіторів. Фібринолітична активність може генеруватися або на поверхні фібриновмісного тромбу, або на клітинах, які експресують профібринолітичні рецептори. У розширюваному спектрі клінічних розладів набуті та вроджені дефекти фібринолізу сприяють захворюваності, а нові аналізи глобального фібринолізу тепер мають потенційну прогностичну цінність у багатьох клінічних ситуаціях. У цьому розділі ми аналізуємо основні елементи фібринолітичної системи, точки взаємодії з коагуляційним шляхом.

Первинним етапом фібринолітичної реакції є перетворення плазміногену на плазмін, який розщеплює нерозчинні полімери фібрину до продуктів деградації фібрину. Плазміноген - одноланцюговий глікопротеїн плазми крові з молекулярною масою 92 кДа, який після активації ендogenousними або екзогенними активаторами перетворюється на активний фермент - плазмін (КФ 3.4.21.7.).

Функціонування фібринолітичної системи зумовлене збалансованою взаємодією активаторів та інгібіторів плазміногену [128]. Відомо 3 типи фізіологічних активаторів плазміногену: uPA (КФ 3.4.21.73), що забезпечує протеоліз на поверхні клітин шляхом активації плазміногену або чинників росту з подальшою деградацією компонентів клітинного матриксу, фактор

XIIa (робить незначний внесок у потенціал фібринолітичної системи) та tPA (КФ 3.4.21.68), якому притаманна визначальна роль у деградації фібрину й тромбів у руслі крові. До екзогенних активаторів плазміногену належить стрептокіназа (білок бактеріального походження) і рекомбінантні препарати uPA та tPA, які вводять в організм із лікувальною метою [129]. Плазміноген активується судинними і тканинними активаторами на поверхні фібринового згустку, де розташовані всі компоненти, необхідні для цього процесу. Зв'язаний на поверхні фібрину плазмін значною мірою захищений від інгібуючої дії α_2 -АП (фізіологічний інгібітор плазміну), завдяки цьому механізму забезпечується лізис фібринового згустку в присутності інгібітора. Після ферментативного лізису фібрину до фрагментів плазмін вивільняється в кровоносне русло, де швидко і необоротно інгібується α_2 -АП.

Фібриноліз відбувається у 2 послідовні етапи. I етап — утворення з неактивного проферменту плазміногену (профібринолізину) активного ферменту — протеїнази плазміну (фібринолізину), яка розщеплює фібрин тромбу; II етап — розщеплення фібрину, що є основою фібринового згустку, до пептидних продуктів протеолізу. Процес каталізується активним плазміном, що утворився на I етапі фібринолізу.

Регулювання процесу фібринолізу відбувається на рівні інгібіторів активаторів плазміногену I, II та III типу (PAI-1, PAI-2 та PAI-3, відповідно) або α_2 -АП, що є інгібіторами серинових протеїназ та належать до сімейства серпінів [130]. Також одним з основних регуляторів активності протеолітичних ферментів крові та тканин вважається α_2 -МГ. Він утворює комплекси з сериновими протеїназами, знижуючи їхню активність.

Ми поставили за завдання визначити стан системи фібринолізу у здорових донорів залежно від титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. Для цього в плазмі крові донорів різних груп визначали кількість та потенційну активність таких фібринолітичних показників, як плазміноген, tPA, α_2 -АП, PAI-1, α_2 -МГ

та α_1 -АТ. Ми вимірювали потенційну активність та кількісний вміст плазміногену в плазмі крові.

Найбільш значущі мінімальні та максимальні зміни потенційної активності плазміногену були виявлені в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 та 95 ± 5 Індекс (S/C) серед груп з титрами не менше 10 ± 3 Індекс (S/C), відповідно. Значення даного показника в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 95 ± 5 Індекс (S/C) в 4,2 рази перевищувала референтні значення, тоді як для групи з мінімальною потенційною активністю плазміногену аналогічні результати не були описані (рис. 3.18).

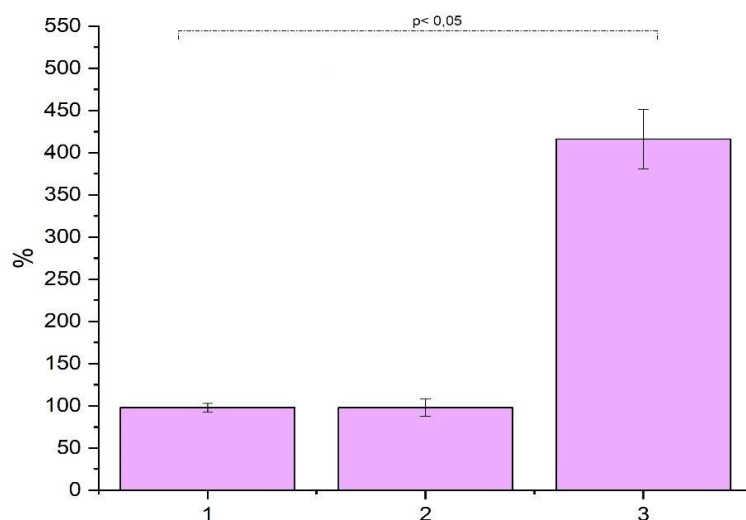


Рис. 3.18. Потенційна активність плазміногену в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 65 ± 5 ; 3 – 95 ± 5 .

Водночас хотілось би підкреслити, що підвищення або зниження активності не завжди однакове із кількісними значеннями цього параметра. У нашому випадку ми виявили мінімальний і максимальний рівні плазміногену в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 і 125 ± 5 Індекс (S/C), відповідно. Так, кількісний вміст плазміногену був в 1,4 рази вищий в групі

125±5 Індекс (S/C) в порівнянні з контрольною групою з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C). Обидві групи показали значні відмінності від групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C). В той час як, кількісний вміст плазміногену в групі з титром 10±3 Індекс (S/C) був в 1,34 рази нижчим у порівнянні із контрольною групою з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C) (рис.3.19).

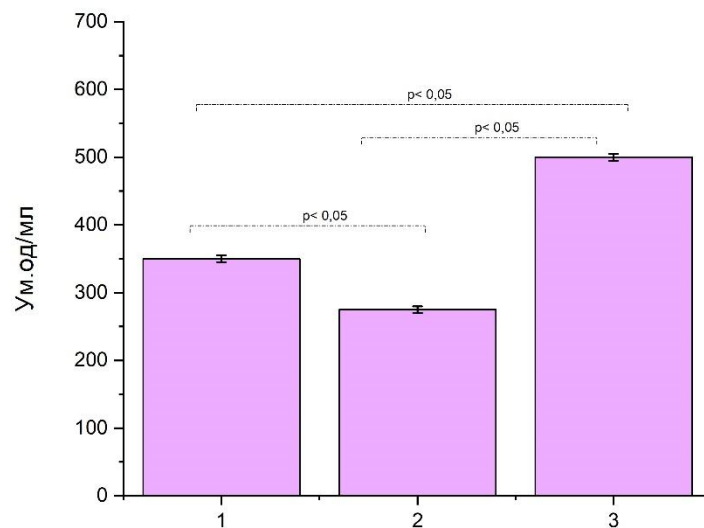


Рис.3.19. Кількісний вміст плазміногену в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1- 0; 2 – 10 ± 3; 3 – 125 ± 5.

Отже, першим етапом нашого дослідження фібринолітичної ланки системи гемостазу був аналіз потенційної активності та рівня плазміногену як основного компонента фібринолітичної відповіді. Зниження потенційної активності плазміногену може призводити до тромбоутворення під час вірусних та бактеріальних інфекцій, і COVID-19 не є винятком [131]. Наші результати описують відмінні значення цих показників між групами з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Ми встановили, що аномальні рівні плазміногену зберігаються і можуть бути предиктором тромботичних ускладнень та фібринолітичного дисбалансу після COVID-19.

tPA є прямим фактором активації плазміногену, який необхідно вимірювати аналогічно до попередніх тестів для повноти нашого дослідження. Це єдина протеїназа системи гемостазу, яка постійно секретується ендотеліальними клітинами в активній формі [132]. Синтезується tPA ендотеліальними клітинами стінок, головним чином, малих вен, хоча синтез відбувається і в малих артеріях, великих венах, а також у лімфатичних судинах. Секреція tPA у кров'яне русло забезпечується двома механізмами: швидким вивільненням із клітинного пулу, де він накопичується або тривалим шляхом - синтезом *de novo*. tPA відіграє важливу роль у видаленні внутрішньосудинних відкладень фібрину і має кілька фізіологічних функцій та патологічних активностей у мозку. Його продукція багатьма іншими типами клітин свідчить про те, що tPA має додаткові функції за межами судинної та центральної нервової системи. Активність tPA регулюється на рівні транскрипції його гена, стабільності його мРНК і трансляції, зберігання і регульованого вивільнення, взаємодії з кофакторами, які посилюють його активність, інгібування інгібіторами, такими як інгібітор активатора плазміногену типу 1 або нейросерпін, а також виведення його рецепторами кліренсу. Транскрипція гена tPA модулюється великою кількістю гормонів, факторів росту, цитокінів або лікарських засобів.

Ми порівняли результати якісного аналізу та потенційну активність tPA між групами донорів відповідно. На рис.3.20 представлені найбільш значущі зміни в потенційній активності tPA в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 і 175 ± 5 Індекс (S/C), які є мінімальним і максимальним значеннями серед груп донорів з титрами не менше 10 ± 3 Індекс (S/C). Однак, лише в групі 175 ± 5 Індекс (S/C) з найвищою потенційною активністю tPA було виявлено різницю на 2,8 разів щодо групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C).

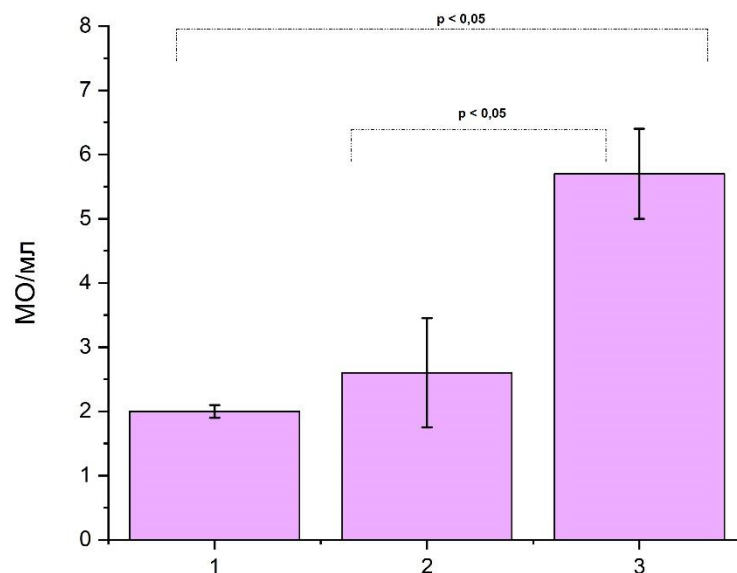


Рис. 3.20. Потенційна активність тканинного активатора плазміногену в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C):
1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 175 ± 5 .

На рис. 3.21 представлено мінімальний та максимальний кількісні рівні tPA в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 та 75 ± 5 Індекс (S/C), відповідно. Статистично значущі зміни спостерігалися між названими групами, особливо у порівнянні з групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C). Так кількісний вміст tPA в групі 75 ± 5 Індекс (S/C) був в 1,5 рази вищим у порівнянні з контрольною групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C). В той час, як кількісний вміст tPA в групі 55 ± 5 Індекс (S/C) був в 1,8 разів нижчим у порівнянні з контрольною групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C).

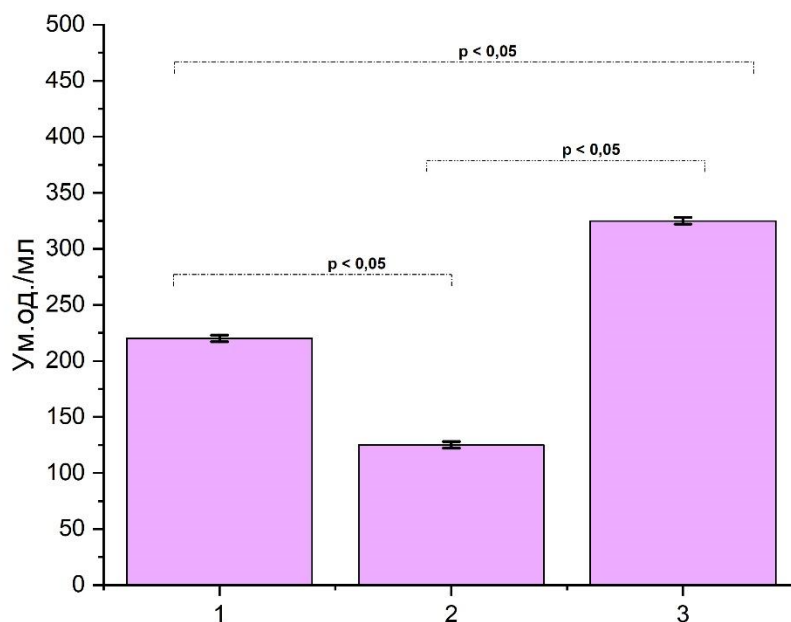


Рис. 3.21. Кількісний вміст тканинного активатора плазміногену в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C):

1 – 0; 2 – 55 ± 5; 3 – 75 ± 5.

Вимірювання потенційної активності та рівня tPA є необхідним для виявлення потенційних змін на початку активації плазміногену, що може в подальшому вплинути на фібринолітичні процеси. Ми підтвердили зміни в групах донорів і відмінності від групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C).

Наступні дослідження продемонстрували потенційну інгібіторну активність та зміни рівня інгібіторів фібринолізу, таких як PAI-1 та α_2 -АП. PAI-1 є одноланцюговим глікопротеїном із молекулярною масою 52 кДа, що складається з 379 амінокислотних залишків, належить до типу інгібіторів серинових протеїназ (серпінів) і є головним інгібітором активаторів плазміногену в плазмі крові. Однак тепер відомо, що цей інгібітор функціонує і бере участь у багатьох (пато)фізіологічних процесах, включаючи запалення, загоєння ран, клітинну адгезію і пухлинну прогресію. Протягом останніх

кількох десятиліть різноманітні функції цього серпину були відкриті і тепер він вважається важливим гравцем у багатьох хвороботворних процесах. PAI-1 експресується багатьма типами клітин, включаючи мегакаріоцити і тромбоцити, адипоцити, ендотеліальні клітини, гепатоцити і гладком'язові клітини. У кровообігу PAI-1 існує у двох пулах: у плазмі крові та в α -гранулах тромбоцитів. Тромбоцитарний PAI-1 секретується після активації з утриманням інгібітора на активованій мембрані тромбоцитів. Крім того, ці ануклеарні літини містять мРНК PAI-1, що дозволяє синтезувати його *de novo*. Окрім традиційної ролі PAI-1 у фібринолізі, цей серпін також відіграє важливу роль у метаболічному синдромі, ожирінні, діабеті, а останнім часом – доведено його участь в ГРДС у тому числі при COVID-19 [133].

PAI-1 інгібує активатори плазміногену, такі як tPA та uPA, тому вимірювання його рівня було важливим для нашої роботи. Група донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C) мала максимальний рівень PAI-1, а група донорів з титром 65 ± 5 Індекс (S/C) – мінімальне значення цього показника. Однак лише група донорів з максимальним рівнем PAI-1 статистично відрізнялася від референтної групи (рис. 3.22). Таким чином рівень PAI-1 був в 1,3 рази вищим в групі донорів з титром 75 ± 5 Індекс (S/C) у порівнянні з контрольною групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C). В той час як мінімальне значення показника в групі донорів з титром 65 ± 5 Індекс (S/C) не показало статистично достовірної різниці у порівнянні з контрольною групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C).

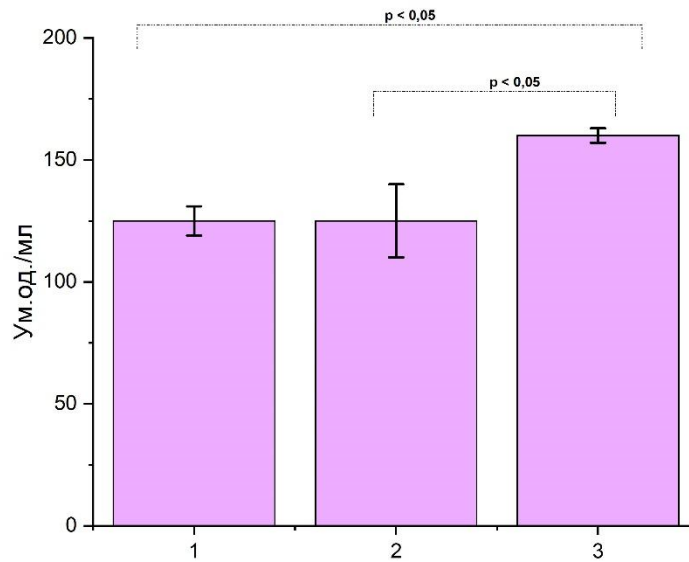


Рис.3.22. Кількісний вміст інгібітор активатору плазміногену- 1 в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 65 ± 5; 3 – 75 ± 5.

Центральне місце в персистуючій природі мікротромбів при довготривалому COVID-19 (на додаток до простої стійкості до протеолізу амілоїдоподібних білків [134], що захоплюють молекули запалення), є дисбаланс плазміну та α_2 -АП в осіб з довготривалим COVID-19. Попередні дослідження виявили, що α_2 -АП потрапляє в пастку всередині мікротромбів [135–136]. Ця молекула заважає оптимальному функціонуванню фібринолітичної системи та перешкоджає перетравленню патологічних тромбів, які спричиняють тромбоз мікросудин, тим самим підвищуючи ризик тромбоемболічних подій [135–136]. Високий рівень α_2 -АП, надшвидкого ковалентного інгібітора плазміну, підвищує ризик несприятливого результату при серцево-судинних захворюваннях [137].

Тому ми виміряли інгібіторний потенціал α_2 -АП у плазмі крові донорів із досліджуваних груп. Максимальний та мінімальний інгібіторний потенціал було виявлено в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10±3 та 65±5

Індекс (S/C), відповідно. Крім того, були виявлені статистично значущі зміни порівняно з референтною групою, тобто групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C) (рис. 3.23.). Таким чином максимальний інгібіторний потенціал α_2 -АП був зафіксований в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C), що в 1,3 рази було вищим за відповідне значення даного показника в контрольній групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C). В той же час мінімальне значення інгібіторного потенціал α_2 -АП було зафіксований в групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 Індекс (S/C), що було меншим в 1,85 рази в порівнянні з контрольною групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C).

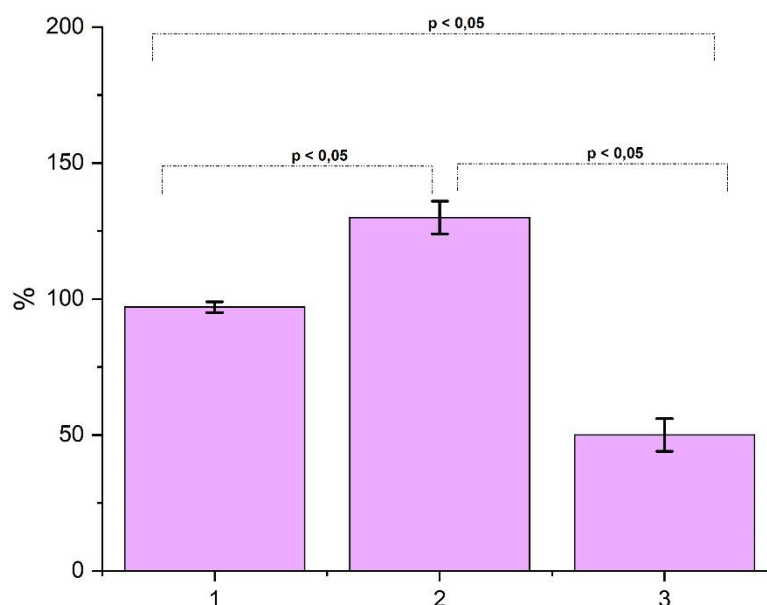


Рис.3.23 Інгібіторний потенціал α_2 -антиплазміну в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 65 ± 5

РАІ-1 є найважливішим і найшвидшим інгібітором активації tРА. Загалом, зміни рівня РАІ-1 негативно впливають як на активацію плазміногену, так і на фібринолітичну відповідь [138]. Наші результати

показали, що максимальний рівень PAI-1 був вищим за референтну точку, тобто групу донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C), що може бути сигналом пригнічення фібринолітичного процесу. Подібна ситуація спостерігалася і при вимірюванні інгібіторного потенціалу α_2 -АП, який синергічно взаємодіє з іншими інгібіторами, в тому числі з PAI-1 [139]. Це свідчить про низький інгібіторний потенціал у деяких групах донорів, що може бути спричинено як нормальними реакціями згортання крові, так і наявністю зовнішніх факторів, таких як синтез антитіл та/або продуктів протеолізу, які можуть призвести до порушення фібринолітичної відповіді. Для отримання остаточної відповіді на ці питання необхідно провести додаткові дослідження.

З огляду на вищезазначене, ми вирішили виміряти загальну активність ключових інгібіторів протеаз, зокрема α_2 -МГ та α_1 -АТ, у плазмі крові груп донорів. Універсальний інгібітор протеїназ α_2 -МГ, який проявляє противірусну та імуномодулюючу активність, вважається важливим учасником інфекційного процесу. Активність α_2 -МГ при новій коронавірусній інфекції та постковідному синдромі (тривалому COVID) досі не вивчалася. α_2 -МГ бере участь у захисті організму від вірусних, грибкових та бактеріальних інфекцій, блокуючи активність ферментів і запобігаючи проникненню патогенів у клітину [140]. Інгібуючий потенціал α_2 -МГ відносно невеликий, але він є необхідним доповненням до функцій інгібітора α_1 -протеїнази, який забезпечує 90% інгібуючої активності плазми крові. Як α_1 -АТ, так і α_2 -МГ мають широкий спектр регуляторних властивостей, у тому числі імуномодулюючих. При цьому комплекси α_2 -МГ з протеїназами мають короткий період напіврозпаду, тоді як комплекси з α_1 -АТ виводяться з кровообігу значно довше, і ефекти відтермінуються. Окрім інгібування протеїназ, α_2 -МГ зв'язує цитокіни IL-6 та IL-18, IL-4 та IL-10, бере участь в регуляції активності імунної системи [141–142], а також відіграє важливу роль у гемостазі як інгібітор тромбіну [143]. Визначення присутності комплексу α_2 -МГ з тромбіном можна використовувати для оцінки тромбінемії. Противірусні

та імунорегуляторні властивості роблять α_2 -МГ та α_1 -АТ важливими факторами патогенезу коронавірусної інфекції, що супроводжується гіперзапаленням, цитокіновим штормом, тромбофілією, тромбозом та його ускладненнями. Вивчення активності α_2 -МГ під час інфікування SARS-CoV-2 та у постковідному періоді має як теоретичне, так і практичне значення.

Мінімальний і максимальний інгібіторні потенціали α_2 -МГ були визначені в групах донорів з Індексом (S/C) 10 ± 3 і 55 ± 5 , відповідно, причому ці значення були вищими за показники референтної точки в 10,8 та 5,9 разів відповідно (рис. 3.24).

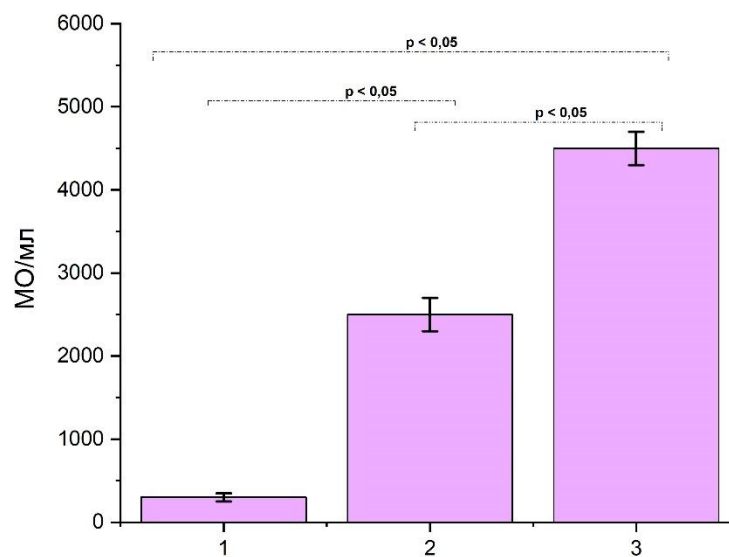


Рис.3.24. Інгібіторний потенціал α_2 -макроглобуліну в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 10 ± 3 ; 3 – 55 ± 5 .

Крім того, групи донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 та 65 ± 5 Індекс (S/C) мали максимальний та мінімальний інгібуючий потенціал α_1 -АТ, відповідно. Значення інгібіторного потенціалу з максимальним значенням в

групі з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 55 ± 5 Індекс (S/C) було в 1,2 рази вищим за значення в контрольній групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C) (рис. 3.24), в той час як мінімальне значенням в групі з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 Індекс (S/C) було в 1,3 рази нижчим за значення в контрольній групі донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C).

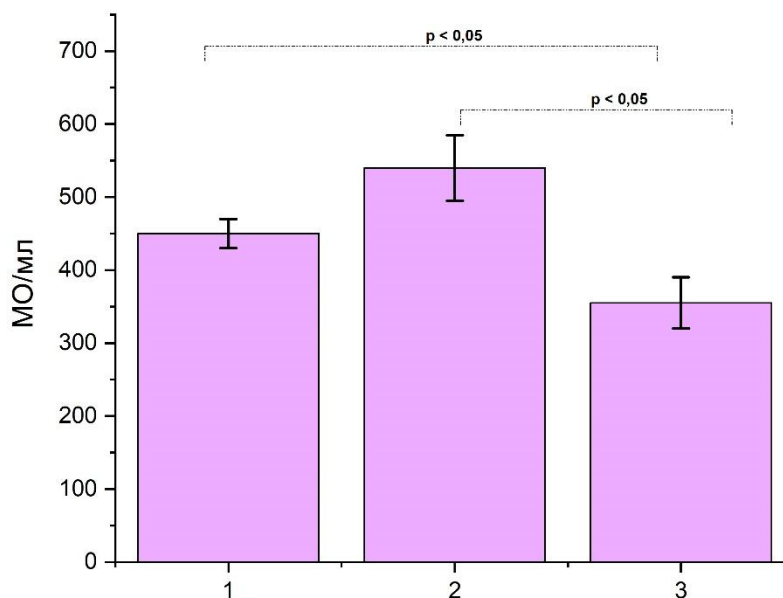


Рис. 3.25. Інгібіторний потенціал α_1 -антитрипсину в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG, Індекс (S/C): 1 – 0; 2 – 55 ± 5 ; 3 – 65 ± 5 .

Підвищення інгібіторного потенціалу α_2 -МГ в групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG не менше 10 ± 3 Індекс (S/C) може свідчити про дисбаланс у регуляції системи інгібіторів протеаз, зокрема, про нездатність активувати найкритичніші компоненти фібринолізу, такі як плазміноген і tPA. Таким чином, ці показники могли бути спричинені розвитком пост-ковідних станів, включаючи накопичення різних субпопуляцій антитіл. Висока активність α_2 -МГ у постковідному періоді може супроводжуватися появою неврологічних та дерматологічних симптомів. Отримані результати можуть

бути використані для моніторингу перебігу постковідного періоду та виявлення груп ризику розвитку ускладнень.

У літературі повідомляється про потенційний вплив пулів антитіл на систему гемостазу при захворюваннях, спричинених вірусними та бактеріальними агентами. У переважній більшості випадків циркулюючі антифосфоліпідні антитіла в крові призводять до мікротромбозів і макротромбозів. Цікаво, що існують повідомлення про нестабільні функції фібринолітичної системи при антифосфоліпідному синдромі. Підвищення рівня PAI-1 спостерігали *in vitro* в присутності антитіл до 2-глікопротеїну I IgG [144]. В іншому дослідженні повідомляється про інгібуючу здатність антитіл до 2-глікопротеїну I IgG проти tPA-опосередкованої активації плазміногену [145]. Розвиток антифосфоліпідного синдрому часто пов'язаний з такими захворюваннями, як гепатит В, гепатит С та ВІЛ [146]. Крім того, антифосфоліпідний IgG був виявлений у плазмі крові пацієнтів з інсультом під час COVID-19 [147]. У деяких дослідженнях описано синтез антитіл проти компонентів коагуляції у пацієнтів з розсіяним склерозом. Ці антитіла можуть бути специфічними до антикоагулянтних медіаторів та серинових протеаз [113]. Ми припускаємо, що імунна система здатна виробляти антитіла проти аномальних компонентів гемостазу внаслідок порушення протеолізу при постковідних станах.

Виявлені відмінності залежали від титру анти-SARS-CoV-2 IgG. Цей прогноз підтвердився за результатами дослідження коагуляційних та фібринолітичних показників. Ми припускаємо, що вироблення анти-SARS-CoV-2 IgG є основним фактором, що зумовлює нездатність фібринолітичної системи належним чином функціонувати. Більше того, ми припускаємо, що фракція IgG може запускати неправильний протеоліз, що призводить до утворення аномальних форм білків, у тому числі в системі гемостазу. Ці процеси впливають на імунну систему і призводять до вироблення аутоантитіл. Ми припускаємо, що загальні фракції антитіл інгібують систему

згортання крові, однак для остаточного підтвердження цього необхідно провести додаткові дослідження обраних антитіл.

У цьому розділі ми надали первинні результати дослідження дисфункції фібринолітичної системи у групах донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Отримані дані підтвердили дисбаланс активності та кількісних значень показників фібринолізу, що може призводити до пригнічення перетворення плазміногену на плазмін для розщеплення фібринових згустків. Наразі у багатьох дослідженнях спостерігається розвиток коагуляційних порушень у пацієнтів, які перенесли COVID-19, однак результати, подібні до нашого дослідження, не відомі. Унікальність нашого дослідження полягає в тому, що учасниками були донори без будь-яких патологічних процесів, а критичною відмінністю був титр анти-SARS-CoV-2 IgG. Тому будь-які виявлені зміни можуть залежати від титру анти-SARS-CoV-2 IgG.

Для підтвердження прогнозу залежності від титру анти-SARS-CoV-2 IgG корисним був відбір груп донорів з максимальними та мінімальними значеннями досліджуваних параметрів. Очевидно, що максимальні та мінімальні значення досліджуваних параметрів у групах з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG не менше 10 ± 3 Індекс (S/C) не завжди свідчать про збільшення/зменшення порівняно з референтною точкою. У деяких випадках, таких як мінімальні значення потенційної активності плазміногену, активності tPA та рівня PAI-1, виявлені зміни не відрізнялися порівняно з групою донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 0 Індекс (S/C). Цікаво, що максимальний і мінімальний інгібіторні потенціали α_2 -МГ були вищими, ніж у контрольній групі.

Підсумки: Представлені результати підтверджують наявність коагуляційних розладів у пост-ковідному періоді. Циркулюючі в крові фракції IgG можуть бути ключовою та важливою причиною змін показників плазмолізу, що можуть призводити до тромбоутворення. Ми припускаємо, що анти-SARS-CoV-2 IgG можуть бути механізмом порушення коагуляції, який

впливає на імунну систему, стимулюючи вироблення антитіл до компонентів гемостазу.

Визначені максимальні та мінімальні значення показників фібринолізу в групах донорів відрізнялися не тільки між собою, але й від групи донорів (референтної точки). Нам вдалось продемонструвати залежність активності та кількісних значень активаторів та інгібіторів фібринолізу від титру анти-SARS-CoV-2 IgG, які можуть впливати на аномальні реакції, такі як перетворення плазміногену на плазмін та розщеплення полімерів фібрину плазміном.

Також нами була надана загальна характеристика показників фібринолізу в групах донорів відповідно до титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. Наразі існують певні обмеження для повного підтвердження нашого прогнозу щодо впливу фракції IgG на порушення коагуляції в пост-ковідному періоді. Однак ми плануємо провести певну кількість експериментів *in vivo* та *in vitro* з використанням безпосередньо очищених фракцій IgG з плазми донорської крові. Майбутні дослідження зможуть підтвердити наші попередні висновки, включаючи механізм змін у фібринолітичній системі в групах донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

COVID-19 є серйозною загрозою для здоров'я у всьому світі, оскільки інфекція SARS-CoV-2 може викликати синдроми поліорганної дисфункції.

Пост-ковідний період або тривалий COVID-19 є серйозним тягарем для глобальної системи охорони здоров'я, його симптоми суттєво впливають на фізичні та когнітивні функції, якість життя та участь у життєдіяльності суспільства [148–151].

Механізми персистуючих симптомів COVID-19 можна віднести до 1) вірусної персистенції, 2) мікроклітинної гіперактивності аутоантитілами, 3) імунною дисрегуляцією, 4) поширеним ураженням органів і 5) реактивацією вірусів [152–154].

На сьогоднішній день доведено, що порушення системи гемостазу у пацієнтів з гострою SARS-CoV-2-інфекцією є основною причиною тромбоемболічних подій та гіперкоагуляції, що призводять до смерті пацієнтів [155]. Процес одужання від COVID-19 займає тривалий час і пов'язаний зі стабільно високим ризиком ускладнень з боку багатьох систем, у тому числі системи гемостазу. Існує значна кількість літератури, присвяченої вивченню патогенетичних механізмів розвитку SARS-CoV-2-інфекції протягом гострого періоду захворювання [156]. Однак при більш детальному розгляді літератури, присвяченої постковідному періоду, виявляється брак інформації про механізми, що лежать в основі підвищеного тромбогенного потенціалу плазми крові людей, які успішно одужали від COVID-19. Безсумнівно, причини постковідних порушень гемостазу є багатофакторними та опосередкованими різними взаємопідсилюючими механізмами. Виявлення тригерів порушень гемостазу, а також пошук інформативних показників для оцінки стану системи гемостазу, є важливим для забезпечення правильної клінічної стратегії та своєчасного втручання при тяжких ускладненнях.

Враховуючи результати досліджень щодо існування кореляції між рівнем окремих субпопуляцій антитіл та підвищеним ризиком розвитку коагулопатії у пацієнтів з різною патологією [157–158], а також беручи до уваги наші дослідження зв'язку між рівнем антитіл в плазмі крові пацієнтів з розсіяним склерозом та ішемічним інсультом [159] і активністю ключових факторів гемостазу [113], дослідження було присвячено аналізу ключових параметрів гемостазу в плазмі крові донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG. Наскільки нам відомо, в попередніх дослідженнях не вивчався можливий зв'язок між змінами вмісту та (або) активності факторів гемостазу та рівнями анти SARS-CoV-2 IgG у постковідний період.

Досліджуючи ключові антикоагуляційні параметри донорської плазми в постковідний період, було встановлено, що зміни концентрації та активності АТІІІ, ПС та ТМ залежать від титрів анти-SARS-CoV-2 IgG. Це є потенційною причиною тривалих тромботичних ускладнень після одужання. Титри анти-SARS-CoV-2 IgG є єдиним критичним фактором для можливих порушень коагуляції в досліджуваних групах донорів. Хоча ми підтвердили дисфункцію природних антикоагулянтів у групах донорів, у подальшому ми маємо на меті дослідити фракцію субпопуляційних антитіл IgG безпосередньо за допомогою експериментів *in vivo* та *in vitro*. Таким чином, ми зможемо відповісти на питання щодо ускладнень гемостазу після COVID-19. Це зробить внесок у вивчення механізмів розвитку постковідних станів

Детальне вивчення антикоагуляційних параметрів здорових людей з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG підкреслює необхідність широкої клінічної діагностики в пост-ковідному періоді. Наше дослідження було обмежене кількістю включених учасників. Тому, якщо буде зареєстровано більше інформації про стан антикоагулянтних параметрів у людей в пост-ковідному періоді, ми зможемо зробити конкретні висновки щодо впливу анти-SARS-CoV-2 IgG на функціональні процеси коагуляції.

Процеси системного запалення та гіперкоагуляції є взаємозалежними, про що свідчать перехресні зв'язки між цими системами. За нормальних фізіологічних умов ці системи функціонують як захисні механізми і ретельно регулюються. Дисрегуляція може відбуватися в цих системах внаслідок хронічного системного запалення та тромботичних ускладнень. Коли патоген проникає в організм або відбувається пошкодження тканин, виникає запальна реакція, спрямована на усунення інфекції та сприяння загоєнню і відновленню тканин. Однак, якщо запальний процес не усунути належним чином, гостре запалення може перейти в хронічний стан. Коагуляційний каскад може активуватися через подальше збільшення прозапальних цитокінів. Важливою молекулою в контексті запально-індукованої коагуляції є ТФ [160].

Теназний комплекс, що складається з ТФ і фактора VIIa, активує зовнішній шлях коагуляції, що призводить до утворення тромбіну. Наприкінці коагуляційного каскаду тромбін каталізує перетворення розчинного фібриногену на нерозчинний фібрин. Прозапальні цитокіни можуть регулювати експресію ТФ [161]. Крім того, хронічне системне запалення сприяє пригніченню певних антикоагулянтних механізмів, включаючи антитромбіновий та ПС-залежний шляхи [162–163]. Аналогічно, фібринолітична активність може бути пригнічена через підвищення рівня PAI-1, що стимулюється прозапальними молекулами [163]. Таким чином, хронічне системне запалення може змінювати гемостатичний баланс до протромботичного стану [164].

Порушення коагуляції може модифікувати та пролонгувати запальну реакцію. Коагуляційні протеолітичні ферменти можуть зв'язуватися з рецепторами, що активуються протеазами, на активованому ендотелії та індукувати синтез і експресію молекул клітинної адгезії [165–166]. Ці молекули відіграють важливу роль в екстравазації лейкоцитів до вогнищ запалення. Крім того, активовані фактори коагуляції також можуть провокувати запальну відповідь, взаємодіючи з імунними клітинами та

індукуючи вироблення запальних цитокінів [167–168]. Тромбоцити також відіграють певну роль у регулюванні та посиленні запалення. Запальні молекули можуть зв'язуватися зі специфічними рецепторами на тромбоцитах і активувати їх для вивільнення свого гранульованого вмісту, який складається з прокоагулянтних і прозапальних молекул. Тромбоцити також беруть участь у залученні лейкоцитів і регуляції судинної проникності [169].

ВИСНОВКИ

Результати, представлені у дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі погляди на функціонування ланок системи гемостазу у людей, які перехворіли на COVID-19 та мають різні титри анти-SARS-CoV-2 IgG.

1. Встановлено, що у групах донорів з різними титрами анти-SARS-CoV-2 IgG відбуваються зміни ключових значень системи гемостазу порівняно з контрольною групою донорів в крові яких відсутні антиковідні антитіла.
2. Виявлено, що у донорів, які перехворіли COVID-19, спостерігається пролонгованість ПЧ та АЧТЧ плазми крові, що найбільш характерно було для групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 75 ± 5 Індекс (S/C). В той час як пролонгованість ТТ була характерна для групи донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 Індекс (S/C) Такі результати підтверджують можливий розвиток патологічних ускладнень як на локальному масштабі – зовнішній, внутрішній або загальний шляхи, так і коагуляції, загалом.
3. Дослідження потенційної активності протромбіну плазми крові з використанням активатору екамуліну, особливістю якого є здатність активувати протромбін незалежно від інших факторів згортання крові, показало, що значення даного показника зростає серед усіх дослідних груп, окрім донорів з титром анти-SARS-CoV-2 IgG 125 ± 5 Індекс (S/C). Аналіз якісного складу молекул протромбінового пулу методом хроматографії, що поділяє за розміром, продемонстрував гетерогенність білкових фракцій між експериментальними та контрольною групою. При цьому у групах донорів, у кровотоці яких присутні анти-SARS-CoV-2 IgG, зростає кількість хроматографічних піків, площа під піками та з'являються високомолекулярні білкові фракції.

4. Виявлено, що у групах донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 , 95 ± 5 та 75 ± 5 Індекс (S/C) активність антитромбіну III значно відрізняється від контрольної групи. Підвищення активності АТІІІ було характерним для груп донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 65 ± 5 , а зниження – 75 ± 5 Індекс (S/C). Залежно від титру анти-SARS-CoV-2 IgG серед експериментальних груп змінюється концентрація антитромбіну III відносно контрольної групи. Аналізуючи отримані результати, ми припускаємо, що пост-ковідний період негативно впливає на систему гемостазу, сприяючи розвитку тромботичних ускладнень, що призводить до виснаження антикоагулянтних факторів, ключовим з яких є антитромбін III.
5. Встановлено відмінності в активності та кількісному складі протеїну С між контрольною та експериментальними групами, а також зниження вмісту тромбомодуліну серед таких груп донорів з титрами анти-SARS-CoV-2 IgG 10 ± 3 , 75 ± 5 Індекс (S/C).
6. Проаналізувавши концентрацію фібриногену, розчинних фібрин мономерних комплексі та Д-димеру, ми виявили відмінності між групами донорів залежно від титру анти-SARS-CoV-2 антитіл. Найвища концентрація фібриногену спостерігалась у плазмі крові донорів з титром IgG проти SARS-CoV-2 10 ± 3 індекс (S/C), найнижча – з титром IgG проти SARS-CoV-2 65 ± 5 індекс (S/C). Крім цього, найбільша кількість РФМК характерна для донорів з титром IgG проти SARS-CoV-2 125 ± 5 Індекс (S/C), найменша – з титром IgG проти SARS-CoV-2 55 ± 5 Індекс (S/C). А, концентрація Д-димеру найбільше зросла у донорів з титром IgG проти SARS-CoV-2 55 ± 5 Індекс (S/C), тоді як у групах з титрами IgG проти SARS-CoV-2 85 ± 5 , а в групі донорів з титром 175 ± 5 Індекс (S/C) – була найменшою порівняно з донорами, у кровотоці яких не було анти-SARS-CoV-2 IgG.
7. Якісний аналіз фракцій РФМК та протромбінового пулу демонструє відмінності білкового складу серед груп донорів. Фракції РФМК,

отримані з плазми крові донорів при наявності анти-SARS-CoV-2 IgG, характеризується більшою кількістю піків порівняно з групою донорів, у яких відсутні анти-SARS-CoV-2 IgG. Схожа ситуація спостерігається у якісному складі фракцій вітамін К-залежних білків, отриманих з плазми донорів за умови наявності у кровотоці анти-SARS-CoV-2 IgG: кількість хроматографічних піків зростає порівняно з групою донорів, у яких не було анти-SARS-CoV-2 IgG, крім цього у групі з титром IgG проти SARS-CoV-2 65 ± 5 Індекс (S/C) виявлено високомолекулярні білки (361, 225, 118 кДа), а у донорів з титром IgG проти SARS-CoV-2 195 ± 5 була присутня білкова фракція з молекулярною масою 139 кДа.

8. Отримані результати дозволяють зробити висновок про певний вплив циркулюючих у кровотоці IgG проти SARS-CoV-2 на функціонування системи гемостазу, що може бути потенційною загрозою появи/розвитку гострих коронарних синдромів та порушень мозкового кровообігу. Результати експериментів підтверджують необхідність отримання фракцій IgG та дослідження їх потенційного впливу на функціонування системи гемостазу на модельних системах *in vitro* та *in vivo*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] T. Thaweethai *et al.*, “Development of a Definition of Postacute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection,” *JAMA*, vol. 329, no. 22, pp. 1934–1946, Jun. 2023, doi: 10.1001/JAMA.2023.8823.
- [2] A. Nalbandian *et al.*, “Post-acute COVID-19 syndrome,” *Nat Med*, vol. 27, no. 4, pp. 601–615, Apr. 2021, doi: 10.1038/S41591-021-01283-Z.
- [3] M. Michelen *et al.*, “Characterising long COVID: a living systematic review,” *BMJ Glob Health*, vol. 6, no. 9, Sep. 2021, doi: 10.1136/BMJGH-2021-005427.
- [4] G. Wallukat *et al.*, “Functional autoantibodies against G-protein coupled receptors in patients with persistent Long-COVID-19 symptoms,” *J Transl Autoimmun*, vol. 4, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.JTAUTO.2021.100100.
- [5] D. Bertin *et al.*, “Persistent IgG anticardiolipin autoantibodies are associated with post-COVID syndrome,” *Int J Infect Dis*, vol. 113, pp. 23–25, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.IJID.2021.09.079.
- [6] M. E. Colling and Y. Kanthi, “COVID–19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms,” *Vasc Med*, vol. 25, no. 5, p. 471, Oct. 2020, doi: 10.1177/1358863X20932640.
- [7] A. Wiedemann *et al.*, “Long-lasting severe immune dysfunction in Ebola virus disease survivors,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41467-020-17489-7.
- [8] I. Hickie *et al.*, “Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study,” *BMJ*, vol. 333, no. 7568, pp. 575–578, Sep. 2006, doi: 10.1136/BMJ.38933.585764.AE.
- [9] E. S. Paixão *et al.*, “Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis,” *Trans R Soc Trop Med Hyg*, vol. 112, no. 7, pp. 301–316, Jul. 2018, doi: 10.1093/TRSTMH/TRY063.

- [10] H. Patel, B. Sander, and M. P. Nelder, “Long-term sequelae of West Nile virus-related illness: a systematic review,” *Lancet Infect Dis*, vol. 15, no. 8, pp. 951–959, Aug. 2015, doi: 10.1016/S1473-3099(15)00134-6.
- [11] D. A. Trojan and N. R. Cashman, “Post-poliomyelitis syndrome,” *Muscle Nerve*, vol. 31, no. 1, pp. 6–19, Jan. 2005, doi: 10.1002/MUS.20259.
- [12] M. Aggarwal, J. Dass, and M. Mahapatra, “Hemostatic Abnormalities in COVID-19: An Update,” *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion*, vol. 36, no. 4, p. 616, Oct. 2020, doi: 10.1007/S12288-020-01328-2.
- [13] M. Ulanowska and B. Olas, “Modulation of Hemostasis in COVID-19; Blood Platelets May Be Important Pieces in the COVID-19 Puzzle,” *Pathogens*, vol. 10, no. 3, Mar. 2021, doi: 10.3390/PATHOGENS10030370.
- [14] G. Kasinathan and J. Sathar, “Haematological manifestations, mechanisms of thrombosis and anti-coagulation in COVID-19 disease: A review,” *Ann Med Surg (Lond)*, vol. 56, pp. 173–177, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.AMSU.2020.06.035.
- [15] Y. J. Hou *et al.*, “SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract,” *Cell*, vol. 182, no. 2, pp. 429-446.e14, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.CELL.2020.05.042.
- [16] W. Wang *et al.*, “Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens,” *JAMA*, vol. 323, no. 18, pp. 1843–1844, May 2020, doi: 10.1001/JAMA.2020.3786.
- [17] A. R. Bourgonje *et al.*, “Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19),” *J Pathol*, vol. 251, no. 3, pp. 228–248, Jul. 2020, doi: 10.1002/PATH.5471.
- [18] L. Carsana *et al.*, “Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study,” *Lancet Infect Dis*, vol. 20, no. 10, pp. 1135–1140, Oct. 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5.

- [19] L. Carsana *et al.*, “Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study,” *Lancet Infect Dis*, vol. 20, no. 10, pp. 1135–1140, Oct. 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5.
- [20] S. S. Batah and A. T. Fabro, “Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians,” *Respir Med*, vol. 176, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.RMED.2020.106239.
- [21] K. Y. Lee, “A Common Immunopathogenesis Mechanism for Infectious Diseases: The Protein-Homeostasis-System Hypothesis,” *Infect Chemother*, vol. 47, no. 1, p. 12, 2015, doi: 10.3947/IC.2015.47.1.12.
- [22] N. D. Ferguson *et al.*, “The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material,” *Intensive Care Med*, vol. 38, no. 10, pp. 1573–1582, 2012, doi: 10.1007/S00134-012-2682-1.
- [23] S. S. Hasan *et al.*, “Mortality in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome and corticosteroids use: a systematic review and meta-analysis,” *Expert Rev Respir Med*, vol. 14, no. 11, pp. 1149–1163, Nov. 2020, doi: 10.1080/17476348.2020.1804365.
- [24] S. A. Livingstone *et al.*, “Coagulation Dysfunction in Acute Respiratory Distress Syndrome and Its Potential Impact in Inflammatory Subphenotypes,” *Front Med (Lausanne)*, vol. 8, Aug. 2021, doi: 10.3389/FMED.2021.723217.
- [25] M. Ackermann *et al.*, “Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19,” *N Engl J Med*, vol. 383, no. 2, pp. 120–128, Jul. 2020, doi: 10.1056/NEJMOA2015432.
- [26] D. A. Dorward *et al.*, “Tissue-specific immunopathology in fatal COVID-19,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 203, no. 2, pp. 192–201, Jan. 2021, doi: 10.1164/RCCM.202008-3265OC/SUPPL_FILE/DISCLOSURES.PDF.
- [27] L. Carsana *et al.*, “Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study,” *Lancet Infect Dis*,

- vol. 20, no. 10, pp. 1135–1140, Oct. 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5.
- [28] L. P. Hariri *et al.*, “Lung Histopathology in Coronavirus Disease 2019 as Compared With Severe Acute Respiratory Syndrome and H1N1 Influenza: A Systematic Review,” *Chest*, vol. 159, no. 1, pp. 73–84, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.CHEST.2020.09.259.
- [29] H. Seo, J. Jung, M. J. Kim, S. J. Jang, and S. H. Kim, “Radiologically Suspected Organizing Pneumonia in a Patient Recovering from COVID-19: A Case Report,” *Infect Chemother*, vol. 54, no. 1, p. 208, Feb. 2022, doi: 10.3947/IC.2021.0013.
- [30] A. Pernazza *et al.*, “Early histologic findings of pulmonary SARS-CoV-2 infection detected in a surgical specimen,” *Virchows Archiv*, vol. 477, no. 5, p. 743, Nov. 2020, doi: 10.1007/S00428-020-02829-1.
- [31] M. Liao *et al.*, “Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19,” *Nat Med*, vol. 26, no. 6, pp. 842–844, Jun. 2020, doi: 10.1038/S41591-020-0901-9.
- [32] M. A. Matthay *et al.*, “Acute respiratory distress syndrome,” *Nat Rev Dis Primers*, vol. 5, no. 1, 2019, doi: 10.1038/S41572-019-0069-0.
- [33] A. Aslan, C. Aslan, N. M. Zolbanin, and R. Jafari, “Acute respiratory distress syndrome in COVID-19: possible mechanisms and therapeutic management,” *Pneumonia (Nathan)*, vol. 13, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S41479-021-00092-9.
- [34] C. Huang *et al.*, “Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China,” *Lancet*, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506, Feb. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [35] C. A. Pfortmueller, T. Spinetti, R. D. Urman, M. M. Luedi, and J. C. Schefold, “COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome (CARDS): Current knowledge on pathophysiology and ICU treatment – A narrative

- review,” *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, vol. 35, no. 3, p. 351, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.BPA.2020.12.011.
- [36] K. E. Swenson and E. R. Swenson, “Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19 Lung Injury,” *Crit Care Clin*, vol. 37, no. 4, p. 749, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.CCC.2021.05.003.
- [37] A. LaPelusa and H. D. Dave, “Physiology, Hemostasis,” *StatPearls*, May 2023, Accessed: Jan. 14, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545263/>
- [38] S. Vinayagam and K. Sattu, “SARS-CoV-2 and coagulation disorders in different organs,” *Life Sci*, vol. 260, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.LFS.2020.118431.
- [39] S. C. Sebag, J. A. Bastarache, and L. B. Ware, “Therapeutic modulation of coagulation and fibrinolysis in acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome,” *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 12, no. 9, pp. 1481–1496, Nov. 2011, doi: 10.2174/138920111798281171.
- [40] R. Tiwari *et al.*, “In silico and in vitro studies reveal complement system drives coagulation cascade in SARS-CoV-2 pathogenesis,” *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 18, pp. 3734–3744, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.CSBJ.2020.11.005.
- [41] J. D. Vanderwerf and M. A. Kumar, “Management of neurologic complications of coagulopathies,” *Handb Clin Neurol*, vol. 141, pp. 743–764, 2017, doi: 10.1016/B978-0-444-63599-0.00040-5.
- [42] H. Mei, L. Luo, and Y. Hu, “Thrombocytopenia and thrombosis in hospitalized patients with COVID-19,” *J Hematol Oncol*, vol. 13, no. 1, pp. 1–3, Dec. 2020, doi: 10.1186/S13045-020-01003-Z/METRICS.
- [43] W. Miesbach and M. Makris, “COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation,” *Clin Appl Thromb Hemost*, vol. 26, 2020, doi: 10.1177/1076029620938149.

- [44] F. Al-Ani, S. Chehade, and A. Lazo-Langner, “Thrombosis risk associated with COVID-19 infection. A scoping review,” *Thromb Res*, vol. 192, pp. 152–160, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.THROMRES.2020.05.039.
- [45] N. Benito *et al.*, “Pulmonary Thrombosis or Embolism in a Large Cohort of Hospitalized Patients With Covid-19,” *Front Med (Lausanne)*, vol. 7, Aug. 2020, doi: 10.3389/FMED.2020.00557.
- [46] T. Iba, J. H. Levy, M. Levi, J. M. Connors, and J. Thachil, “Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019,” *Crit Care Med*, vol. 48, no. 9, pp. 1358–1364, Sep. 2020, doi: 10.1097/CCM.0000000000004458.
- [47] J. Xu *et al.*, “Dynamic Changes in Coagulation Function in Patients With Pneumonia Under Admission and Non-admission Treatment,” *Front Med (Lausanne)*, vol. 8, p. 626384, May 2021, doi: 10.3389/FMED.2021.626384.
- [48] A. S. M. Dofferhoff *et al.*, “Reduced Vitamin K Status as a Potentially Modifiable Risk Factor of Severe Coronavirus Disease 2019,” *Clin Infect Dis*, vol. 73, no. 11, pp. E4039–E4046, Dec. 2021, doi: 10.1093/CID/CIAA1258.
- [49] J. Leentjens, T. F. van Haaps, P. F. Wessels, R. E. G. Schutgens, and S. Middeldorp, “COVID-19-associated coagulopathy and antithrombotic agents—lessons after 1 year,” *Lancet Haematol*, vol. 8, no. 7, pp. e524–e533, Jul. 2021, doi: 10.1016/S2352-3026(21)00105-8.
- [50] S. Renzi, G. Landoni, A. Zangrillo, and F. Ciceri, “MicroCLOTS pathophysiology in coronavirus disease 2019,” *Korean J Intern Med*, vol. 38, no. 4, p. 570, Jul. 2023, doi: 10.3904/KJIM.2020.336.
- [51] C. Kannemeier *et al.*, “Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no. 15, pp. 6388–6393, Apr. 2007, doi: 10.1073/PNAS.0608647104.
- [52] H. Han *et al.*, “Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors,” *Emerg Microbes Infect*, vol. 9, no. 1, pp. 1123–1130, Jan. 2020, doi: 10.1080/22221751.2020.1770129.

- [53] J. M. L. Stouthard *et al.*, “Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans,” *Thromb Haemost*, vol. 76, no. 5, pp. 738–742, 1996, doi: 10.1055/S-0038-1650653/ID/JR_6/BIB.
- [54] M. G. Lazzaroni *et al.*, “Coagulation dysfunction in COVID-19: The interplay between inflammation, viral infection and the coagulation system,” *Blood Rev*, vol. 46, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.BLRE.2020.100745.
- [55] J. K. Salabei, T. J. Fishman, Z. T. Asnake, A. Ali, and U. G. Iyer, “COVID-19 Coagulopathy: Current knowledge and guidelines on anticoagulation,” *Heart & Lung*, vol. 50, no. 2, pp. 357–360, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.HRTLNG.2021.01.011.
- [56] J. Zhu *et al.*, “Coagulation dysfunction is associated with severity of COVID-19: A meta-analysis,” *J Med Virol*, vol. 93, no. 2, pp. 962–972, Feb. 2021, doi: 10.1002/JMV.26336.
- [57] H. chun Luo, C. yan You, S. wei Lu, and Y. qiang Fu, “Characteristics of coagulation alteration in patients with COVID-19,” *Ann Hematol*, vol. 100, no. 1, pp. 45–52, Jan. 2021, doi: 10.1007/S00277-020-04305-X.
- [58] J. Lin *et al.*, “COVID-19 and coagulation dysfunction in adults: A systematic review and meta-analysis,” *J Med Virol*, vol. 93, no. 2, pp. 934–944, Feb. 2021, doi: 10.1002/JMV.26346.
- [59] L. A. van Vught *et al.*, “Consumptive coagulopathy is associated with a disturbed host response in patients with sepsis,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 19, no. 4, pp. 1049–1063, Apr. 2021, doi: 10.1111/JTH.15246.
- [60] R. Amraei and N. Rahimi, “COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction,” *Cells 2020, Vol. 9, Page 1652*, vol. 9, no. 7, p. 1652, Jul. 2020, doi: 10.3390/CELLS9071652.
- [61] J. M. Pérez Sáez *et al.*, “Characterization of a neutralizing anti-human galectin-1 monoclonal antibody with angioregulatory and immunomodulatory

- activities,” *Angiogenesis*, vol. 24, no. 1, Feb. 2021, doi: 10.1007/S10456-020-09749-3.
- [62] S. E. Ward *et al.*, “ADAMTS13 regulation of VWF multimer distribution in severe COVID-19,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 19, no. 8, pp. 1914–1921, Aug. 2021, doi: 10.1111/jth.15409.
- [63] R. Wölfel *et al.*, “Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019,” *Nature*, vol. 581, no. 7809, pp. 465–469, May 2020, doi: 10.1038/S41586-020-2196-X.
- [64] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, and S. Lu, “Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19,” *J Pharm Anal*, vol. 10, no. 2, pp. 102–108, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.JPHA.2020.03.001.
- [65] Z. Li *et al.*, “Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis,” *J Med Virol*, vol. 92, no. 9, pp. 1518–1524, Sep. 2020, doi: 10.1002/JMV.25727.
- [66] S. Jiang, C. Hillyer, and L. Du, “Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses,” *Trends Immunol*, vol. 41, no. 5, pp. 355–359, May 2020, doi: 10.1016/J.IT.2020.03.007.
- [67] X. Cao, “COVID-19: immunopathology and its implications for therapy,” *Nat Rev Immunol*, vol. 20, no. 5, pp. 269–270, May 2020, doi: 10.1038/S41577-020-0308-3.
- [68] L. Du, Y. He, Y. Zhou, S. Liu, B. J. Zheng, and S. Jiang, “The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development,” *Nat Rev Microbiol*, vol. 7, no. 3, pp. 226–236, 2009, doi: 10.1038/NRMICRO2090.
- [69] X. Chi *et al.*, “A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2,” *Science*, vol. 369, no. 6504, pp. 650–655, Aug. 2020, doi: 10.1126/SCIENCE.ABC6952.

- [70] N. van Doremalen *et al.*, “ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques,” *Nature*, vol. 586, no. 7830, pp. 578–582, Oct. 2020, doi: 10.1038/S41586-020-2608-Y.
- [71] N. B. Mercado *et al.*, “Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques,” *Nature*, vol. 586, no. 7830, pp. 583–588, Oct. 2020, doi: 10.1038/S41586-020-2607-Z.
- [72] L. Dai *et al.*, “A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS,” *Cell*, vol. 182, no. 3, pp. 722-733.e11, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.CELL.2020.06.035.
- [73] L. Li *et al.*, “Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial,” *JAMA*, vol. 324, no. 5, pp. 460–470, Aug. 2020, doi: 10.1001/JAMA.2020.10044.
- [74] M. S. Suthar *et al.*, “Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients,” *Cell Rep Med*, vol. 1, no. 3, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100040.
- [75] L. Premkumar *et al.*, “The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients,” *Sci Immunol*, vol. 5, no. 48, Jun. 2020, doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABC8413.
- [76] K. Li *et al.*, “Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19,” *Nat Commun*, vol. 11, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/S41467-020-19943-Y.
- [77] X. Xu *et al.*, “Author Correction: Seroprevalence of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in China,” *Nat Med*, vol. 26, no. 9, p. 1494, Sep. 2020, doi: 10.1038/S41591-020-1058-2.

- [78] Z. Zheng, Z. Yao, K. Wu, and J. Zheng, "Patient follow-up after discharge after COVID-19 pneumonia: Considerations for infectious control," *J Med Virol*, vol. 92, no. 11, pp. 2412–2419, Nov. 2020, doi: 10.1002/JMV.25994.
- [79] X. Wang *et al.*, "Clinical features and outcomes of discharged coronavirus disease 2019 patients: a prospective cohort study," *QJM*, vol. 113, no. 9, pp. 657–665, Sep. 2020, doi: 10.1093/QJMED/HCAA178.
- [80] V. Pant, K. Gautam, S. Pradhan, D. Pyakurel, and A. Shrestha, "Hematological and Biochemical Parameters along with IgG Antibody against SARS-CoV-2 in Patients visiting a referral laboratory for recovery check up after COVID-19 infection in Nepal," *J Nepal Health Res Counc*, vol. 19, no. 2, pp. 372–377, Sep. 2021, doi: 10.33314/JNHRC.V19I2.3535.
- [81] A. Carfi, R. Bernabei, and F. Landi, "Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19," *JAMA*, vol. 324, no. 6, pp. 603–605, Aug. 2020, doi: 10.1001/JAMA.2020.12603.
- [82] G. W. Guan *et al.*, "[Exploring the mechanism of liver enzyme abnormalities in patients with novel coronavirus-infected pneumonia]," *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, vol. 28, no. 2, pp. 100–106, Feb. 2020, doi: 10.3760/CMA.J.ISSN.1007-3418.2020.02.002.
- [83] K. Morgan, K. Samuel, M. Vandeputte, P. C. Hayes, and J. N. Plevris, "SARS-CoV-2 Infection and the Liver," *Pathogens*, vol. 9, no. 6, Jun. 2020, doi: 10.3390/PATHOGENS9060430.
- [84] P. Kumar-M *et al.*, "Coronavirus disease (COVID-19) and the liver: a comprehensive systematic review and meta-analysis," *Hepatol Int*, vol. 14, no. 5, pp. 711–722, Sep. 2020, doi: 10.1007/S12072-020-10071-9.
- [85] N. R. Sproston and J. J. Ashworth, "Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection," *Front Immunol*, vol. 9, no. APR, Apr. 2018, doi: 10.3389/FIMMU.2018.00754.

- [86] F. M. Torti and S. V. Torti, “Regulation of ferritin genes and protein,” *Blood*, vol. 99, no. 10, pp. 3505–3516, May 2002, doi: 10.1182/BLOOD.V99.10.3505.
- [87] E. Poggiali *et al.*, “Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients,” *Clin Chim Acta*, vol. 509, pp. 135–138, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.CCA.2020.06.012.
- [88] D. F. Gudbjartsson *et al.*, “Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland,” *N Engl J Med*, vol. 383, no. 18, pp. 1724–1734, Oct. 2020, doi: 10.1056/NEJMOA2026116.
- [89] B. MM, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal Biochem*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, May 1976, doi: 10.1006/ABIO.1976.9999.
- [90] O. Kravchenko *et al.*, “The blood coagulation tests from ischemic stroke patients with or without type 2 diabetes mellitus,” *Biomedical Research*, vol. 29, no. 14, pp. 2938–2943, 2018, doi: 10.4066/BIOMEDICALRESEARCH.29-18-332.
- [91] А. В. Токар, Е. М. Макогоненко, and Т. М. Платонова, *Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньовенного мікрозсідання крові (методичні рекомендації)*. . 1994.
- [92] “Інструкція до MAGLUMI D-димер (ІХЛІА), Snibe Diagnostic.”
- [93] J. R. Crowther, “The ELISA guidebook,” *Methods Mol Biol*, vol. 149, 2000, doi: 10.1385/1592590497.
- [94] N. Raksha, M. Burlova-Vasylieva, E. Torgalo, and O. Savchuk, “The appearance of molecules of prothrombin origin in blood upon development of atherothrombotic and cardioembolic ischemic stroke,” *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology*, vol. 68, no. 3, pp. 57–60, 2014, doi: 10.17721/1728_2748.2014.68.57-60.

- [95] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,” *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970, doi: 10.1038/227680A0.
- [96] R. N. H. T. I. T. V. T. T. M. S. O. O. L. Kravchenko O, “Fibrinolytic parameters under ischemic stroke with diabetes mellitus combination,” *Periodicum Biologorum*, vol. 120 (2–3), pp. 111–117, 2018, doi: 10.18054/pb.v120i2-3.6703.
- [97] E. Eriksson, M. Rånby, E. Gyzander, and B. Risberg, “Determination of plasminogen activator inhibitor in plasma using t-PA and a chromogenic single-point poly-D-lysine stimulated assay,” *Thromb Res*, vol. 50, no. 1, pp. 91–101, Apr. 1988, doi: 10.1016/0049-3848(88)90177-6.
- [98] Козлов А. А., Берковский А. Л., and Качалова Н. Д., *Пособие для врачей-лаборантов. Работа с отечественными коагулометрами и реагентами НПО «Ренам»*, vol. 44. М: Принт, 2013.
- [99] Nartikova V. F. and Paskhina T. S., “Uniform method for determining the alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin activity in human blood serum (plasma),” *Voprosy meditsinskoj khimii*, vol. 25, pp. 494–499, 1979.
- [100] D. Della-Morte *et al.*, “Low level of plasminogen increases risk for mortality in COVID-19 patients,” *Cell Death Dis*, vol. 12, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.1038/S41419-021-04070-3.
- [101] C. Huang *et al.*, “6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study,” *Lancet*, vol. 397, no. 10270, pp. 220–232, Jan. 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(20)32656-8.
- [102] T. Mokhtari, F. Hassani, N. Ghaffari, B. Ebrahimi, A. Yarahmadi, and G. Hassanzadeh, “COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms,” *J Mol Histol*, vol. 51, no. 6, pp. 613–628, Dec. 2020, doi: 10.1007/S10735-020-09915-3.

- [103] E. Pretorius *et al.*, “Persistent clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin,” *Cardiovasc Diabetol*, vol. 20, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12933-021-01359-7.
- [104] H. Naghedi-Baghdar *et al.*, “Effect of diet on blood viscosity in healthy humans: a systematic review,” *Electron Physician*, vol. 10, no. 3, pp. 6563–6570, Mar. 2018, doi: 10.19082/6563.
- [105] G. Lippi and E. J. Favaloro, “Laboratory hemostasis: from biology to the bench,” *Clin Chem Lab Med*, vol. 56, no. 7, pp. 1035–1045, Jun. 2018, doi: 10.1515/CCLM-2017-1205.
- [106] C. Godino *et al.*, “Antithrombotic therapy in patients with COVID-19? - Rationale and Evidence-,” *Int J Cardiol*, vol. 324, pp. 261–266, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.ijcard.2020.09.064.
- [107] J. A. Ezihe-Ejiofor and N. Hutchinson, “Anticlotting mechanisms 1: physiology and pathology,” *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, vol. 13, no. 3, pp. 87–92, Jun. 2013, doi: 10.1093/BJACEACCP/MKS061.
- [108] D. J. Perry, “Antithrombin and its inherited deficiencies,” *Blood Rev*, vol. 8, no. 1, pp. 37–55, 1994, doi: 10.1016/0268-960X(94)90006-X.
- [109] A. C. N. Barbosa *et al.*, “Prolonged APTT of unknown etiology: A systematic evaluation of causes and laboratory resource use in an outpatient hemostasis academic unit,” *Res Pract Thromb Haemost*, vol. 3, no. 4, pp. 749–757, Oct. 2019, doi: 10.1002/RTH2.12252.
- [110] S. Y. Kim, J. E. Kim, H. K. Kim, I. Kim, S. S. Yoon, and S. Park, “Influence of coagulation and anticoagulant factors on global coagulation assays in healthy adults,” *Am J Clin Pathol*, vol. 139, no. 3, pp. 370–379, Mar. 2013, doi: 10.1309/AJCPC5C4AGFRDKMX.

- [111] R. Stratton, G. Slapak, T. Mahungu, and S. K. De Loes, “Autoimmunity and HIV,” *Curr Opin Infect Dis*, vol. 22, no. 1, pp. 49–56, Feb. 2009, doi: 10.1097/QCO.0B013E3283210006.
- [112] G. Houen and N. H. Trier, “Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases,” *Front Immunol*, vol. 11, Jan. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2020.587380.
- [113] K. T.B. *et al.*, “Effect of IgG from multiple sclerosis patients on amidolytic activity of coagulation and anticoagulation factors of hemostasis,” *Biomedical Research and Therapy*, vol. 4, no. 08, p. 1502, Aug. 2017, doi: 10.15419/bmrat.v4i08.205.
- [114] T. Darmarajan *et al.*, “Autoantibodies and autoimmune disorders in SARS-CoV-2 infection: pathogenicity and immune regulation,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 29, no. 36, pp. 54072–54087, Aug. 2022, doi: 10.1007/S11356-022-20984-7.
- [115] S. Vinayagam and K. Sattu, “SARS-CoV-2 and coagulation disorders in different organs,” *Life Sci*, vol. 260, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.LFS.2020.118431.
- [116] N. Tang, D. Li, X. Wang, and Z. Sun, “Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia,” *J Thromb Haemost*, vol. 18, no. 4, pp. 844–847, Apr. 2020, doi: 10.1111/JTH.14768.
- [117] M. Maamar *et al.*, “Post-COVID-19 syndrome, low-grade inflammation and inflammatory markers: a cross-sectional study,” *Curr Med Res Opin*, vol. 38, no. 6, pp. 901–909, 2022, doi: 10.1080/03007995.2022.2042991.
- [118] S. Yakovlev and L. Medved, “Effect of fibrinogen, fibrin, and fibrin degradation products on transendothelial migration of leukocytes,” *Thromb Res*, vol. 162, pp. 93–100, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.THROMRES.2017.11.007.

- [119] E. Pretorius *et al.*, “Persistent clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin,” *Cardiovasc Diabetol*, vol. 20, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12933-021-01359-7.
- [120] M. J. Desborough and D. M. Keeling, “How to interpret a prolonged prothrombin time or activated partial thromboplastin time,” *Br J Hosp Med (Lond)*, vol. 74, no. 1, 2013, doi: 10.12968/HMED.2013.74.SUP1.C10.
- [121] N. Landau, Y. Shoenfeld, L. Negru, and G. Segal, “Exploring the pathways of inflammation and coagulopathy in COVID-19: A narrative tour into a viral rabbit hole,” *Int Rev Immunol*, vol. 41, no. 4, pp. 414–422, 2022, doi: 10.1080/08830185.2021.1993211.
- [122] D. A. Solovjov, T. N. Platonova, and T. P. Ugarova, “Purification and characterization of ecamulin--a prothrombin activator from the venom of multi-scaled viper (*Echis multisquamatus*).,” *Ukr Biokhim Zh (1978)*, vol. 68, no. 4, pp. 18–9, 1996.
- [123] G. Nowak, “The Ecarin Clotting Time, a Universal Method to Quantify Direct Thrombin Inhibitors,” *Pathophysiol Haemost Thromb*, vol. 33, no. 4, pp. 173–183, Aug. 2003, doi: 10.1159/000081505.
- [124] J. H. Foley and E. M. Conway, “Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation,” *Circ Res*, vol. 118, no. 9, pp. 1392–1408, Apr. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306853.
- [125] S. K. Dasgupta and P. Thiagarajan, “Inhibition of thrombin activity by prothrombin activation fragment 1.2,” *J Thromb Thrombolysis*, vol. 24, no. 2, pp. 157–162, Aug. 2007, doi: 10.1007/s11239-007-0018-8.
- [126] H. Shi *et al.*, “Endothelial Cell-Activating Antibodies in COVID-19.,” *Arthritis Rheumatol*, vol. 74, no. 7, pp. 1132–1138, Jul. 2022, doi: 10.1002/ART.42094.

- [127] Y. Zuo *et al.*, “Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19,” *Sci Transl Med*, vol. 12, no. 570, Nov. 2020, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.ABD3876.
- [128] K. Sugioka, K. Fukuda, T. Nishida, and S. Kusaka, “The fibrinolytic system in the cornea: A key regulator of corneal wound healing and biological defense,” *Exp Eye Res*, vol. 204, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.EXER.2021.108459.
- [129] L. A. Miles, L. Ny, M. Wilczynska, Y. Shen, T. Ny, and R. J. Parmer, “Plasminogen Receptors and Fibrinolysis,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 4, pp. 1–12, Feb. 2021, doi: 10.3390/IJMS22041712.
- [130] C. B. Keragala and R. L. Medcalf, “Plasminogen: an enigmatic zymogen,” *Blood*, vol. 137, no. 21, pp. 2881–2889, May 2021, doi: 10.1182/BLOOD.2020008951.
- [131] E. Baltan, E. Serin, B. Y. Avci, I. K. Akilli, and A. S. Çinar, “The relationship between plasminogen activator inhibitor-1 levels and the course of disease in COVID-19 patients,” *Turkish Journal of Biochemistry*, vol. 47, no. 5, pp. 672–679, Oct. 2022, doi: 10.1515/TJB-2022-0044/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
- [132] E. K. O. Kruithof and S. Dunoyer-Geindre, “Human tissue-type plasminogen activator,” *Thromb Haemost*, vol. 112, no. 2, pp. 243–254, 2014, doi: 10.1160/TH13-06-0517.
- [133] G. B. Morrow and N. J. Mutch, “Past, Present, and Future Perspectives of Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1),” *Semin Thromb Hemost*, vol. 49, no. 3, pp. 305–313, Apr. 2023, doi: 10.1055/S-0042-1758791.
- [134] D. B. Kell and E. Pretorius, “Proteins behaving badly. Substoichiometric molecular control and amplification of the initiation and nature of amyloid fibril formation: lessons from and for blood clotting,” *Prog Biophys Mol Biol*, vol. 123, pp. 16–41, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.PBIOMOLBIO.2016.08.006.

- [135] A. Kruger *et al.*, “Proteomics of fibrin amyloid microclots in long COVID/post-acute sequelae of COVID-19 (PASC) shows many entrapped pro-inflammatory molecules that may also contribute to a failed fibrinolytic system,” *Cardiovasc Diabetol*, vol. 21, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12933-022-01623-4.
- [136] E. Pretorius *et al.*, “Persistent clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin,” *Cardiovasc Diabetol*, vol. 20, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12933-021-01359-7.
- [137] S. Singh, S. Saleem, and G. L. Reed, “Alpha2-Antiplasmin: The Devil You Don’t Know in Cerebrovascular and Cardiovascular Disease,” *Front Cardiovasc Med*, vol. 7, Dec. 2020, doi: 10.3389/FCVM.2020.608899.
- [138] N. J. Mutch, L. Thomas, N. R. Moore, K. M. Lisiak, and N. A. Booth, “TAFIa, PAI-1 and alpha-antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots,” *J Thromb Haemost*, vol. 5, no. 4, pp. 812–817, Apr. 2007, doi: 10.1111/J.1538-7836.2007.02430.X.
- [139] S. Talens, J. J. M. C. Malfliet, P. T. W. van Hal, F. W. G. Leebeek, and D. C. Rijken, “Identification and characterization of $\alpha 1$ -antitrypsin in fibrin clots,” *J Thromb Haemost*, vol. 11, no. 7, pp. 1319–1328, Jul. 2013, doi: 10.1111/JTH.12288.
- [140] Alpha–2–macroglobulin complexes with IgG antibodies, plasmin and their interrelation with other factors of humoral immunity during the development of rheumatoid arthritis. Accessed: Jan. 19, 2024. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/307690920_
- [141] M. P. Kostinov, N. A. Zorin, S. V. Kazharova, and V. N. Zorina, “Comparative effect of immunomodulators on the contents of hydrolase inhibitors and lactoferrin in community-acquired pneumonia in adults,” *Medical Immunology (Russia)*, vol. 22, no. 4, pp. 791–798, Aug. 2020, doi: 10.15789/1563-0625-CEO-1548.

- [142] J. Vandooren and Y. Itoh, “Alpha-2-Macroglobulin in Inflammation, Immunity and Infections,” *Front Immunol*, vol. 12, Dec. 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.803244.
- [143] J. Lagrange, T. Lecompte, T. Knopp, P. Lacolley, and V. Regnault, “Alpha-2-macroglobulin in hemostasis and thrombosis: An underestimated old double-edged sword,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 20, no. 4, pp. 806–815, Apr. 2022, doi: 10.1111/jth.15647.
- [144] T. McDonnell *et al.*, “The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS,” *Blood Rev*, vol. 39, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.BLRE.2019.100610.
- [145] C. Mendoza-Pinto, M. García-Carrasco, and R. Cervera, “Role of Infectious Diseases in the Antiphospholipid Syndrome (Including Its Catastrophic Variant),” *Curr Rheumatol Rep*, vol. 20, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.1007/S11926-018-0773-X.
- [146] A. Capozzi *et al.*, “Antiphospholipid antibodies in patients with stroke during COVID-19: A role in the signaling pathway leading to platelet activation,” *Front Immunol*, vol. 14, 2023, doi: 10.3389/FIMMU.2023.1129201/FULL.
- [147] M. S. Hadjiagapiou, G. Krashias, E. Deeba, C. Christodoulou, M. Pantzaris, and A. Lambrianides, “Antibodies to blood coagulation components are implicated in patients with multiple sclerosis,” *Mult Scler Relat Disord*, vol. 62, Jun. 2022, doi: 10.1016/J.MSARD.2022.103775.
- [148] E. Pretorius *et al.*, “Persistent clotting protein pathology in Long COVID/Post-Acute Sequelae of COVID-19 (PASC) is accompanied by increased levels of antiplasmin,” *Cardiovasc Diabetol*, vol. 20, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/S12933-021-01359-7.
- [149] A. D. Proal and M. B. VanElzakker, “Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Overview of Biological Factors That May Contribute

- to Persistent Symptoms,” *Front Microbiol*, vol. 12, Jun. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2021.698169.
- [150] H. E. Davis *et al.*, “Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact,” *EClinicalMedicine*, vol. 38, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.ECLINM.2021.101019.
- [151] L. Tabacof *et al.*, “Post-acute COVID-19 Syndrome Negatively Impacts Physical Function, Cognitive Function, Health-Related Quality of Life, and Participation,” *Am J Phys Med Rehabil*, vol. 101, no. 1, pp. 48–52, Jan. 2022, doi: 10.1097/PHM.0000000000001910.
- [152] D. B. Kell, G. J. Laubscher, and E. Pretorius, “A central role for amyloid fibrin microclots in long COVID/PASC: origins and therapeutic implications,” *Biochem J*, vol. 479, no. 4, pp. 537–559, Feb. 2022, doi: 10.1042/BCJ20220016.
- [153] A. Kruger *et al.*, “Proteomics of fibrin amyloid microclots in long COVID/post-acute sequelae of COVID-19 (PASC) shows many entrapped pro-inflammatory molecules that may also contribute to a failed fibrinolytic system,” *Cardiovasc Diabetol*, vol. 21, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12933-022-01623-4.
- [154] D. B. Kell and E. Pretorius, “The potential role of ischaemia-reperfusion injury in chronic, relapsing diseases such as rheumatoid arthritis, Long COVID, and ME/CFS: evidence, mechanisms, and therapeutic implications,” *Biochem J*, vol. 479, no. 16, pp. 1653–1708, Aug. 2022, doi: 10.1042/BCJ20220154.
- [155] M. Hardy, I. Michaux, A. Dive, T. Lecompte, and F. Mullier, “Could Daily Monitoring of Fibrin Related Markers Help Suspect a Thrombotic Event in COVID-19 Patients? A Prospective Pilot Study,” *TH Open*, vol. 5, no. 2, p. e152, Apr. 2021, doi: 10.1055/S-0041-1728722.

- [156] B. S. Bull and K. L. Hay, “A macrophage attack culminating in microthromboses characterizes COVID 19 pneumonia,” *Immun Inflamm Dis*, vol. 9, no. 4, pp. 1336–1342, Dec. 2021, doi: 10.1002/IID3.482.
- [157] L. Naranjo *et al.*, “Presence of Extra-Criteria Antiphospholipid Antibodies Is an Independent Risk Factor for Ischemic Stroke,” *Front Cardiovasc Med*, vol. 8, 2021, doi: 10.3389/FCVM.2021.665741.
- [158] S. Sciascia, G. Sanna, V. Murru, D. Roccatello, M. A. Khamashta, and M. L. Bertolaccini, “Anti-prothrombin (aPT) and anti-phosphatidylserine/prothrombin (aPS/PT) antibodies and the risk of thrombosis in the antiphospholipid syndrome. A systematic review,” *Thromb Haemost*, vol. 111, no. 2, pp. 354–364, Oct. 2014, doi: 10.1160/TH13-06-0509.
- [159] T. Katrii *et al.*, “Effects of IgG from the serum of ischemic stroke patients on hemostasis,” *Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, vol. 94, no. 1, pp. 1–6, May 2021, doi: 10.4081/jbr.2021.9582.
- [160] C. T. Esmon, “The interactions between inflammation and coagulation,” *Br J Haematol*, vol. 131, no. 4, pp. 417–430, Nov. 2005, doi: 10.1111/J.1365-2141.2005.05753.X.
- [161] B. Szotowski, S. Antoniak, W. Poller, H. P. Schultheiss, and U. Rauch, “Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines,” *Circ Res*, vol. 96, no. 12, pp. 1233–1239, Jun. 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000171805.24799.FA.
- [162] C. T. Esmon, “The impact of the inflammatory response on coagulation,” *Thromb Res*, vol. 114, no. 5–6, pp. 321–327, 2004, doi: 10.1016/J.THROMRES.2004.06.028.

- [163] M. Levi and T. Van Der Poll, “Two-way interactions between inflammation and coagulation,” *Trends Cardiovasc Med*, vol. 15, no. 7, pp. 254–259, Oct. 2005, doi: 10.1016/J.TCM.2005.07.004.
- [164] M. J. E. Visser, G. Tarr, and E. Pretorius, “Thrombosis in Psoriasis: Cutaneous Cytokine Production as a Potential Driving Force of Haemostatic Dysregulation and Subsequent Cardiovascular Risk,” *Front Immunol*, vol. 12, Jul. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.688861.
- [165] E. Camerer, W. Huang, and S. R. Coughlin, “Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 10, pp. 5255–5260, May 2000, doi: 10.1073/PNAS.97.10.5255.
- [166] E. Camerer, H. Kataoka, M. Kahn, K. Lease, and S. R. Coughlin, “Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells,” *J Biol Chem*, vol. 277, no. 18, pp. 16081–16087, May 2002, doi: 10.1074/JBC.M108555200.
- [167] E. De Jonge *et al.*, “Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects,” *Clin Diagn Lab Immunol*, vol. 10, no. 3, pp. 495–497, Jun. 2003, doi: 10.1128/CDLI.10.3.495-497.2003.
- [168] S. Vorlova *et al.*, “Coagulation factor XII induces pro-inflammatory cytokine responses in macrophages and promotes atherosclerosis in mice,” *Thromb Haemost*, vol. 117, no. 1, pp. 176–187, 2017, doi: 10.1160/TH16-06-0466.
- [169] A. Gros, V. Ollivier, and B. Ho-Tin-Noé, “Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair,” *Front Immunol*, vol. 5, no. JAN, 2015, doi: 10.3389/FIMMU.2014.00678.

Перелік опублікованих праць та відомості про апробацію досліджень**Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitalii Karbovskyy, Nataliia Raksha, Tetiana Halenova, Tetiana Vovk, Olexii Savchuk and Liudmyla Ostapchenko. A study of fibrinolytic system components in donor groups depending on various titers of circulating anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, Volume 34, Issue 7, 2023, pp. 439-445, [doi:10.1097/MBC.0000000000001248](https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001248) (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
2. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitalii Karbovskyy, Tetiana Halenova, Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Olexii Savchuk, Dmytro Liubenko, Tetyana Falalyeyeva, Liudmyla Ostapchenko and Ludovico Abenavoli. Characteristics of products of fibrinogen origin in the presence of anti-SARS-CoV-2 IgG in the bloodstream. *Reviews on Recent Clinical Trials*, Volume 18, Issue 1, 2023, pp. 69-75, [doi:10.2174/1574887118666221219115856](https://doi.org/10.2174/1574887118666221219115856) (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.
3. Kateryna Strubchevska, Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitalii Karbovskyy, Marko Kozyk, Benjamin Secor, Nataliia Raksha, Tetiana Vovk,

Olexii Savchuk, Tetyana Falalyeyava, Rostyslav Kaminsky, Liudmyla Ostapchenko. Coagulation parameters in post-Covid-19 condition in relation to various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG in blood plasma. *International Journal of General Medicine*, Volume 16, 2023, pp. 6127—6135, [doi:10.2147/IJGM.S425496](https://doi.org/10.2147/IJGM.S425496) (особистий внесок здобувача: експериментальні дослідження, пошук та узагальнення літератури, опис та статистичне обчислення результатів, підготовка статті до друку) – Q2 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank.

Опубліковані праці апробаційного характеру:

1. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, and Olexiy Savchuk. Levels of proinflammatory cytokines in blood plasma of patients suffered from COVID-19. *18th Horizons in molecular biology*, Gottingen, Germany, 13-16 September 2021, p. 107.
2. Maryna Kalashnikova, **Daryna Krenytska**, Olexiy Savchuk. Collagen-containing enzyme-electrophoresis in detection of proteolytic activity in blood plasma of donors with different titers of anti-SARS-CoV-2. *Open Readings*, Vilnius, Lithuania, 18-13 April 2023, p. 293.
3. Antonina Rachkovska, **Daryna Krenytska**, Vitaliy Karbovskiy. Concentrations of fibrinogen and D-dimer in blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. *Open Readings*, Vilnius, Lithuania, 18-13 April 2023, p. 400.
4. **Krenytska D.**, Nechiporenko B. Protein C content in donors blood plasma with different anti-SARS-CoV-2-IgG titers. *XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, м. Полтава, Україна, 26–28 квітня 2023 року, стр. 44.
5. Kalashnikova M., Rachkovska A., **Krenytska D.** Comparison of plasminogen/plasmin content between blood plasma samples of donors with

and without streptokinase addition. *XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, м. Полтава, Україна, 26–28 квітня 2023 року, стр. 43.

6. Rachkovska A., Kalashnikova M., **Krenytska D.** Analysis of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) in blood plasma of donors with various titers of anti-SARS-CoV-2 IgG. *XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, м. Полтава, Україна, 26–28 квітня 2023 року, стр. 48.

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

8. Калашнікова М., Рачковська А., **Креницька Д.** Аналіз змін у плазміновому пулі в зразках плазми крові донорів, які перехворіли на COVID-19. *XX Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення в науках про життя»*, м. Київ, Україна, 27-28 квітня 2023, стр.121-124.

9. Рачковська А.М. **Креницька Д.І.**, Калашнікова М.В. Оптимізація методики ензим-електрофорезу для дослідження ферментативної активності у плазмі крові донорів за умови наявності анти-SARS-CoV-2 IgG. *XVII Міжнародна науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, м. Київ, Україна, 19 травня 2023 року, стр.171-173.