

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. 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 симптомів у осіб із затяжним 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 вивчались 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 системи 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 тромбопластиновий 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 К-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 of 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 block 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 Karbovsky, Nataliia Raksha, Tetiana Halenova, Tetiana Vovk, Olexii Savchuk and Liudmyla Ostapchenko. A study of fibrinolytic system components in donor groups depending on various titres 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 Karbovsky, 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 Karbovsky, Marko Kozyk, Benjamin Secor, Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Olexii Savchuk, Tetyana Falalyeyeva, 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, 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. 43.

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.