

АНОТАЦІЯ

Дубровський Є.І. **Молекулярно-генетичні та імунні механізми важкого перебігу коронавірусної хвороби (COVID-19).** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2024.

Дисертаційна робота вирішує наукові завдання встановлення нових ланок молекулярно-генетичних та імунних механізмів важкого перебігу коронавірусної хвороби (COVID-19), зокрема, на тлі метаболічних розладів, і пошуку ефективних доказових прогностичних біомаркерів тяжкого перебігу COVID-19 у пацієнтів з групи ризику.

У дослідженні були використані зразки плазми крові 93 пацієнтів із цукровим діабетом, ожирінням та гіпертонічною хворобою (середній вік – $61 \pm 15,39$ років) із надлишковою масою тіла ($IMT > 25$), які отримували антидіабетичні препарати та були госпіталізовані в інфекційне відділення Київської міської клінічної лікарні № 4. При госпіталізації у хворих лабораторно було підтверджено COVID-19 методом ПЛР. До контрольної групи увійшли 10 практично здорових добровольців (середній вік – $59 \pm 12,3$ років) з $IMT < 5$ без ознак цукрового діабету, ожиріння, гіпертонії та COVID-19 (з негативним ПЛР-тестом). Усі учасники дослідження надали письмову інформовану згоду. Всі роботи з учасниками дослідження проведено з дотриманням вимог біомедичної етики і затверджено Комітетом з біоетики Інституту фізіології імені Богомольця (№ 6/20 від 11.11.2020).

Після відбору біологічного матеріалу (кров) було проведено клінічне спостереження за станом хворих під час подальшого перебігу коронавірусної хвороби й виконано ретроспективний аналіз, за результатами якого всі пацієнти були розділені на три групи відповідно до тяжкості захворювання та класифіковані як легкі ($n = 14$), середньої тяжкості ($n = 42$) та важкі ($n = 37$)

згідно з Рекомендаціями Національної комісії з охорони здоров'я України та протоколу ВОЗ.

Крім стандартного клінічного обстеження, у пацієнтів визначали спеціальні параметри клітинної відповіді, біохімічні та молекулярно-генетичні показники, а саме, проводили визначення рівня спонтанного та індукованого формування нейтрофільних позаклітинних пасток (NET), їх біохімічних маркерів нейтрофільної мієлопероксидази (МПО) та еластази і рівня позаклітинної ДНК (пкДНК) в плазмі крові, рівня гіалуронової кислоти в плазмі крові, рівнів експресії різних ізоформ транскрипційного фактору NIF (NIF-1 α , NIF-2 α , NIF-3 α) та довгих некодуючих РНК NIF1-AS1 і HAS2-AS1 у лейкоцитах крові з використанням відповідних сучасних методів: цитологічних (виділення нейтрофільних гранулоцитів з цільної крові, проведення клітинних реакцій, флюоресцентна мікроскопія), біохімічних (визначення кількості позаклітинної ДНК) та молекулярно-біологічних (імуноферментний аналіз та визначення експресії РНК методом ПЛР у реальному часі).

Одержані результати характеризуються науковою новизною. Встановлено, що у пацієнтів із COVID-19 рівень спонтанного НЕТозу був у 4 рази вищим, ніж у здорових донорів, тоді як індукований НЕТоз зростав у 1,65 рази, що вказує на активацію нейтрофілів у відповідь на вірусну інфекцію.

Виявлено, що рівень пкДНК у плазмі крові хворих на COVID-19 зростав пропорційно тяжкості перебігу, досягаючи максимальних значень у пацієнтів із важким перебігом (в 3,4 рази вище, ніж у здорових осіб, $p < 0,05$). Проведений кореляційний аналіз підтвердив середню силу зв'язку між НЕТозом та рівнем пкДНК, а побудована ROC крива демонструє ефективність останнього показника як прогностичного маркера тяжкості перебігу COVID-19. Значення чутливості 82 % свідчить, що цей біомаркер дозволяє коректно ідентифікувати 82 % пацієнтів із важким перебігом хвороби, мінімізуючи кількість хибнонегативних результатів. Отримане порогове значення 4297 нг/мл можна

використовувати для розмежування груп ризику: рівень пкДНК вище цього значення асоціюється з важчим перебігом COVID-19.

Рівень МПО в плазмі крові пацієнтів із COVID-19 також зростає в залежності від тяжкості перебігу захворювання і був у групі тяжкохворих в 4 рази вищим у порівнянні з пацієнтами із легким перебігом, що статистично демонструє найвищий рівень впливу серед усіх маркерів ($\omega^2 = 0,43$). Це підкреслює ключову роль нейтрофільного запалення та утворення NETs у розвитку важких ускладнень COVID-19. Визначення МПО, особливо у поєднанні з пкДНК, можна вважати найбільш перспективним для точного прогнозування важкого перебігу COVID-19.

Було визначено, що рівень гіалуронової кислоти у плазмі крові мав лише тенденцію до зростання з обтяженням перебігу захворювання. Більш інформативним показником стало визначення рівня HAS2-AS1 в лейкоцитах пацієнтів, що дозволяє чітко дискримінувати хворих із різною важкістю клінічного перебігу захворювання ще на етапі госпіталізації. У здорових добровольців експресія HAS2-AS1 практично не визначалася, в той час як у пацієнтів з середньою важкістю перебігу COVID-19 експресія HAS2-AS1 зростала в 7,7 разів ($p < 0.05$), а при тяжкому перебігу - в 22,6 разів ($p < 0.05$) порівняно з пацієнтами із легким перебігом. Значущість змін HAS2-AS1 підтверджена дуже високим показником ефекту величини ω^2 (0,33), що свідчить про те, що HAS2-AS1 є ланкою патогенезу COVID-19 у загальній популяції, адже вказує, що близько 33% варіації тяжкості перебігу COVID-19 можна пояснити рівнем HAS2-AS1. ROC-показники (чутливість 0,88, специфічність 0,8) підтверджують, що HAS2-AS1 також є ефективним інструментом для індивідуального прогнозування тяжкості перебігу. Граничне значення цього біомаркера становить 61,8 у.о., тобто пацієнти з рівнем експресії HAS2-AS1 вище 61,8 потенційно мають значно підвищений (88%) ризик ускладнень. Таким чином HAS2-AS1 може використовуватися для створення стратифікаційних моделей ризику, особливо у комбінації з іншими маркерами.

Показано, що ізоформи транскрипційного фактору HIF відіграють значну роль у патогенезі COVID-19. У хворих з легким та середньоважким перебігом більшою мірою зростала експресія HIF-2 α (у 6 та 10,6 разів відносно групи контролю), менше - HIF-1 α (у 4,3 та 8,2 раза) і найменше - HIF-3 α (у 6,2 та 7,1 раза). У тяжкохворих найменшим виявляється зростання субодиниці HIF-2 α (у 17,7 разів), натомість зростає внесок субодиниць HIF-1 α (у 21,6 разів) і особливо - HIF-3 α (у 33,7 разів).

Визначено, що співвідношення між рівнями експресії HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α асоційоване з тяжкістю перебігу й може вказувати на механізми порушення адаптації до гіпоксії у пацієнтів із різними клінічними сценаріями. Ці показники можуть бути ключовими у визначенні тяжкості захворювання. Аналіз статистичного показнику ефекту величини показує, що HIF-3 α демонструє найвищий вплив ($\omega^2 = 0,29$) та має найбільший ефект впливу як прогностичний маркер серед інших ізоформ транскрипційного фактору HIF.

Вперше встановлено, що рівень експресії довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1 практично не відрізняється між групою контролю та легким перебігом COVID-19 та становить 29-32 у.о., але різко зростає у пацієнтів із середньотяжким та тяжким перебігом COVID-19 (в 5 та 9,8 раза відповідно до групи контролю). ROC-крива HIF1A-AS1 показує 100% специфічність і 73% чутливість, що свідчить про ідеальну здатність маркера HIF1-AS1 правильно визначати здорових або пацієнтів із легким перебігом COVID-19. При використанні цього маркера немає хибнопозитивних результатів, що є надзвичайно важливим для клінічної діагностики. Граничне значення 277,85 у.о. вказує рівень експресії HIF1-AS1, при перевищенні якого пацієнт вважається в зоні ризику важкого перебігу COVID-19. Це свідчить, що рівень експресії HIF1-AS1 може бути вагомим доповненням до діагностики COVID-19, забезпечуючи високу специфічність і високий внесок у прогностичну модель.

Результати дисертаційної роботи дозволяють надати клінічні рекомендації щодо застосування маркерів запалення (МПО, пкДНК), судинної

проникності (HAS2-AS1), та гіпоксії (HIF1-AS1 та HIF-3 α) та їх комбінації як високоточного інструменту для прогнозування та моніторингу важкого перебігу COVID-19. Інтеграція цих даних у клінічну практику допоможе окреслити справжні групи ризику, оптимізувати лікування та зменшити ризику для пацієнтів, дозволивши при надзвичайних ситуаціях зосередитись на прогностично неблагополучних пацієнтах.

Ключові слова. COVID 19; SARS-CoV-2; коронавірусне захворювання; цукровий діабет 2-го типу; ожиріння; артеріальна гіпертензія; гіпоксія; запалення; клітини імунної системи; нейтрофіли; нейтрофільні позаклітинні пастки; НЕТоз; клітинна загибель; ушкодження ДНК; пкДНК; мієлопероксидаза; гіалуронова кислота; експресія генів; HIF-1 α ; HIF-2 α ; HIF-3 α ; mTOR; довгі некодуючі РНК; HIF1A-AS1; HAS2-AS1; біомаркери; прогноз тяжкості.

SUMMARY

Dubrovskiy, Ievgen. Molecular-genetic and immune mechanisms of severe COVID-19 progression. – A qualification scientific manuscript.

Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in the field of 22 "Healthcare," specialty 222 "Medicine." – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2024.

This dissertation addresses the scientific problem of elucidating novel molecular-genetic and immune mechanisms underlying severe COVID-19 progression, particularly in the context of metabolic disorders, and identifies effective evidence-based prognostic biomarkers for severe disease in at-risk populations.

The study involved plasma samples from 93 hospitalized patients diagnosed with COVID-19 via RT-PCR, presenting with diabetes mellitus, obesity, and hypertension (mean age 61 ± 15.39 years, BMI > 25). Patients were treated with

antidiabetic medications at Kyiv City Clinical Hospital No. 4. A control group comprised 10 healthy volunteers (mean age 59 ± 12.3 years, BMI < 25) with no diabetes, obesity, hypertension, or COVID-19 (RT-PCR negative). All participants provided informed consent. The study adhered to biomedical ethics standards, as approved by the Bioethics Committee of the Bogomoletz Institute of Physiology (No. 6/20, 11.11.2020).

After the collection of biological material (blood), clinical monitoring was conducted to observe the condition of the patients throughout the progression of coronavirus disease. A retrospective analysis was performed, based on which all patients were categorized into three groups according to disease severity: mild (n = 14), moderate (n = 42), and severe (n = 37), in accordance with the Recommendations of the National Health Commission of Ukraine and the WHO protocol. Besides standard clinical assessments, specialized analyses of cellular responses, biochemical, and molecular-genetic parameters were conducted. These included neutrophil extracellular trap (NET) formation, plasma levels of extracellular DNA (cfDNA), myeloperoxidase (MPO), hyaluronic acid, transcription factor isoforms HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , and long noncoding RNAs HIF1-AS1 and HAS2-AS1, utilizing cytological, biochemical, and molecular-biological methods (real-time PCR, fluorescence microscopy, and ELISA).

The findings demonstrate that spontaneous NETosis levels in COVID-19 patients were fourfold higher than in healthy controls, with induced NETosis increasing 1.65 times, indicating significant neutrophil activation. Plasma cfDNA levels correlated with disease severity, peaking at 3.4 times the control group levels in severe cases. Correlation analysis confirmed a moderate association between NETosis and cfDNA levels, with ROC analysis showing 82% sensitivity for predicting severe COVID-19 using a cfDNA threshold of 4297 ng/mL.

The level of myeloperoxidase (MPO) in the blood plasma of COVID-19 patients also increased depending on the severity of the disease and was four times higher in the group of severely ill patients compared to those with mild disease. This finding statistically demonstrated the highest effect size among all markers analyzed

($\omega^2 = 0.43$). This underscores the critical role of neutrophilic inflammation and the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in the development of severe complications associated with COVID-19. The determination of MPO levels, particularly in combination with circulating cell-free DNA (cfDNA), can be considered one of the most promising approaches for accurately predicting the severe course of COVID-19.

It was determined that the level of hyaluronic acid in blood plasma exhibited only a tendency to increase with the worsening severity of the disease. A more informative indicator was the level of HAS2-AS1 expression in patient leukocytes, which enabled precise differentiation of patients with varying clinical severity of COVID-19 even at the hospitalization stage. In healthy volunteers, HAS2-AS1 expression was almost undetectable, whereas in patients with moderate COVID-19 severity, HAS2-AS1 expression increased 7.7-fold ($p < 0.05$), and in severe cases, it rose by 22.6-fold ($p < 0.05$) compared to patients with mild disease. The significance of HAS2-AS1 changes was confirmed by a very high effect size ($\omega^2 = 0.33$), indicating that HAS2-AS1 is involved in the pathogenesis of COVID-19 within the general population and accounts for approximately 33% of the variance in disease severity. ROC analysis (sensitivity 0.88, specificity 0.8) further validates HAS2-AS1 as an effective tool for individualized severity prediction. The biomarker's cutoff value was identified as 61.8 arbitrary units, with HAS2-AS1 levels above this threshold indicating a significantly elevated (88%) risk of complications. Thus, HAS2-AS1 can be employed for developing risk stratification models, particularly in combination with other biomarkers.

It has been shown that the isoforms of the transcription factor HIF play a significant role in the pathogenesis of COVID-19. In patients with mild and moderate disease, the expression of HIF-2 α increased to a greater extent (by 6 and 10.6 times compared to the control group), less - HIF-1 α (by 4.3 and 8.2 times) and the least - HIF-3 α (by 6.2 and 7.1 times). In severely ill patients, the increase in the HIF-2 α subunit is the smallest (by 17.7 times), while the contribution of HIF-1 α subunits increases (by 21.6 times) and especially - HIF-3 α (by 33.7 times).

It has been established that the ratio between the expression levels of HIF-1 α , HIF-2 α , and HIF-3 α is associated with disease severity and may indicate mechanisms of impaired hypoxic adaptation in patients with various clinical scenarios. These indicators could serve as critical parameters in determining the severity of the disease. Statistical analysis of the effect size reveals that HIF-3 α exhibits the highest impact ($\omega^2 = 0.29$) and demonstrates the strongest predictive influence among the isoforms of the hypoxia-inducible transcription factor. This finding highlights HIF-3 α as a key prognostic marker for assessing the severity of COVID-19.

For the first time, it has been established that the expression level of the long non-coding RNA HIF1A-AS1 shows no significant difference between the control group and patients with mild COVID-19, remaining within the range of 29–32 relative units. However, its expression markedly increases in patients with moderate and severe COVID-19 (5-fold and 9.8-fold higher, respectively, compared to the control group). The ROC curve for HIF1A-AS1 demonstrates 100% specificity and 73% sensitivity, indicating the exceptional ability of this marker to accurately identify healthy individuals or patients with mild COVID-19. The absence of false-positive results highlights the critical importance of this marker for clinical diagnostics. The threshold value of 277.85 relative units defines the expression level of HIF1A-AS1, beyond which a patient is considered to be at high risk for severe COVID-19. This underscores the potential of HIF1A-AS1 expression levels as a significant complement to COVID-19 diagnostics, ensuring high specificity and a substantial contribution to prognostic modeling.

The findings of this dissertation provide clinical recommendations for the application of inflammation markers (MPO, cfDNA), vascular permeability markers (HAS2-AS1), and hypoxia markers (HIF1-AS1 and HIF-3 α) as a highly accurate tool for predicting and monitoring the severity of COVID-19. Integrating these markers into clinical practice will help identify high-risk groups, optimize treatment strategies, and reduce patient risks, allowing healthcare systems to focus on prognostically unfavorable cases during emergencies.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; coronavirus infection; type 2 diabetes mellitus; obesity; hypertension; hypoxia; inflammation; cells of the immune system; neutrophils; neutrophil extracellular traps; NETosis; cell death; DNA damage; cfDNA; myeloperoxidase; hyaluronic acid; gene expression; HIF-1 α ; HIF-2 α ; HIF-3 α ; mTOR; lncRNA; HIF1A-AS1; HAS2-AS1, biomarkers; severity prediction.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **E.I. Dubrovskiy**, T.I. Drevytska, D.O. Pashevin, L.V. Tumanovska, D.O. Stroy, V.E. Dosenko. Level of cell-free DNA in plasma as an early marker of hospital course of covid-19 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Fiziol. Zh.* 2023; 69(4): 74-84. <https://doi.org/10.15407/fz69.04.074> Scopus, Q4; фахове видання, категорія А (*особистий внесок здобувача: пошук та систематизація інформації, проведення молекулярно-біологічних досліджень, статистична обробка результатів, написання статті*).
2. **Dubrovskiy E**, Drevytska T, Dosenko V. Hyaluronan in lung, in plasma as pathogenic and prediction factor of acute respiratory distress syndrome: A systematic review. *Salud, Ciencia y Tecnología.* 2024 Sep. 17; 4:578. DOI: <https://doi.org/10.56294/saludcyt2024.578> Scopus, Q4; фахове видання, категорія А (*особистий внесок здобувача: пошук та систематизація інформації, написання статті*).
3. **E. Dubrovskiy**, T. Drevytska, V. Dosenko, D. Story. High level of RNA HAS2-AS1 in the buffy coat of a patient blood sample is a more informative prognostic marker of COVID-19 clinical course compared to the level of hyaluronic acid in plasma. *Ukr. Biochem. J.*, 2024, Vol. 96, N 4. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj96.04.062> Scopus, Q4; фахове видання, категорія А (*особистий внесок здобувача: проведення молекулярно-біологічних досліджень, статистична обробка результатів, написання статті*).
4. **E. Dubrovskiy**, T. Drevytska, A. Portnychenko, V. Dosenko. The expression levels of HIF-1 α and the long non-coding RNA HIF1A-AS1 in the buffy coat as prognostic markers for severe COVID-19 outcomes in patients with diabetes and obesity. *Tuberculosis, Lung Diseases, HIV Infection (Ukraine)*.

2024; 4:49-56. DOI: <https://doi.org/10.30978/TB2024-4-49> Scopus, Q4; фахове видання, категорія А (*особистий внесок здобувача: проведення молекулярно-біологічних досліджень, статистична обробка результатів, написання статті*).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Дубровський Є. І.**, Древицька Т. І., Портниченко А. Г., Досенко В. Є. Рівень експресії довгої некодуєчої РНК HIF1A-AS1 як прогностичний маркер важкого перебігу COVID-19 у пацієнтів з діабетом та ожирінням. Науково-практична конференція для лікарів Харківського регіону «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань», 4 липня 2024 року, м. Харків
2. **Дубровський Є. І.**, Древицька Т. І., Строй Д. О., Портниченко А. Г., Досенко В. Є. Рівень HAS2-AS1 в лейкоцитах як важливий прогностичний маркер клінічного перебігу COVID-19 у пацієнтів з високої групи ризику. Наукова конференція, XXIII–і читання В. В. Підвисоцького (16-17 травня 2024 року). – Одеса.
3. **Дубровський Є.І.**, Древицька Т.І., Строй Д.О., Пашевін Д.О., Тумановська Л.В., Досенко В.Є., Портниченко А.Г. Позаклітинна ДНК у плазмі пацієнтів з діабетом 2 типу та ожирінням як прогностичний маркер важкого перебігу COVID-19. IX Національний Конгрес патофізіологів України (Івано-Франківськ – 2024).

Дубровський Є. І., Древицька Т. І., Портниченко А. Г., Досенко В. Є. Відносне збільшення HIF-3 α в лейкоцитах хворих на COVID-19 є несприятливим прогностичним фактором перебігу захворювання. VII науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція». 14 листопада 2024 р. ХАРКІВ – Україна.