

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ**

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ДУБРОВСЬКИЙ ЄВГЕН ІГОРОВИЧ

УДК [616.9+616.379-008.64]:616-092.18/19:616.079:577.29

ДИСЕРТАЦІЯ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА
ІМУННІ МЕХАНІЗМИ ВАЖКОГО ПЕРЕБІГУ
КОРОНАВІРУСНОЇ ХВОРОБИ (COVID-19)**

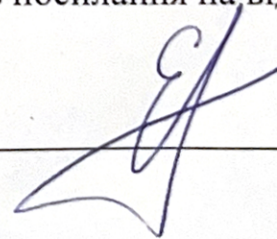
Спеціальність — 222 Медицина

Галузь знань — 22 Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Дубровський Є.І.



Науковий керівник: **Портниченко Алла Георгіївна**,
доктор медичних наук, завідувач відділу гіпоксії

Київ-2024

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 HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) та довгих некодуючих РНК HIF1-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 ризики 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; HEToz; 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, ХХІІІ-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. ІХ Національний Конгрес патологістів України (Івано-Франківськ – 2024).
4. **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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	15
ВСТУП	17
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	25
1.1. Коронавірусна хвороба та її механізми, пов'язані з нейтрофілами. 25	
1.2. Гіалуронова кислота як ланка патогенезу коронавірусної хвороби 30	
1.3. Роль ізоформ фактора HIF у патогенезі коронавірусної хвороби ... 39	
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	47
2.1. Клінічний опис групи дослідження	47
2.2. Збір крові та її фракціонування	49
2.3. Визначення рівня спонтанного та індукованого HETозу	50
2.4. Вимірювання концентрації позаклітинної ДНК у плазмі крові	51
2.5. Вимірювання концентрації мієлопероксидази людини (МПО) у плазмі крові	52
2.6. Вимірювання концентрації еластази нейтрофілів людини в плазмі крові	53
2.7. Вимірювання гіалуронової кислоти (ГК) у плазмі крові	53
2.8. Виділення РНК з лейкоцитів периферичної крові	54
2.9. Зворотна транскрипція	54
2.10. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі	55
2.11. Експресія довгої некодуючої РНК HAS2-AS1	55
2.12. Експресія мРНК ізоформ транскрипційного фактору HIF: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α	56
2.13. Експресія довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1	56
2.14. Експресія мРНК mTOR	56
2.15. Статистичний аналіз	56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	58
3.1. Оцінка рівня спонтанного та індукованого HETозу	59
3.2. Оцінка рівня позаклітинної ДНК в плазмі крові хворих на COVID-19	63

3.3. Визначення рівня нейтрофільної еластази та мієлопероксидази (MPO) в плазмі крові хворих на COVID-19.	67
3.4. Визначення гіалуронової кислоти в плазмі крові хворих на COVID-19.....	71
3.5. Визначення експресії lncRNA HAS2-AS1 у лейкоцитах хворих на COVID-19.....	72
3.6. Визначення експресії мРНК HIF-1 α	76
3.7. Визначення експресії мРНК HIF-2 α у лейкоцитах хворих на COVID-19.....	77
3.8. Визначення експресії HIF-3 α у лейкоцитах хворих на COVID-19.....	78
3.9. Визначення експресії lncRNA HIF1A-AS1 у лейкоцитах хворих на COVID-19.....	80
3.10. Визначення експресії mTOR у лейкоцитах хворих на COVID-19	86
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	96
4.1. НЕТоз та позаклітинна ДНК як прогностичні маркери важкого перебігу COVID-10	99
4.2. Гіалуронова кислота та довга некодуюча РНК HAS2-AS1 як ранні маркери гіпоксії.....	105
4.3. Транскрипційний фактор HIF та довга некодуюча РНК HIF1-AS1 в контексті COVID-19.....	109
ВИСНОВКИ	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	128
ДОДАТОК 1	159
ДОДАТОК 2	163
ДОДАТОК 3	164

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

IL – інтерлейкін

IRS – субстрат рецептора інсуліну

LEPR – лептиновий рецептор

PI3K – фосфатидилінозитол-3-кіназа

TNF – фактор некрозу пухлин

$V_{O_2}/\text{кг}$ – споживання кисню за хвилину на 1 кг маси тіла

$V_{CO_2}/\text{кг}$ – виділення вуглекислого газу за хвилину на 1 кг маси тіла

АГ – артеріальна гіпертензія

АГБ – аерогематичний бар'єр

АТФ – аденозинтрифосфат

ДО – дихальний об'єм

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

ЕТЛ – електронтранспортний ланцюг

ІР – інсулінорезистентність

ЛПС - ліпополісахарид

ЦД2 – цукровий діабет 2 типу

ІМТ – індекс маси тіла

ЦНС – центральна нервова система

SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, важкий гострий респіраторний синдром, асоційований з інфекцією коронавірусом другого типу

COVID-19 – коронавірусна хвороба

ГРДС – гострий респіраторний дистрес синдром

ACE2 – рецептор ангіотензинперетворюючого ферменту 2

АПФ – ангіотензинперетворюючий фермент
НЕТ, NET – нейтрофільні позаклітинні пастки
пкДНК – позаклітинна ДНК
DAMP – Damage-associated molecular patterns – молекулярний фрагмент асоційований із пошкодженнями
МПО – мієлопероксидаза
АФК – активні форми кисню
PAD-4 – пептидил- аргініндезаміназа 4
РМА – форболмірістатацетат
ГК – гіалуронова кислота, гіалуронан, гіалуронат
ЕСМ – позаклітинний матрикс
GAG – глікозаміноглікани
HAS2 – гіалуронансинтаза
lncRNA HAS2–AS1 - довга некодуюча РНК антисенс гіалуронансинтази 2
HIFs – фактори, що індуюються гіпоксією
HRE – гіпоксія-чутливий елемент
VHL - білок фон Хіпшель — Ліндау
PHD – пролілгідроксилаза
FIH - фактор, що інгібує HIF
HRE – гіпоксія-чутливий елемент промотора
p300/CBP – білки коактиватори
VEGF – фактор росту судин
TNF – фактор некрозу пухлин
IL – інтерлейкін
TMPRSS2 – трансмембранна протеаза серин 2

ВСТУП

Актуальність

Прогресування гострого респіраторного дистрес-синдрому при вірусних респіраторних захворюваннях, таких як грип або COVID-19, є дуже небезпечним станом та призводить до важких наслідків [1]. І хоча загальновідомо, що вік, стать і наявні супутні захворювання, включаючи рак, серцево-судинні захворювання й особливо цукровий діабет є основними факторами ризику для пацієнтів з COVID-19 [2-3], не для всіх пацієнтів із групи ризику характерний важкий перебіг хвороби – більшість одужує без кисневої підтримки та інтенсивної терапії. Пандемія SARS-CoV-2 продемонструвала численні проблеми медичного сортування та своєчасного надання допомоги із-за масового напливу великої кількості захворілих в медичні установи із-за неможливості чітко вирізнити справжні групи ризику серед тих хворих, хто звернувся за медичною допомогою.

Для вирішення проблеми перенавантаження лікарняних ліжок та розширення можливості своєчасної амбулаторної допомоги дуже важливим є дослідження патогенетичних механізмів та пошук нових, більш ефективних та точних прогностичних маркерів не тільки COVID-19, а й інших ГРВІ, які можуть супроводжуватись розвитком ГРДС та поліорганної недостатності.

Затвердженими критеріями тяжкості при важких респіраторних ураженнях легень наразі є низький рівень альбуміну, високий рівень D-димеру, феритину, прокальцитоніну, ІЛ-6, С-реактивного білка, молочної кислоти, ЛДГ, анізоцитоз, кількість поліморфноядерних лейкоцитів [4]. Однак статистичні дані свідчать про недостатню ефективність цих критеріїв.

У якості можливих ланок патогенезу COVID-19, які можуть бути перспективними прогностичними маркерами тяжкості коронавірусної хвороби, увагу привертають декілька клітинних реакцій та молекулярних

факторів, а саме, формування нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs), вивільнення позаклітинної ДНК в плазму крові, рівень гіалуронової кислоти в плазмі крові, експресія HIF-1,-2,-3 і довгих некодуючих РНК HAS2-AS1 і РНК HIF-1A-AS1.

Нейтрофіли вивільняють сітки, сформовані з їхньої ДНК, у відповідь на багато різних подразників (мікроорганізми та їхні продукти, хемокини). Пастки, створені деконденсованим хроматином, містять такі ферменти, як еластаза, протеїназа 3, мієлопероксидаза, катепсин G, дефензини та інші речовини з цитотоксичною дією. Взаємодія з їх мішенями, в тому числі форменими елементами крові, може призвести до тромбозу і пошкодження тканин [5]. Активація нейтрофільних гранулоцитів з надлишковим утворенням (NETs) вважається критичним патогенетичним механізмом різних патологічних процесів, це описано у пацієнтів із серцево-судинною патологією, цукровим діабетом або ожирінням [6-8].

У 2020 році було показано, що NETs задіяні у патогенезі коронавірусної хвороби та є ланкою механізмів розвитку ГРДС [9].

З огляду на це, потребує дослідження припущення, що NETоз та вивільнення з нейтрофілів цитотоксичних продуктів можуть бути фактором обтяження перебігу коронавірусної хвороби у хворих з групи ризику, зокрема, з наявністю метаболічних розладів.

Привертає увагу гіпотеза, що рентгенологічні помутніння, які спостерігаються у пацієнтів з COVID-19, відомі як «помутніння з матового скла», можуть бути пов'язані з накопиченням гіалуронової кислоти та інтерстиційним набряком легень, що потребує вивчення як можливий фактор патогенезу. В той же самий час зменшення площі газообміну спричинює гіпоксію, яка індукує каскад патологічних реакцій. Головне місце в цьому процесі займає транскрипційний фактор HIF, який здійснює захист від нестачі кисню завдяки активації транскрипції та експресії генів, необхідних для подолання чи пристосування клітини до умов гіпоксії, а саме

включення продукції альтернативних шляхів енергії, антиоксидантний захист, запобігання некрозу та апоптозу, ангіогенез тощо [10].

Але існує думка, що патологічне неконтрольоване збільшення експресії HIF на тлі пошкодження судин та прогресування гіпоксії призводить до переважання негативного впливу HIF над позитивним. Підвищена активація HIF також викликає тромбоутворення, збільшує проникність судин [11]. Тому зміни експресії та регуляції цього фактора при COVID 19 потребують детального вивчення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках відомчої теми НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України № III-10-19: «Значення довгих некодуєчих РНК в механізмах розвитку експериментальної та клінічної патології» (державний реєстраційний номер — 0118U007348, 2019-2023 рр.) за цільовою програмою «Підтримка пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) розробок відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України (реєстраційний номер 0120U101281, 2021р.).

Мета роботи

Метою роботи є встановлення нових ланок патогенезу COVID-19, пов'язаних з клітинною відповіддю нейтрофілів, експресією субодиниць фактора HIF та довгих некодуєчих РНК, та визначення нових прогностичних маркерів тяжкості перебігу захворювання у пацієнтів з групи ризику.

Відповідно до мети поставлені наступні **завдання**:

1. Провести ретроспективний аналіз клініко-лабораторних даних досліджуваної групи пацієнтів та розподіл на групи з легким, середньотяжким і тяжким перебігом коронавірусної хвороби.

2. Оцінити рівень спонтанного та індукованого формування нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) нейтрофілами крові пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19.
3. Охарактеризувати вивільнення позаклітинної ДНК, нейтрофільної мієлопероксидази та еластази у плазмі крові пацієнтів та їх можливу патогенетичну роль у перебігу захворювання.
4. Встановити зв'язок рівня гіалуронової кислоти в плазмі крові та експресії довгої некодуючої РНК HAS2-AS в лейкоцитах пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19.
5. Охарактеризувати зміни експресії генів, що кодують різні субдиниці транскрипційного фактору HIF та його генів-мішеней, а також регуляторної довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1 в лейкоцитах пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19 та їх можливу патогенетичну роль у перебігу захворювання.

Об'єкт дослідження — патогенез коронавірусної хвороби.

Предмет дослідження — встановлення нових патогенетичних механізмів тяжкого перебігу COVID-19 і пошук прогностичних маркерів тяжкого перебігу захворювання.

Методи дослідження:

— *анамнестичні* (збір інформації, клінічне спостереження та аналіз клініко-лабораторних даних для оцінки стану хворих та перебігу захворювання);

— *біохімічні* (визначення кількості вільної позаклітинної ДНК);

— *цитологічні* (виділення нейтрофільної фракції з цільної крові методом градієнтного розділення, спонтанні та індуковані клітинні реакції нейтрофілів);

— *молекулярно-біологічні* (визначення експресії мРНК та довгих некодуючих РНК методом ПЛР в реальному часі, імуоферментний аналіз рівня гіалуронової кислоти, МПО та еластази);

— *статистичні* (визначення середніх величин та їх похибок, однофакторний, двофакторний тест ANOVA, кореляційний аналіз Пірсона, тест Вілкоксона, побудова ROC-кривих, визначення коефіцієнту КоЕна).

Новизна одержаних результатів

У проведеному клінічному дослідженні вперше одержано показники спонтанного та індукованого формування нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) нейтрофілами крові пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19 та встановлено їх прямий зв'язок з обтяженням перебігу захворювання.

Вперше визначено зростання показників пкДНК у плазмі крові пацієнтів відповідно до ступеня тяжкості COVID-19. Встановлено, що параметри пкДНК та мієлопероксидази у плазмі крові можуть бути надійними предикторами тяжкості перебігу коронавірусної хвороби у пацієнтів з групи ризику. Визначено порогове значення рівня пкДНК, яке асоціюється з важчим перебігом COVID-19. Побудована ROC крива демонструє ефективність пкДНК як прогностичного маркера тяжкості перебігу COVID-19.

Вперше визначено рівні експресії довгої некодуючої РНК HAS2-AS1 в лейкоцитах пацієнтів з COVID-19. Показано, що рівень експресії HAS2-AS1 в лейкоцитах є більш надійним прогностичним критерієм важкого перебігу, ніж рівень гіалуронової кислоти в плазмі крові, та чітко відрізняє хворих із подальшим легким, середнім чи важким перебігом коронавірусної хвороби вже на етапі госпіталізації. Значущість HAS2-AS1 підтверджена дуже високим показником ефекту величини ω^2 (0,33), що свідчить про те, що HAS2-AS1 має потужний вплив на перебіг COVID-19 у загальній

популяції. Визначено порогове значення показника, яке асоціюється з важчим перебігом COVID-19. Показники побудованої ROC-кривої (чутливість 0.88, специфічність 0.8) підтверджують, що HAS2-AS1 також є ефективним інструментом для індивідуального прогнозування тяжкості перебігу.

Вперше визначено рівень експресії HIF1A-AS1 при COVID-19 та продемонстровано, що рівень експресії цієї довгої некодуєчої РНК зростає у важких пацієнтів з COVID-19 з групи ризику ще на догоспітальному етапі до настання клінічних ускладнень та важкої гіпоксії. Визначено порогове значення показника, яке асоціюється з важким перебігом COVID-19. 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 вагомим критерієм для клінічної діагностики.

Вперше визначено співвідношення між рівнями експресії HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α у пацієнтів з різною тяжкістю перебігу і охарактеризовано патогенетичну роль ізоформ транскрипційного фактору HIF при COVID-19. Це співвідношення має різний паттерн залежно від перебігу захворювання й може бути ключовим у визначенні тяжкості COVID-19, що може вказувати на відмінність механізмів відповіді на гіпоксію у пацієнтів із різними клінічними сценаріями. 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.

Практична значимість отриманих результатів

Одержані результати мають високу практичну значимість і дозволяють надати практичні рекомендації для застосування нових

предикторів тяжкості перебігу COVID-19 у пацієнтів з групи ризику. Серед них найбільшу вагомість можуть мати маркери запалення (МПО, пкДНК), судинної проникності (HAS2-AS1) та гіпоксії (HIF1-AS1 та HIF-3 α), застосування яких покращить прогнозування та моніторинг важкого перебігу COVID-19. Інтеграція цих даних у клінічну практику допоможе покращити комплексну ранню діагностику та прогнозування перебігу хвороби й оптимізувати лікування. Чітке виведення справжніх груп ризику дозволить при надзвичайних ситуаціях розвантажити стаціонари та зосередитись на прогностично неблагополучних пацієнтах, в той час як пацієнти з мінімальним ступенем ризику ускладнень зможуть лікуватись амбулаторно.

Особистий внесок здобувача

Ідея та дизайн дисертаційного дослідження сформовані автором спільно із першим науковим керівником к.б.н. Т.І. Древицькою та завідувачем відділу загальної та молекулярної патофізіології проф. В.Є. Досенком, а в подальшому структуровані і доповнені поточним науковим керівником д.м.н. А.Г. Портниченко. Автором самостійно проведено аналіз літератури, планування дослідження, сформовано клінічні групи пацієнтів, виконано анамнестичний збір інформації, клінічне спостереження та аналіз клініко-лабораторних даних пацієнтів, здійснено забір, консервацію та обробку біологічного матеріалу. Автором безпосередньо виконано біохімічні та молекулярно-біологічні дослідження та статистичну обробку одержаних результатів за допомогою співробітників відділу загальної та молекулярної патофізіології, які є співавторами опублікованих наукових праць. Автором безпосередньо проведено аналіз та узагальнення отриманих даних спільно з науковим керівником д.м.н. А.Г. Портниченко і за консультативною участю проф. В.Є. Досенка. Автором самостійно написані всі розділи дисертаційної роботи, підготовлено публікації та наукові доповіді.

Апробація результатів роботи

Результати дисертаційної роботи було представлено і обговорено на фахових наукових форумах: IX Національному Конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Івано-Франківськ, 2024); VII науково-практичній internet-конференції з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, 2024), XXIII читаннях ім. В. В. Підвисоцького (Одеса, 2024), науково-практичній конференції «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань» (Харків, 2024), міжнародній конференції “Безпека пацієнта сьогодні та в майбутньому. Нові напрямки діагностики прогностично важких хворих” (Київ, 2023), конференції молодих вчених (Львів, 2021), науковому семінарі Інституту фізіології ім. акад. О.О. Богомольця НАН України (Київ, 2024).

Публікації

За темою дисертації опубліковано 8 наукових праць, з них 4 статті та 4 тез доповідей. Всі статті опубліковані в журналах, які представлені у базі даних Scopus і за рейтингом Scimago віднесені до четвертого квартиля (Q4). Тези опубліковані в матеріалах проведених конференцій.

Структура та обсяг роботи

Структура і об'єм дисертації. Дисертація написана на 164 сторінках друкованого тексту та містить такі розділи: перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, матеріали і методи дослідження, результати дослідження та їх обговорення, аналіз і узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел. Дисертаційна робота проілюстрована 9 таблицями та 26 рисунками.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Коронавірусна хвороба та її механізми, пов'язані з нейтрофілами

Коронавірусна хвороба, яка з'явилась в 2019 році (COVID-19) і призвела до глобальної пандемії, була спричинена інфекцією коронавірусом-2 із розвитком важкого гострого респіраторного синдрому (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2). Більшість пацієнтів із COVID-19 демонстрували легкі та помірні симптоми, але близько у 15% пацієнтів розвивалась важка пневмонія, а приблизно у 5% зрештою розвинувся гострий респіраторний дистрес-синдром (ГРДС), септичний шок та/або поліорганна недостатність [12].

Основою клінічного лікування в той час були симптоматичне й патогенетичне лікування та киснева терапія з штучною вентиляцією легень для пацієнтів з дихальною недостатністю. Для діагностики захворювання використовувалось підтвердження тестами на основі RT-PCR в поєднанні з виявленням у пацієнтів специфічних для SARS-CoV-2 IgM та IgG. Крім того, важливими для розуміння процесів активації імунних реакцій та тривалості імунного захисту стали вивчення динаміки антитіл після перенесеного SARS-CoV-2 [13-14].

Загальновідомо, що ангіотензинперетворюючий фермент 2 (ACE2), функціональний рецептор SARS-CoV-2, відіграє вирішальну роль у патогенезі COVID-19, оскільки забезпечує проникнення вірусу в клітини людини [15-16].

Оскільки *in vitro* було показано, що ACE2 відіграє роль у захисті функції ендотелію та інгібуванні запальної відповіді [17], припускають, що інфекція SARS-CoV-2 призводить до зниження регуляції ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) через його інтерналізацію,

спричинену зв'язуванням SARS-CoV-2 з АПФ2, що є одним з механізмів, які сприяють тяжкості легеневих патологій [18].

Показано в експериментах на спонтанно гіпертензивних щурах, що активація ACE2 зменшувала утворення тромбів і прикріплення тромбоцитів до судин, тоді як ці ефекти були відсутні при інгібуванні ACE2 [19].

Вважається, що експресія ACE2 у легенях і вірусне навантаження SARS-CoV-2 збільшуються з віком та при багатьох хронічних захворюваннях, що може частково пояснити більшу тяжкість захворювання літніх пацієнтів із коморбідними станами при зараженні SARS-CoV-2 [15, 20].

Інфекція SARS-CoV-2 активує вроджені та адаптивні імунні реакції. Однак неконтрольовані запальні вроджені реакції та порушення адаптивних імунних реакцій можуть призвести до небезпечного пошкодження тканин. [21].

У пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19 дуже частою ознакою є лімфопенія з різко зниженою кількістю Т-клітин CD4+, CD8+, В-клітин і природних клітин-кілерів (NK) [22]. В той же час для більш тяжкого перебігу та поганого клінічного прогнозу характерне збільшення кількості нейтрофілів і зростання показника співвідношення нейтрофілів до лімфоцитів [23].

Імунопатологічні прояви, включаючи цитокиновий шторм та порушення адаптивного імунітету, є основними рушійними силами COVID-19, при чому інфільтрація нейтрофілів підкреслюється особливо. Було помічено, що екстравазація нейтрофілів широко відбувається в легеневих капілярах, міокарді та печінці під час патологоанатомічних досліджень пацієнтів з COVID-19 [24].

Дегрануляція, окислювальний вибух і NETosis визнаються надзвичайно важливими медіаторами в імунопатогенезі COVID-19 та грають ключову роль [25].

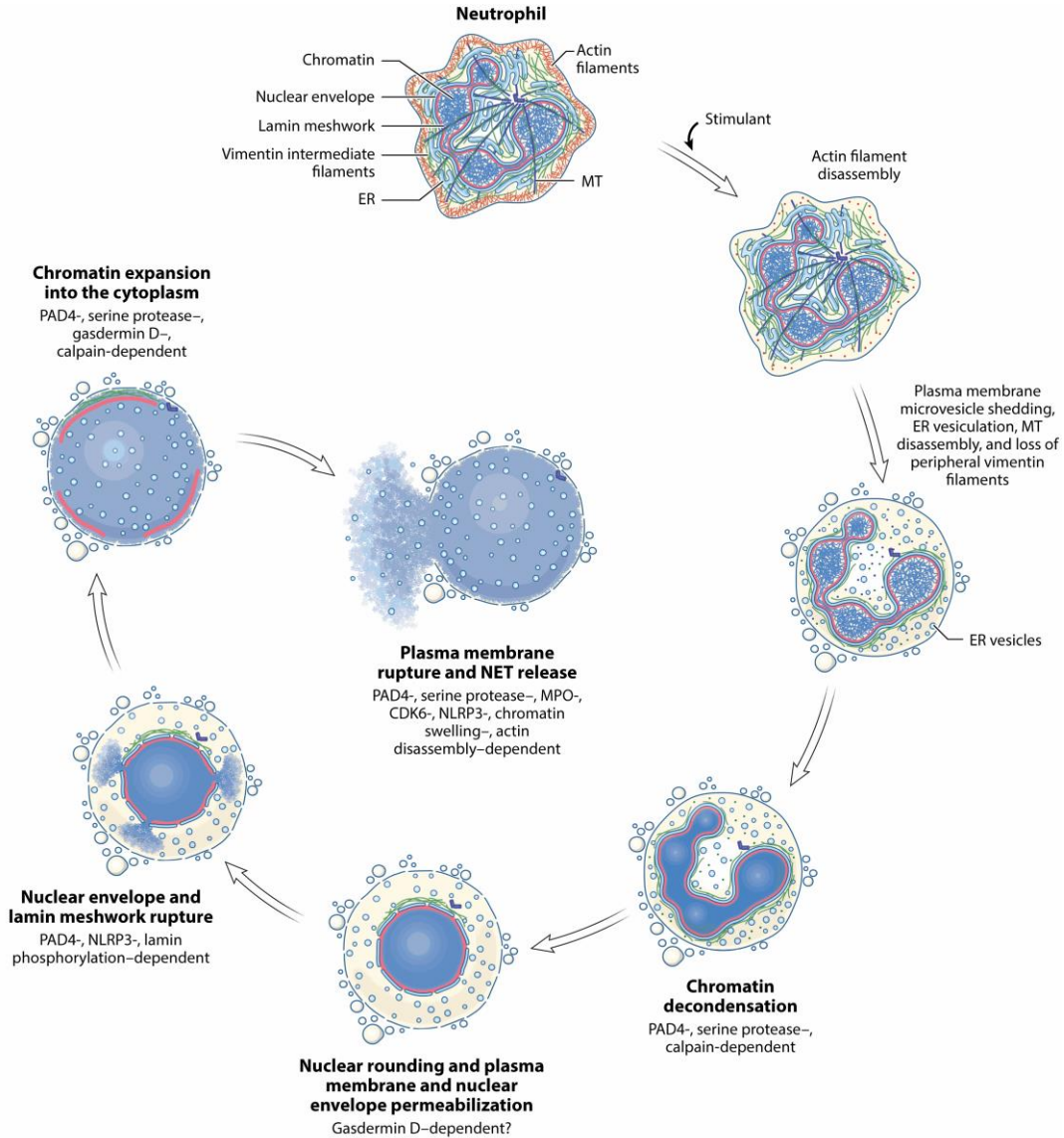
NETоз (NETosis) — це особлива форма запрограмованої клітинної смерті в нейтрофілах, яка характеризується екструзією ДНК, гістонів і антимікробних білків у павутиноподібну структуру, відому як нейтрофільні позаклітинні пастки (NET або NET) [26].

З класичної патофізіології відомо, що нейтрофіли вбивають мікроорганізми за допомогою трьох основних стратегій: фагоцитозу, дегрануляції та генерації активних форм кисню (АФК) [27]. Однак, у 2004 році Brinkmann із співавторами описав нову бактерицидну функцію нейтрофілів. Після стимуляції РМА та ІЛ-8 нейтрофіли вивільняли хроматин у вигляді павутиноподібної структури, вкритої мікробіцидними білками та ферментами. Вони назвали цю ДНК-білкову структуру позаклітинними пастками нейтрофілів. У NET нитки ДНК пов'язані з гістонами та білками-ферментами, включаючи нейтрофільну еластазу, мієлопероксидазу (МПО), катепсин G, протеїназу 3, кальпротектин, кателіцидини та дефензини [28]. Окрім РМА та ІЛ-8, наступні дослідження виявили ряд додаткових стимулів, здатних викликати NETоз, включаючи бактерії, гриби, віруси, комплекси антитіло-антиген, аутоантитіла та інтерферони [27].

Спочатку вважалося, що утворення NET – процес під назвою NETоз – вимагає загибелі нейтрофілів [29]. Пізніше було виявлено, що NET також можуть вивільнятися з живих клітин [30]. Позаклітинні пастки захищають господаря від інфекції, нейтралізуючи та знищуючи патогени, такі як бактерії, грибки, віруси та паразити [31]. Проте, окрім центральної ролі у протимікробному вродженому імунітеті, було доведено, що NET можуть відігравати шкідливу роль у патофізіології багатьох інфекційних та неінфекційних захворювань [31].

NETоз широко вивчений. Загалом, процес починається з активації нейтрофілів рецепторами розпізнавання, після чого відбувається виробництво активних форм кисню (АФК) і мобілізація кальцію, що призводить до активації пептидил-аргінін деїмінази 4 (PAD-4),

внутрішньоклітинного ферменту, який бере участь у дезамінації залишків аргініну на гістонах [32]. PAD-4, нейтрофільна еластаза і Gasdermin D безпосередньо каталізують процес деконденсації хроматину, розпаду ядра та розриву клітин [26].



Thiam HR, et al. 2020. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 36:191–218

Рис.1.1.1. Схема клітинних механізмів, що викликають НЕТоз, і їх молекулярні регулятори (адаптовано з Thiam et al. [15]). CDK6 - циклінзалежна кіназа 6; ER - ендоплазматичний ретикулум; МПО - мієлопероксидаза; МТ - мікротрубочка; NET - позаклітинна пастка нейтрофілів; NLRP3 - домен олігомеризації нуклеотидів. NOD - подібний рецепторний білок 3; PAD4 - пептидил аргініндеіміназа 4.

Втім, як вже було сказано вище, хоча NET і важливі для запобігання інвазії патогенів, їх надмірне утворення може призвести до низки негативних наслідків, таких як аутоімунне запалення та пошкодження тканин [33]. В багатьох роботах показано, що утворення позаклітинної пастки і подальша взаємодія з їх мішенями, в тому числі форменими елементами крові, можуть індукувати гіперкоагуляцію та призвести до тромбозу [5, 34]. Таке порушення коагуляції відіграє значну роль у патогенезі респіраторних захворювань.

Дослідження Songa підтвердило, що нейтрофіли утворюють NET при гострому ураженні легень [35], а кількість NET збільшується в альвеолярних просторах пацієнтів із пневмонією [36, 37]. Активація нейтрофільних гранулоцитів з утворенням NET є одним із фундаментальних патогенетичних механізмів ГРДС [38]. Показано, плазмові NET були вищими у пацієнтів із ГРВІ, пов'язаним з клінічною інфекцією (пневмонія та нелегеновий сепсис), порівняно з пацієнтами, які були госпіталізовані з гострими серцевими захворюваннями [39]. А серед пацієнтів із підтвердженою пневмонією ті, хто страждав на ГРДС, мали вищі плазмові NET порівняно з пацієнтами, у яких ніколи не розвивався ARDS [39].

Активація нейтрофільних гранулоцитів з надлишковим утворенням NET вважається критичним патогенетичним механізмом таких патологічних процесів, як цукровий діабет та ожиріння [40-43]. NET безпосередньо беруть участь у пошкодженні при ревматоїдному артриті [44] і сепсисі [45]. Щодо сепсису, Veras із співавторами у своїй роботі докладно описали, що під час експериментального та клінічного сепсису NET виявляються у високих концентраціях у крові та позитивно корелюють з біомаркерами ушкоджень життєво важливих органів та тяжкості сепсису [45]. Подібність між сепсисом і ключовими патогенетичними механізмами, пов'язаними з COVID-19, такими як надлишок цитокінів, коагулопатії, мікротромбоз і гострий респіраторний дистрес-синдром логічно

наштовхнули на думку, що NET запускаються під час інфекції SARS-CoV-2 і можуть сприяти пошкодженню тканин у пацієнтів з COVID-19.

Як було зазначено, NETosis — це нефагоцитарна реакція активованих нейтрофілів, яка характеризується екструзією ДНК в просвіт судинного русла. Цю позаклітинну ДНК можна лабораторно визначити відповідними методами. Цінність цього показника полягає в тому, що наявність позаклітинної ДНК (пкДНК) у плазмі крові та бронхолегеневому лаважі, разом з мієлопероксидазою і цитрульованим гістоном Н3, є первинними високоспецифічними маркерами НЕТО3у [46]

У здорової людини позаклітинна ДНК (пкДНК) присутня в невеликих кількостях [47], має короткий період напіввиведення [48], і переважно походить від циркулюючих гемопоетичних клітин. Склад і кількість пакДНК широко вивчалась при різних патологічних станах та розглядалась як потенційний неінвазивний біомаркер при багатьох захворюваннях та відторгненні трансплантата [49].

Циркулююча пакДНК бере участь в активації коагуляції та утворенні тромбу у пацієнтів із сепсисом [50], й під час вивчення ролі NETosis в патогенезі коронавірусної хвороби почали накопичуватись дані про підвищені, які можуть сильно корелювати з маркерами гострої фази, кількістю нейтрофілів і прогресуванням захворювання [46]. Задачею нашого дослідження було оцінити рівень пакДНК, яка є критичним компонентом позаклітинних пасток, у пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19 та оцінити її прогностичну цінність.

1.2. Гіалуронова кислота як ланка патогенезу коронавірусної хвороби

Під час епідемії COVID-19 клініцисти виявили ранній візуальний симптом захворювання на комп'ютерній томограмі (КТ), який мав назву «матове скло» (англ. ground-glass opacity symptom). Першими у спробі

пояснити це явище був Hellman із співавторами, які на підставі результатів аутопсії померлих пацієнтів з COVID-19, чиї легені були заповнені прозорим рідким гелем, із застосуванням біохімічних методів дійшли висновку, що це макромолекули гіалуронової кислоти [51].

Фарбування підтвердило, що гіалуронова кислота (ГК) обтурує альвеоли, а також присутня у потовщеному періальвеолярному інтерстиції. Цими авторами вперше було зроблене припущення, що гіалуронова кислота патогенетично пов'язана з гострим респіраторним дистрес-синдромом (ГРДС) у пацієнтів з важкою формою COVID-19, і ця молекула може бути використана в якості маркера для прогнозування важких випадків коронавірусного захворювання [51].

Ця думка стимулювала подальші дослідження зв'язку між накопиченням ГК та затемненням матового скла, що спостерігаються у пацієнтів з COVID-19 й важкістю подальшого перебігу. Гіпотеза про те, що рентгенологічні затемнення на томограмах пацієнтів з COVID-19 можуть бути пов'язані з накопиченням ГК, привернула увагу дослідників до попередніх робіт навколо ГК в контексті інших захворювань [52], адже інтерстиціальний набряк легень є одним із провідних симптомів тяжкого перебігу захворювання COVID-19, який безпосередньо пов'язаний із гострою дихальною недостатністю та потребою в кисневій підтримці [53, 54].

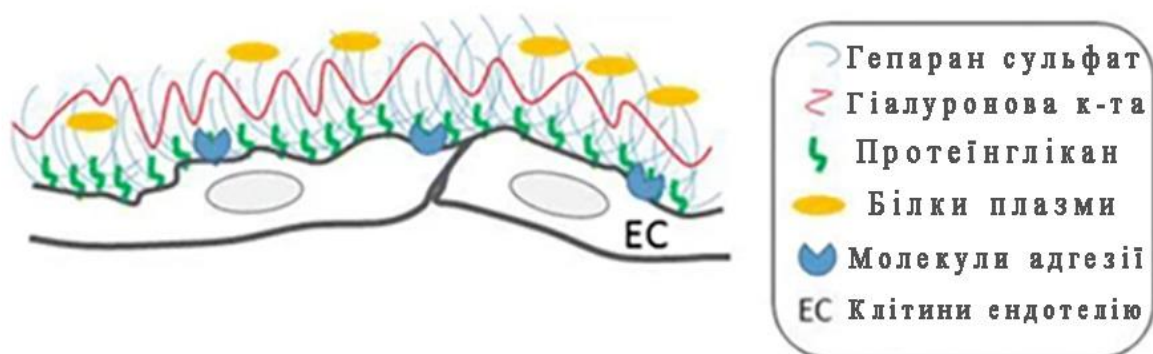


Рис 1.2.1. Структурна схема поверхневого шару ендотелію. Адаптовано з Ushiyama et al. (2016) [56].

Позаклітинний матрикс – це складна та динамічна макромолекулярна мережа, яка не тільки забезпечує структурну підтримку тканин, але також сприяє активації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що регулюють диференціацію, міграцію та проліферацію клітин [55].

Його основними компонентами є колаген і протеоглікани, які складаються з основного білка та одного або кількох полісахаридних ланцюгів, відомих як глікозаміноглікани. Найпоширенішим глікозаміногліканом у судинній системі є гепарансульфат, а решта складається з гіалуронової кислоти, хондроїтину і кератансульфатів [56].

Згідно з класичною та спрощеною точкою зору, ГК розглядалась раніше як молекула наповнювача простору, яка була гідрофільною і тому здатною до набухання [57].

Проте багато доказів продемонстрували важливу та активну роль ГК не лише у підтримці нормального гомеостазу, але й у виникненні патологічних процесів, таких як рак, фіброз, запалення, діабет, шлунково-кишкові та судинні захворювання та у процесах старіння [58, 59].

Завдяки своїй високій молекулярній масі та напівгнучкому полімерному ланцюгу гіалуронова кислота утворює високов'язку гелеподібну рідину, що забезпечує блокуючі властивості та виконує бар'єрні функції в тканинах [60].

Гіалуронова кислота виконує роль важливого регулятора запалення. Як показано у дослідженнях Retrey та Motte, ГК може стимулювати або пригнічувати запальні процеси, залежно від її молекулярної ваги. Великі молекули ГК активують запалення, тоді як малі — навпаки, зменшують його [59].

В іншій роботі Genasetti з співавторами продемонстрували, що ГК значно впливає на поведінку ендотеліальних клітин, особливо у процесах міграції та проліферації, які можуть бути критичними при захворюваннях на зразок COVID-19. Порушення цих процесів може призвести до посилення судинної проникності та запалення [61]. Viola описує біологічні

властивості ГК, які роблять її також елементом у відповіді організму на інфекцію. Згідно з представленими даними, ГК діє як захисний бар'єр, але при значному запаленні її захисні властивості можуть змінитися на шкідливі [62].

Високий рівень ГК у сироватці був виявлений як ранній маркер погіршення стану судинної проникності при лихоманці Денге [63]. На прикладі цієї тропічної лихоманки автори описали тісний зв'язок між ГК та важкими випадками ГРДС, зокрема тими, що супроводжуються підвищеним рівнем запальних цитокінів, таких як IL-1 β , IL-6 та TNF α . На думку Lin, цей зв'язок ґрунтується на тому, що цитокіни є потужними стимуляторами гіалуронатсинтази 2 (HAS2), про яку буде сказано нижче, у різних типах клітин, таких як ендотеліальні клітини, альвеолярні епітеліальні клітини легень та фібробласти. Відповідно, це узгоджується з концепцією, що стан підвищеного запалення призводить до вироблення та накопичення ГК в альвеолярних просторах у людей з важким перебігом захворювання та розвитком ГРДС [63].

Дослідження Lin є надзвичайно корисним для моделювання подібних клінічних прогнозів при COVID-19, адже асоціюється з ранніми ознаками погіршення судинної проникності.

Рівень ГК у сироватці було проаналізовано й в іншому дослідженні, де було також підтверджено кореляцію з тяжкістю ХОЗЛ та прогнозом виживання пацієнтів, що свідчить про його потенціал як маркера тяжких респіраторних захворювань [64].

Moretto із співавторами вивчав патогенетичну роль ГК при коморбідних станах, та показав, що підвищений рівень ГК у тканинах судин може призводити до зміни їх проникності та втрати еластичності, що є характерним для ряду судинних захворювань, включаючи атеросклероз та діабет [65]. При діабеті спостерігається підвищена активність ферментів гіалуронан-синтаз, які відповідають за синтез ГК (HAS1, HAS2 і HAS3). Це спричиняє надмірний синтез ГК, який призводить до накопичення цієї

молекули в судинах і підсилює запальні процеси. ГК залучена у розвиток запальних реакцій, що стимулює проліферацію гладком'язових клітин судин, сприяючи звуженню судинного просвіту, що особливо небезпечно при судинних захворюваннях і діабеті [65].

Показано, що, хоча ГК є важливим компонентом позаклітинного матриксу легень, його продукція та деградація повинні бути ретельно збалансовані [59].

Гіалуронова кислота синтезується різними типами клітин, включаючи фібробласти, ендотеліальні клітини, альвеолярні клітини та має виражені гідрофільні властивості, що дозволяють їй зв'язувати воду у кількості до 1000 разів більшій за власну молекулярну вагу. Відповідно, ГК може створювати в'язкі гелі, які відіграють помітну роль у підтриманні тканинного балансу та біомеханічної стабільності [56].

ГК взаємодіє з клітинними рецепторами, такими як CD44, TLR4, HAVP2, RHAMM та LYVE1, які присутні в нейтрофілах, макрофагах і ендотеліальних клітинах. Активація цих сигнальних шляхів запускає різноманітні процеси, включаючи формування NETs, активацію макрофагів, дегрануляцію нейтрофілів, запалення, тромбоз, ушкодження легень, проникність судин та мікросудинну ендотеліопатію [66].

Гіалуронова кислота виступає і як потужний медіатор запалення. Високі рівні ГК у поєднанні з активацією макрофагів і нейтрофілів сприяють запальному процесу в легенях. Це може запускати порочне коло запалення та накопичення рідини, що ускладнює перебіг COVID-19 у тяжких випадках [67].

Тому цей маркер став предметом подальших досліджень.

В контексті впровадження діагностичних заходів важлива робота Queisser, який наводить дані, що сироваткова гіалуронова кислота відіграє значну роль у патогенезі важкої форми COVID-19, адже присутній сильний зв'язок між циркулюючими фрагментами гіалуронової кислоти та

гіалуронідазою у сироватці і наявністю органної дисфункції та підвищеними рівнями запальних цитокінів у пацієнтів з COVID-19 [68].

У людини гіалуронова кислота синтезується трьома трансмембранними ізоферментами, які називаються гіалуронансинтетазами (HAS1, HAS2 і HAS3) [62]. В 2005 році Чао і Спайсер вперше описали існування HAS2-AS1, яка належить до класу природних антисмислових транскриптів й було показано, що ця довга некодуюча РНК (lncRNA) антисенс-1 гіалуронансинтази-2 (HAS2-AS1) є критично важливою у регуляції експресії гена HAS2 і продукції ГК [69]. HAS2-AS1 може бути розташована або в ядрі, або в цитоплазмі [70]. У 2014 році Vigetti та ін. продемонстрували, що HAS2-AS1 є важливим ядерним епігенетичним регулятором гена HAS2, який має вирішальне значення для індукції експресії HAS2, сприяючи ремоделюванню хроматину навколо промотору HAS2 [71]. Цей регуляторний крок передбачає додавання одного залишку ацетилглюкозаміну (O-GlcNAcylation) до р65 ядерного фактора NF-κB, який, у свою чергу, модулює промотор HAS2-AS1. Крім того, ця вісь NF-κB/HAS2-AS1/HAS2 також може регулюватися активністю білків сиртуїнів 1 (SIRT1) і прозапальними стимулами [72].

Виробництво ГК та експресія HAS2 можуть стимулюватися в умовах гіпоксії, оскільки промотор HAS2-AS1 містить гіпоксія-чутливий елемент (HRE), який реагує на HIF-1α [57]. Очевидно, що гіпоксія має визначальне значення в патогенезі COVID-19 і експресія HAS2-AS1 із подальшою активацією продукції ГК може вважатися провідним механізмом, що визначає важкість клінічного перебігу.

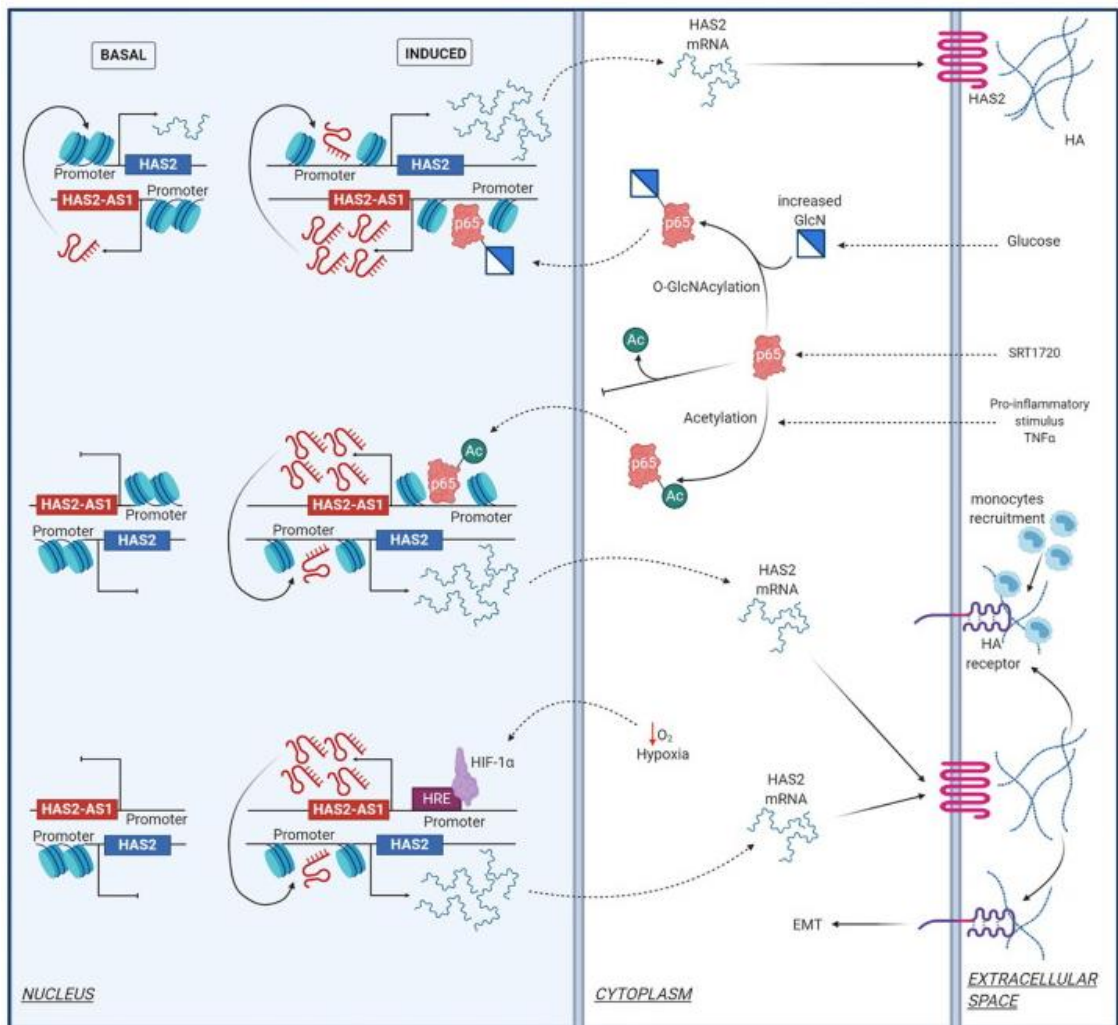


Рис. 1.2.2. Схематичне зображення функцій HAS2-AS1 в ядрі. Адаптовано з Parnigoni et al. (2021) [57]. EMT – перехід епітелію в мезенхіму; SIRT1 – білок сіртуїн 1, GlcNAc – ацетилглюкозамін.

Серед усіх ГК-синтез, HAS2 відіграє провідну роль у синтезі ГК завдяки своїм каталітичним властивостям, високій експресії щодо інших HAS і її критичній ролі під час розвитку серця [73]

HAS2 зазнає посттрансляційних модифікацій, таких як фосфорилування та O-GlcN-ацетилювання. Фосфорилування треоніну-110, опосередковане AMPK, пригнічує активність HAS2, тоді як O-GlcN-ацетилювання серину-221 стабілізує HAS2 у плазматичній мембрані, таким чином посилюючи виробництво ГК. Як було сказано вище, хоча HAS2-AS1

не кодує білок, ця довга некодуюча РНК регулює експресію генів, включаючи зміну структури хроматину на промоторі HAS2 [74].

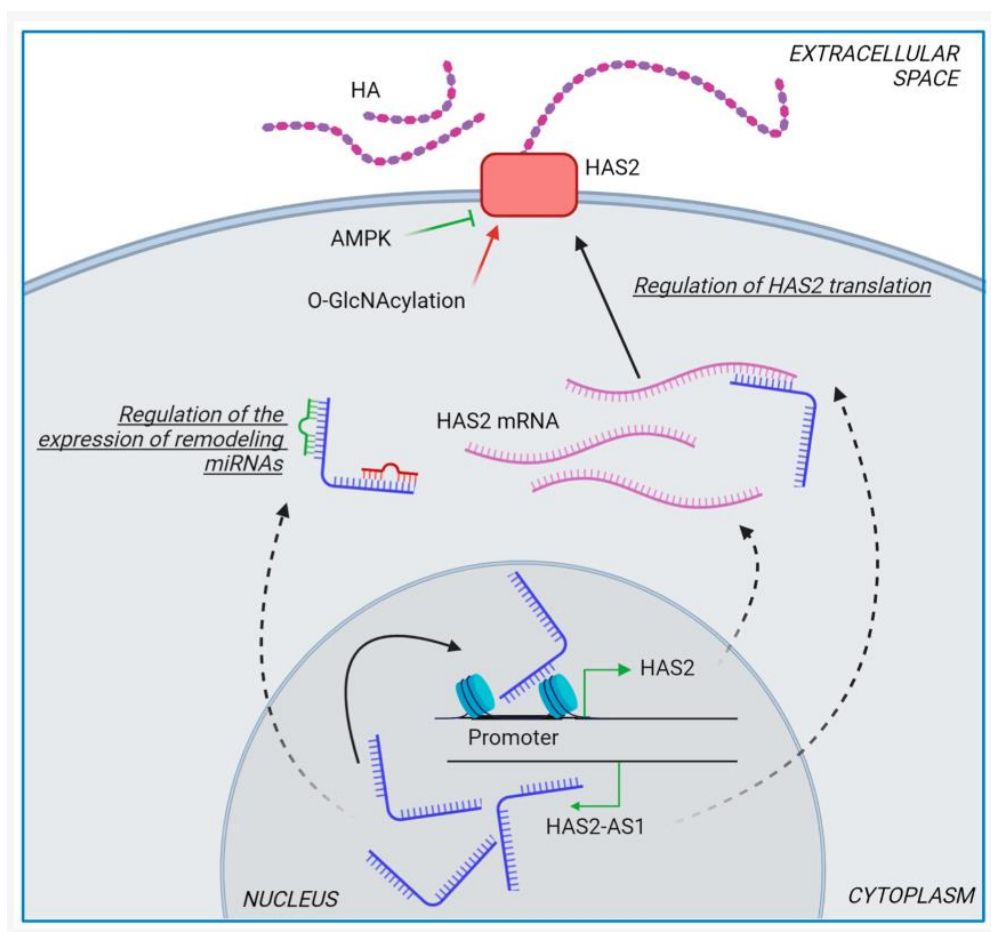


Рис. 1.2.3. Схематичне зображення регуляції HAS2. Адаптовано з Vitale et al. (2024) [74]. AMPK - аденозинмонофосфат-активована протеїнкіназа; GlcNAc – ацетилглюкозамін

Дотепер мало відомо про роль HAS2-AS1 у патологічних станах, і більшість літератури присвячено раку та судинним захворюванням. HAS2-AS1 найкраще вивчена саме в контексті онкології, й вважається важливим стимулятором проліферації та міграції пухлинних клітин, зокрема через HIF-1 α [57].

Втім, як показано в деяких роботах, профіль експресії генів HAS варіюється при різних легневих патологіях. Наприклад, зміни рівня HAS2 спостерігаються у пацієнтів з ідіопатичною легеневою артеріальною

гіпертензією, станом, що асоціюється з підвищеними загальними концентраціями ГК в легенях [75]. Експресія HAS2 підвищується в тканині легень у мишачих моделях астми [71, 76, 77].

Дослідження Camenisch та Spicer висловлює важливу думку, що синтаза гіалуронової кислоти (HAS2) є критичною для підтримання цілісності судин, і її дисбаланс, в тому числі неконтрольована продукція, може призвести до погіршення стану судин [73].

При COVID-19 експресія довгої некодуєчої РНК HAS2-AS1 не вивчалась.

Однак примітно, що в контексті онкологічних захворювань деякі дослідники вже пропонували використовувати HAS2-AS1 як прогностичний фактор для клінічного результату. Zhao та його колеги продемонстрували в 2019 році, що експресія HAS2-AS1 вища у пацієнтів із прогресуючою гліомою, що корелює з виживанням без захворювання та загальним часом виживання [78].

Розуміння зв'язку гіалуронової кислоти з ГРДС дозволило розпочати пошук терапевтичних моделей для зниження рівня ГК. Дослідження Vigetti в 2009 році демонструє, що зменшення синтезу ГК може допомогти у боротьбі із запаленням. Автори відзначили, що використання 4-метилумбеліферону, більш відомого, як лікарський препарат під назвою гімекромон, який використовується для лікування спазмів жовчовивідних шляхів, знижує активність ГК і може бути корисним для пацієнтів з респіраторними захворюваннями [79]. В 2015 році McKallip з співавторами успішно протестували на тваринах позитивний ефект використання 4-метилумбелліферону [80]. З початку пандемії ці дослідження почали продовжувати. Так, Yang в своєму дослідженні розглядає застосування гімекромону як потенційного засобу для контролю за рівнем ГК, підкреслюючи, що препарати, які пригнічують синтез ГК, можуть бути ефективними в управлінні запаленням при COVID-19 [81].

У підсумку, всебічний аналіз літератури висвітлює часто недооцінювану роль гіалуронової кислоти в плазмі як раннього прогностичного маркера тяжкості COVID-19, з наслідками, що поширюються на стани, вторинні до COVID-19, такі як алергічні реакції, легеневий фіброз і ХОЗЛ. Унікальні властивості гіалуронової кислоти роблять її важливим чинником у модулюванні імунної відповіді, впливаючи на гомеостаз, запалення та відновлення тканин. При підтриманні рівноваги гіалуронова кислота виконує захисну функцію. Проте порушення цього балансу можуть призвести до ускладнень на тлі коронавірусної інфекції.

1.3. Роль ізоформ фактора HIF у патогенезі коронавірусної хвороби

ГРДС, важка форма гострого ураження легень, є одним із небезпечних для життя ускладнень при вірусних патологіях дихальної системи, в тому числі при SARS-CoV-2 [82]. ГРДС призводить до інфільтрації багатобілками рідини, гіалуронової кислоти та імунних клітин у паренхіму легень [83]. Накопичення рідини в альвеолах знижує ефективність повітрообміну між альвеолами та судинною системою, що потім призводить до гіпоксемії та регіональної альвеолярної гіпоксії [84, 85].

Механізми реагування організму на гіпоксію та взаємозв'язок з імунною відповіддю є критично важливими в патогенезі SARS-CoV-2. Імунна відповідь за умов гіпоксії регулюється декількома шляхами та метаболічною активністю, з яких фактор, індукований гіпоксією (HIF), є найкраще охарактеризованим і називається основним регулятором відповіді організму на гіпоксію [10].

Хоча HIF-1 β постійно експресується в клітині, експресія HIF-1 α прогресивно зростає в умовах гіпоксії [11].

Дімеризація HIF-1 α з HIF-1 β в ядрі і подальше зв'язування цього комплексу з гіпоксія-чутливими елементами (HRE) у промоторі призводить до транскрипції таргетних генів, які є важливими для адаптивної відповіді при гіпоксії. Основними з них є гліколітичні ферменти, транспортери глюкози, еритропоєтин і ангіогенний фактор, фактор росту ендотелію судин (VEGF) [86].

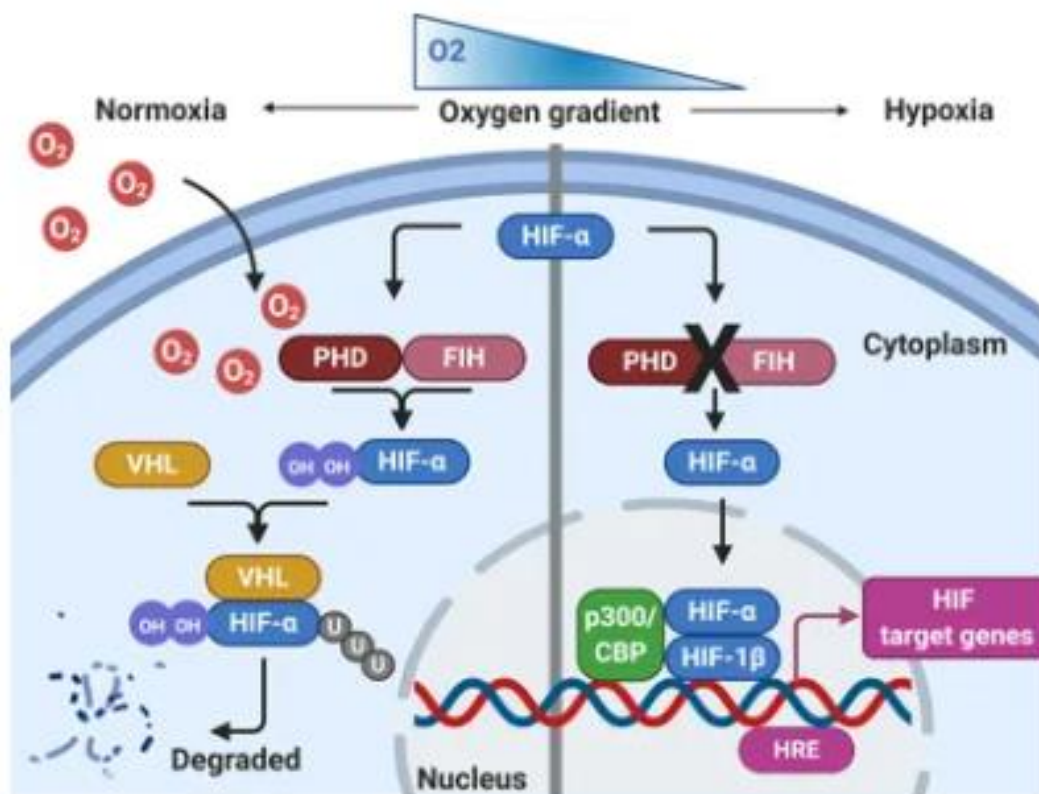


Рис. 1.3.1. Регуляція HIF шляхом гіпоксії. Адаптовано з Page et al. (2021) [10]. VHL - білок фон Хіппель — Ліндау; PHD – пролілгідроксилаза; FIH - фактор, що інгібує HIF; HRE – гіпоксія-чутливий елемент промотора; p300, CBP – білки коактиватори.

HIF-1 α широко експресується в багатьох вроджених імунних клітинах, включаючи макрофаги, нейтрофіли, дендритні та епітеліальні клітини. Під час нормоксії α -субодиниці HIF гідроксильються пролілгідроксилазами (PHD) і фактором, що інгібує HIF (FIH), за допомогою молекулярного кисню. Це призводить до того, що HIF- α

взаємодіє з білком фон Хіппеля — Ліндау (VHL) і стає мішенню для протеасомної деградації. В умовах гіпоксії гідроксилювання HIF- α за допомогою PHD/FIN інгібується, і HIF- α не піддається протеасомній деградації. Стабілізований таким чином білок HIF- α може транслокуватися до ядра, де він зв'язується з HIF-1 β і рекрутує коактиватори в гіпоксія-чутливому елементі (HRE) промотора, щоб ініціювати транскрипцію генів мішеней [10].

Крім того, гіпоксія також регулює інші ключові фактори транскрипції, які сприяють загальній клітинній відповіді, включаючи основний регулятор імунітету NF- κ B [87]. Опосередкована гіпоксією активація NF- κ B відбувається через зниження PHD-залежного гідроксилювання бета-субодиниці кінази ядерного фактора κ B (IKK β), що призводить до залежної від фосфорилування деградації I κ B α та вивільнення NF- κ B [87]. Таким чином, HIF-залежні та HIF-незалежні регуляторні шляхи в клітинах господаря, які регулюються під час тканинної гіпоксії, можуть впливати на прогресування хронічних запальних респіраторних захворювань. Стійке аномальне запалення та активність імунних клітин призводять до пошкодження тканин і є патологічною ознакою багатьох хронічних запальних респіраторних захворювань [10].

Субодиниці HIF-1 α і HIF-2 α структурно подібні, але їх моделі експресії відрізняються, що призводить до різної регуляції цільового гена. HIF-1 α повсюдно експресується в органах у більшості типів клітин, тоді як експресія HIF-2 α обмежена тканинами та особливо виявляється в органах і тканинах із високою васкуляризацією [88]. HIF-1 α бере участь у початковому процесі адаптації до гіпоксії, а експресія HIF-2 α зазвичай починається вже на тлі тривалої гіпоксії, а також внаслідок гіперглікемії [89]. Деякі дослідження показують, що HIF-3 α діє як цільовий ген HIF-1 α і може негативно регулювати активність HIF-1 α і HIF-2 α [90].

Показано в багатьох роботах, що вірусна інфекція може індукувати активацію HIF-1 α , яка в результаті активації може сприяти патогену, а не

хазяїну, адже різні типи вірусів використовують різні механізми стабілізації HIF-1 α з антиапоптозною дією на інфіковані клітини [91-93].

Так, Kondo з авторами приводять дані, що рівень експресії білка HIF-1 α підвищується через деградацію PHD1 і PHD3 латентним мембранним білком (LMP1) онкопротеїну вірусу Епштейна-Барра (EBV) [94]. А віруси грипу стабілізують HIF-1 α через порушення функції протеасоми та зниження експресії фактора, що інгібує HIF-1 α (FIH-1) [91]. Надмірна продукція прозапальних цитокінів, й зрештою, цитокіновий шторм, як ключовий фактор важкої пневмонії у пацієнтів з інфекцією H1N1, опосередковується HIF-1 α , який може індукувати продукцію прозапальних молекул у місці запалення [91]. Посилення експресії HIF-1 α -контрольованих генів, включаючи ті, що кодують гліколітичні ферменти, спостерігалось в клітинах, інфікованих HCV. Було показано, що тривала експресія білка HCV знижує окисне фосфорилування мітохондрій, а більш активне використання шляху гліколізу зберігає виживання клітин [92].

Отже, експресія HIF-1 α індукується у відповідь на нестачу кисню в місці запалення. Фагоцитарні клітини, включаючи макрофаги та нейтрофіли, присутні в інфікованих тканинах із гіпоксичним мікрооточенням можуть відігравати вирішальну роль у вродженій імунній відповіді проти патогенів, таких як віруси [84].

Фагоцити експресують низький рівень HIF-1 α при нормальному тиску кисню в крові. Однак, коли вони стикаються з низьким тиском кисню в місці інфекції, вони збільшують експресію HIF-1 α , що сприяє їх фагоцитарній активності [95]. Активність транскрипції HIF-1 α збільшує виживання фагоцитів і стимулює експресію деяких важливих факторів, включаючи VEGF, а також прозапальні цитокіни (TNF, IL-1 та IL-12) у місці інфекції [86]. HIF-1 α посилює регуляцію генів, що сприяють виживанню імунних клітин, і його інгібування в макрофагах призводить до різкого зниження рівня АТФ і подальшого порушення рухливості макрофагів [96].

В роботі Cichon показано, що вплив HIF-1 α на активність та виживання нейтрофілів в умовах гіпоксії також сприяє формуванню нейтрофільних позаклітинних пасток [97]. В той час, як інгібування HIF-1 α повністю запобігало утворенню NET [97].

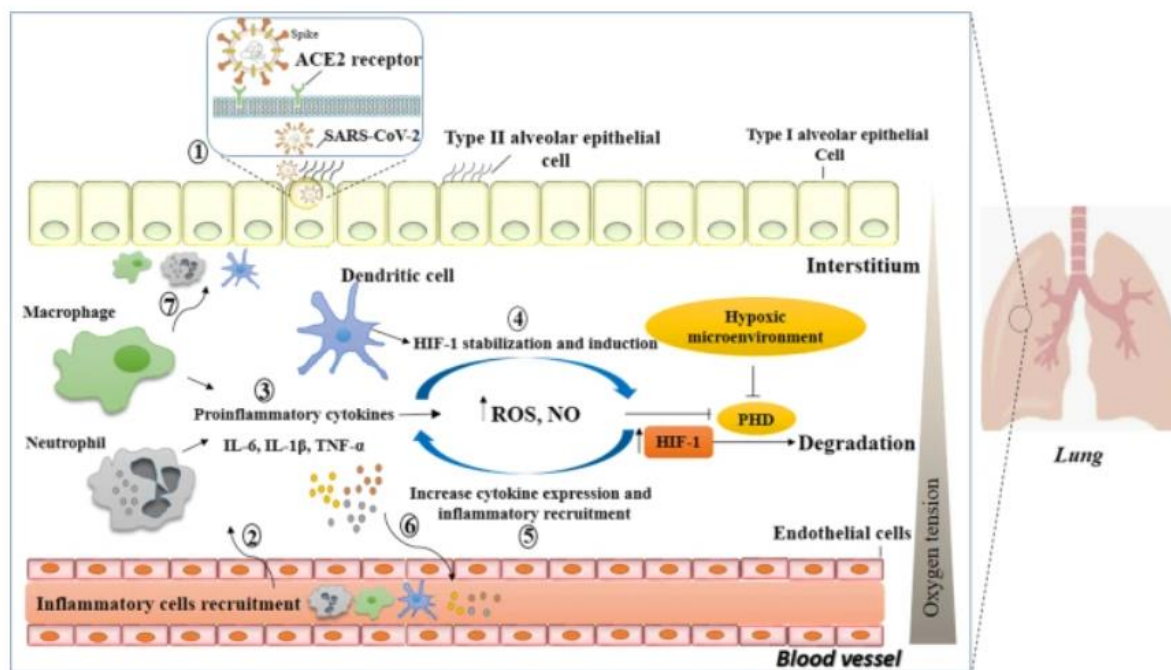


Рис. 1.3.2. Схематичне зображення інфекції SARS-CoV-2 і ролі HIF-1 α у патогенезі COVID-19. Адаптовано з Jahani et al (2020) [11]. ROS – активні форми кисню, PHD – пролілгідроксилаза, TNF α – фактор некрозу пухлин альфа

Під час інфекції SARS-CoV-2 трансмембранний білок ORF3a індукує HIF-1 α , який, у свою чергу, посилює вірусну інфекцію [82] та запальні реакції, про які було сказано вище. Саме таким чином, на думку авторів, HIF-1 α відіграє важливу роль у сприянні зараженню SARS-CoV-2 та індукції прозапальних реакцій на COVID-19. Tian в своєму дослідженні приводить результати, які показують, що рівень мРНК HIF-1 α є набагато вищим у моноцитах периферичної крові пацієнтів з COVID-19, ніж відповідно у здорових людей. Примітно, що рівень мРНК HIF-1 α був значно

вищим у мононуклеарних клітинах периферичної крові людей похилого віку порівняно з молодими здоровими особами [82].

У важких випадках COVID-19 активація HIF-1 α призводить до цитокинового шторму шляхом активації та стабілізації імунних клітин, що спричиняє вироблення макрофагами та нейтрофілами великої кількості запальних цитокінів, судинний витік (шляхом посилення регуляції VEGF) і руйнування бар'єрів альвеолярно-інтерстиціально-ендотеліально-епітеліального комплексу [11].

HIF-2 α , інша регульована субодиниця HIF, також відіграє важливу роль у клітинній відповіді на гіпоксію, зокрема в регуляції еритропоезу та метаболізму. Дослідження показують, що HIF-2 α може бути активованим при гіпоксії та глікімії, але його функції в контексті COVID-19 залишаються менш вивченими порівняно з HIF-1 α [98]. Попередні дані свідчать, що HIF-2 α може сприяти регуляції імунних клітин, зокрема макрофагів і дендритних клітин, в умовах хронічної гіпоксії, що також може впливати на перебіг інфекційних захворювань [98].

Транскрипційний фактор HIF-3 α є ще менш вивченим порівняно з HIF-1 α та HIF-2 α , проте його роль у регуляції адаптації до гіпоксії, зокрема в контексті патологічних станів, таких як COVID-19, набуває дедалі більшої уваги. HIF-3 α має декілька ізоформ, які можуть відігравати як регуляторну, так і інгібіторну роль у гіпоксичному сигнальному шляху, що може мати важливі наслідки для регулювання запальної та імунної відповіді на COVID-19 [99].

У своїй роботі Лі показує, що HIF-3 α здатен підвищуватись внаслідок сильної та тривалої гіпоксії, тоді як рівень HIF-1 α на тлі гострої гіпоксії швидко знижується вже протягом 8-16 годин [100], тим самим припускаючи, що HIF-3 α відіграє важливу роль у реакції легень на гіпоксичне пошкодження. Втім, ці дані є суперечливими, є існує протилежна думка, що HIF-3 α може сприяти захисту під час ранніх періодів

гіпоксії, а HIF-1 α , навпаки, може забезпечити захист від важкої та/або тривалої гіпоксії [101].

За даними літератури, вплив метаболічних порушень, зокрема, змін рівня глюкози на експресію та взаємодію субодиниць HIF у тканинах є суперечливим, але за більшістю свідчень, гіперглікемія порушує функціонування HIF-залежної регуляції транскрипції генів [102-105].

HIF-1 α антисмислова lncRNA (HIF-AS1), яка позитивно регулює рівень експресії HIF-1 α , добре вивчена в контексті онкології [106] оскільки гіпоксія є однією з головних особливостей мікрооточення пухлини, яка індукує масове вироблення ангіогенних факторів, хемокінів і біоактивних медіаторів для сприяння прогресуванню пухлини та метастазування [107]. Здатність пухлинних клітин переносити дефіцит кисню зумовлена накопиченням HIF-1, який запускає гени, що кодують гліколітичні рецептори та ферменти, включаючи транспортер глюкози GLUT1, гексокіназу II, лактатдегідрогеназу А і піруватдегідрогеназу кіназу [108]. Це призводить до переходу пухлинної клітини від окисного до анаеробного гліколізу, щоб адаптуватися до гіпоксичного стану та прямо сприяє кращому виживанню пухлин. Націлювання на HIF-1 через зв'язок з HIF-AS1 наразі розглядається як прогресивна стратегія придушення гліколізу для лікування раку [109].

Втім, регуляторний механізм мРНК HIF-1 α вивчений недостатньо. Thrash-Bingham і Tartof [110] вперше назвали антисмисловою некодуєчу РНК aHIF «HIF1A антисмисловою РНК 2» (HIF1A-AS2) або 3'аHIF-1 α , адже вона походить від 3'-області гена HIF-1 α . Потім у 2010 році Баранелло із співавторами ідентифікували іншу антисмисловою некодуєчу РНК, що походить з 5'-області гена HIF-1 α й назвали її HIF1A-AS1 або 5'аHIF-1 α [111].

І HIF1A-AS1, і HIF1A-AS2 мають довжину понад 200 нуклеотидів і належать до сімейства довгих некодуєчих РНК (lncRNA). Проте вони різні

за структурою та локусами. HIF1A-AS1 накопичується на ядерній мембрані, тоді як HIF1A-AS2 локалізується лише в ядрі [112].

Одна з ключових робіт в дослідженні взаємозв'язку транскрипційного фактору HIF-1 α на прикладі регуляції остеогенної диференціації клітин періодонтальної зв'язки була проведена командою китайських науковців в 2017 році. Так, Chen із співавторами показали, що приглушення HIF1A-AS1 суттєво не змінило експресію білка та мРНК HIF-1 α , тоді як приглушення HIF1A-AS2 значно індукувало експресію мРНК та білка HIF-1 α [113].

Однак, функції HIF1A-AS1 в контексті інших захворювань визначені поки що недостатньо. Лише кілька досліджень задокументували біологічну значимість HIF1A-AS1. Повідомлялося про підвищену експресію HIF1A-AS1 при аневризмі торакоабдомінальної аорти [114]. HIF1A-AS1 також було запропоновано як біомаркер колоректальної карциноми [115]. Функціонально HIF1A-AS1 є проапоптозною і антипроліферативною у гладких м'язах судин, клітинах Купфера та ендотеліальних клітинах пупкової вени [116-117].

При COVID-19 експресія HIF1A-AS1 не вивчалась.

Таким чином, аналіз даних літератури вказує, що для визначення нових ланок патогенезу тяжкого перебігу коронавірусної хвороби на тлі метаболічних захворювань і визначення прогностичних маркерів доцільною є оцінка показників функції нейтрофілів, експресії субодиниць фактора HIF, експресії довгих некодуючих РНК HAS2-AS1 та HIF1A-AS1 у пацієнтів, що й обумовило мету і завдання дисертаційної роботи.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Клінічний опис групи дослідження

У дослідженні були використані зразки крові пацієнтів, які були госпіталізовані до інфекційного відділення Київської міської клінічної лікарні № 4. Група пацієнтів включала 93 особи (51 чоловік та 42 жінки), які мали коморбідні стани – ожиріння (ІМТ понад 30), артеріальну гіпертензію та субкомпенсований діабет 2 типу. Середній вік пацієнтів складав $61 \pm 15,4$ роки. На амбулаторному етапі глюкокортикостероїди не призначалися. Контрольна група включала 10 практично здорових донорів (середній вік $59 \pm 12,3$ років) з ІМТ < 25 , без ознак коронавірусної хвороби та метаболічних порушень.

Взяття біологічного матеріалу пацієнтів і здорових донорів проводилося у відповідності до основних положень GCP, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицини, Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини і Закону України «Про лікарські засоби». Усі дослідження було погоджено Комісією з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (№ 6/20 від 11.11.2020).

У всіх хворих COVID-19 було підтверджено лабораторним методом ПЛР у реальному часі згідно зі стандартними протоколами, зроблено рутинні лабораторні обстеження при поступленні в стаціонар (глюкоза крові, гемоглобін, кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, сегментоядерних та палочкоядерних нейтрофілів, кількість лімфоцитів, моноцитів, еозинофілів, АЛТ, АСТ, сечовину, коагулограму, Д-димер). Біохімічні показники визначались стандартними лабораторними методами з використанням біохімічного аналізатора Selectra ProM, Нідерланди. Гематологічні показники визначались стандартними лабораторними методами з використанням гематологічного аналізатора ABX Micros 60,

Франція. Індекс маси тіла був розрахований шляхом ділення маси тіла (у кілограмах) на зріст пацієнта у квадраті (у сантиметрах квадратних).

Тяжкість захворювання визначалась ретроспективно згідно критеріям ВОЗ по класифікації захворювання COVID-19 за ступенем тяжкості [118]:

1. легкий ступінь тяжкості: пацієнти з симптомами, які відповідають визначенню випадку COVID-19 без ознак гіпоксії чи пневмонії. Загальні симптоми включають гарячку, кашель, втому, анорексію, задишку та міалгію. Інші неспецифічні симптоми включають біль у горлі, закладеність носа, головний біль, діарею, нудоту/блювання та втрату нюху/смаку.
2. Середній ступінь тяжкості: клінічні ознаки пневмонії (лихоманка, кашель, задишка, прискорене дихання), але без ознак важкої пневмонії та гіпоксемії за рівнем насичення крові киснем ($SpO_2 \geq 90\%$ при диханні атмосферним повітрям).
3. Важкий ступінь тяжкості: клінічні ознаки пневмонії (тобто лихоманка, кашель, задишка, прискорене дихання) плюс одне з наступного: частота дихання >30 вдихів/хв; сильний респіраторний дистрес та гіпоксемія: $SpO_2 < 90\%$ при диханні атмосферним повітрям.

Згідно з цими критеріями, пацієнти були згодом ретроспективно розподілені на три групи за ступенем тяжкості: легкий ($n=14$), середній ($n=42$) і важкий ($n=37$). Оцінка тяжкості COVID-19 проводилася на момент виписки пацієнта з лікарні. Середня тривалість лікування в групі пацієнтів з легким перебігом складала в середньому 8,17 днів, у групі з середньоважким перебігом – 11,01 днів, у групі з важким перебігом – 20,8 днів. У групі з важким перебігом COVID-19 померло 5 людей.

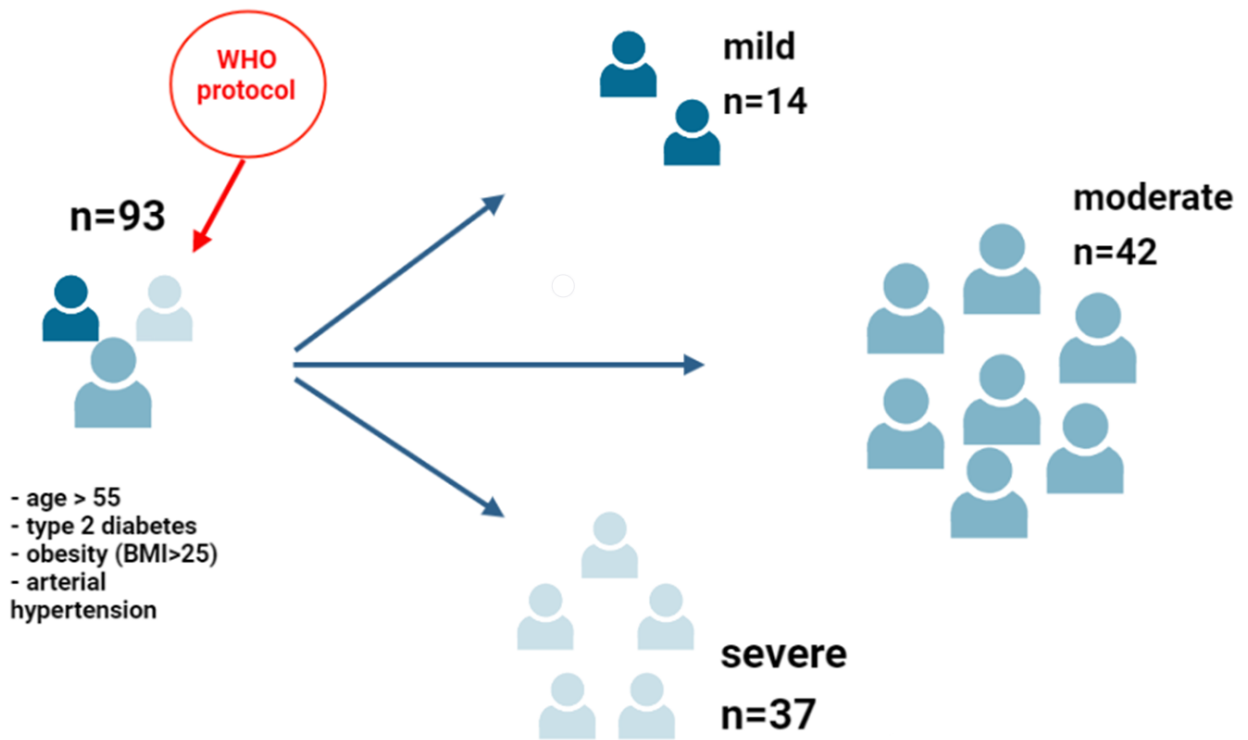


Рис.2.1.1. Ретроспективний розподіл когорти пацієнтів з COVID-19.

2.2. Збір крові та її фракціонування

Зразки крові відбирали у хворих одразу після госпіталізації на 7-12 добу від початку захворювання (за допомогою системи забору крові S-Monovette Sarstedt, стабілізатора антикоагулянту ЕДТА).

Для виділення нейтрофільних гранулоцитів використовували 1 мл венозної крові. Проводили фракціонування отриманої крові з використанням методики центрифугування в градієнті Перколу. Для цього стабілізовану натрієвою сіллю ЕДТА кров розводили 0.9% розчином хлористого натрію в співвідношенні 1:1, після чого нашаровували на заздалегідь підготовлений градієнтний розчин перколу, який складався з 4 шарів з відносною густиною 72%, 63%, 54%, 45%.

Вказані концентрації Перколу одержували при змішуванні 9 частин перколу і 1 частини 10-кратного розчину Хенкса (рН 7.0), після чого необхідна густина досягалася шляхом розбавлення відповідною кількістю 0.9% розчину хлористого натрію.

Центрифугування крові проводилося в три етапи:

1) при 400 g протягом 5 хв, після чого відбирався перший надосадовий шар, а відібраний об'єм компенсували додаванням еквівалентної кількості 0.9% розчину хлористого натрію;

2) 800 g протягом 15 хв, по завершенні якого відбувався відбір клітин між шарами густини 45% і 54% (моноцити), 54% і 63% (лімфоцити), 63% і 72% (нейтрофільні гранулоцити);

3) фракцію нейтрофільних гранулоцитів поміщали в епендорф та центрифугували при 1200 g протягом 5 хв. Надосадові залишки градієнта перколу заміщували середовищем для культивування (RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich), і обережно розводили в ньому осад.

Після відмивання кількість отриманих клітин оцінювалася шляхом підрахунку в камері Горяєва, потім отримані нейтрофільні гранулоцити поміщали в лунки пластикових планшетів, на дні яких були заздалегідь підготовані скельця та середовище RPMI з розрахунку 800 мкл на лунку. Клітини висаджували на круглі скельця (d=12 mm) з розрахунку 140000-160000 клітин/см², інкубували протягом трьох годин в термостаті при температурі 37°C.

2.3. Визначення рівня спонтанного та індукованого НЕТозу

Ізольовані нейтрофіли розділяли на 2 зразки: 1) контрольні для визначення рівня спонтанного НЕТозу (інкубація без впливу додаткових речовин); 2) активовані шляхом інкубації (3 години) з 20 нМ форбол-12-міристан-13-ацетатом (PMA) – для визначення рівня індукованого НЕТозу.

Для оцінки активності процесів утворення нейтрофільних позаклітинних пасток використовували методику підрахунку клітин з подвійним забарвленням флуоресцентними барвниками. Для цього скельце з прикріпленими клітинами виймали з планшета, промивали PBS, додавали барвник Hoechst 33342 (10 мкл стокового розчину на 780 мкл PBS) та

пропідіум йодид (1 мкл стокового розчину на 780 мкл PBS), концентрація – 3,75 мМ, і залишали на 10 хвилин в термостаті при температурі 37оС).

По закінченні часу ще раз промивали розчином PBS і проводили підрахунок на флуоресцентному мікроскопі Nikon Eclipse E200 використовуючи фільтр DAPI з фотофіксацією за допомогою камери DS-Fi1.0. На кожному склі підраховували по 500 клітин та визначали відсоток формування нейтрофільних пасток та інтактних нейтрофілів.

2.4. Вимірювання концентрації позаклітинної ДНК у плазмі крові

Концентрацію позаклітинної ДНК вимірювали в плазмі крові на спектрофотометрі Hitachi4000 за допомогою тест-набору Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen). Одразу після забору венозної крові проводили центрифугування протягом 10 хв при 1,5 тис g для розділення формених елементів та плазми. Плазму крові вносили у кювети для спектрофлуориметра, додавали 1,0 мл водного робочого розчину реагенту Quant-iT™ PicoGreen® до кожної кювети. Добре перемішували та інкубували протягом 2–5 хв при кімнатній температурі в темноті. Вимірювали флуоресценцію на таких довжинах хвиль: збудження ~ 480 нм, випромінювання ~ 520 нм. Перераховували концентрацію вільної ДНК у пробах, використавши побудовану калібрувальну криву.

Для приготування калібрувальної кривої використовувалась стандартна λ ДНК, що надається зі 100 мкг/мл у наборах Quant-iT™ PicoGreen®. Для отримання концентрації робочого розчину 2 мкг/мл її розводили в 50 разів TE буфером. Концентрацію ДНК детектували на хвилі поглинання 260 нм (A260) в кюветі з довжиною шляху 1 см. А 260 0,04 відповідає 2 мкг/мл розчину дволанцюгової молекули ДНК. Стандартну криву створювали в п'яти точках з концентраціями від 1 нг/мл до 1 мкг/мл, потім додавали 1,0 мл робочого водного розчину реагенту Quant-iT™

PicoGreen® (після попереднього розведення стокового розчину у 200 разів) до кожної кювети.

Стандартну криву створювали з використанням п'яти точок із концентраціями від 1 нг/мл до 1 мкг/мл, потім додавали 1,0 мл робочого водного розчину реагенту Quant-iT™ PicoGreen® (після попереднього розведення витікання у 200 разів) кювету.

2.5. Вимірювання концентрації мієлопероксидази людини (МПО) у плазмі крові

Вимірювання концентрації мієлопероксидази людини (МПО) у плазмі крові було проведено методом імуноферментного аналізу (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) за допомогою набору реактивів Myeloperoxidase Human ELISE Kit (Abcam, 119605). Усі реагенти, робочі стандарти та зразки готували відповідно до інструкцій виробника. Використовували аліквоти плазми крові після центрифугування протягом 10 хв при 400 g, які зберігалися при -20°C до моменту дослідження.

Під час проведення методики було внесено 100 мкл підготовлених стандартів і розведених зразків плазми у відповідні лунки планшета. Після цього запечатаний планшет інкубували при 37 °C протягом 90 хвилин. Після видалення вмісту кожної лунки до кожної лунки було додано 100 мкл біотинільованого антитіла проти мієлопероксидази людини, планшет закрито та проведена інкубація при 37 °C протягом 60 хвилин. Після інкубації планшет тричі промивали 300 мкл 0,01 М PBS. Згодом до кожної лунки додавали 100 мкл робочого розчину Avidin-Biotin-Peroxidase Complex і планшет знову інкубували при 37 °C протягом 30 хвилин. Після цього планшет п'ять разів промивали 0,01 М PBS. Потім у кожну лунку додавали 90 мкл барвника ТМВ, планшет закривали та інкубували при 37 °C у темряві протягом 25-30 хвилин. Після цього в кожну лунку додавали 100 мкл готового стоп-розчину для ТМВ. Результати оцінювали колориметричним

методом при 450 нм протягом 20 хвилин за допомогою рідера Immunochem-2100 (НТІ, США) із відповідним налаштуванням абсорбції.

2.6. Вимірювання концентрації еластази нейтрофілів людини в плазмі крові

Для визначення рівня еластази нейтрофілів людини використовувався метод Direct Detection Sandwich ELISA та набір Human Neutrophil Elastase/ELA2 ELISA Kit (Colorimetric). Спочатку проводили розведення зразків плазми та серійне розведення стандарту в реагенті-розріджувачі. Потім 50 мкл зразків розподіляли в лунки, де їх інкубували протягом 2 годин при 4°C. Після інкубації кожну лунку аспірували та промивали 300 мкл промивного буфера. Потім 50 мкл біотинільованого антитіла до еластази людини розподіляли в кожну лунку та планшет інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання в кожну лунку додавали 50 мкл SP Conjugate та інкубували протягом 30 хвилин. Після повторного промивання буфером у відповідні лунки додавали 50 мкл хромогенного субстрату. Планшет інкубували протягом 7 хвилин при кімнатній температурі або до досягнення оптимальної щільності синього кольору. Після прояву кольору 50 мкл стоп-розчину розподіляли в кожну лунку, щоб зупинити ферментативну реакцію. У результаті абсорбцію кожної лунки вимірювали при 450 нм протягом 20 хвилин за допомогою рідера Immunochem-2100 (НТІ, США) із відповідним налаштуванням абсорбції.

2.7. Вимірювання гіалуронової кислоти (ГК) у плазмі крові

Для вимірювання рівня гіалуронової кислоти ми використовували метод імуноферментного аналізу (ELISA) за допомогою набору Hyaluronic Acid ELISA (ab287799, Abcam, США).

Принцип цього аналізу полягає у виявленні гіалуронової кислоти за допомогою біотин-детекційного антитіла та HRP-стрептавідинового кон'югату, з подальшим спектрофотометричним виявленням результатів.

Всі реагенти та зразки були доведені до кімнатної температури за 30 хвилин до початку постановки методики. Було промито планшет 2 рази розчином для промивання перед додаванням зразків та контрольних лунок. Потім додано по 50 мкл стандартів у відповідні лунки, 50 мкл робочого розчину біотин-мічених антитіл в кожен лунку й інкубовано протягом 45 хвилин при 37°C.

Після цього розчин було злито й лунки промито розчином для промивання. Після цього було додано 0,1 мл робочого розчину SABС у кожен лунку, закрито планшет та інкубовано при 37°C протягом 30 хвилин.

Надалі з лунок було злито розчин й промито 5 разів розчином для промивання, як і на попередньому етапі. Надалі додано 90 мкл субстрату ТМВ у кожен лунку, закрито планшет і інкубовано при 37 °С у темряві протягом 15-30 хвилин. Через визначений час було додано по 50 мкл стоп-реагенту у кожен лунку й проведено вимірювання абсорбції при 450 нм протягом 20 хвилин за допомогою рідера Immunochem-2100 (НТІ, США).

2.8. Виділення РНК з лейкоцитів периферичної крові

Після центрифугування 2 мл венозної крові протягом 10 хвилин при 400 g верхній шар суспензованих лейкоцитів обережно аспірували за допомогою самплера та використовували для подальшої ізоляції РНК. Загальну РНК виділяли з лейкоцитарного шару за допомогою методу фенол-хлороформної екстракції. Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies Inc., США).

2.9. Зворотна транскрипція

Зворотню транскрипцію виконували за допомогою набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Німеччина) на 6 мкг загальної РНК з використанням випадкового гексамерного праймера. Отриману одноланцюгову ДНК використовували для ПЛР.

Реакція зворотної транскрипції проводилася у 2 етапи. На початку готувалася суміш із 1 мкл Random Hexamer primer, 6 мкл тотальної РНК та 5 мкл очищеної від нуклеаз деіонізованої Н₂О. Отримані зразки інкубували при температурі 70 °С впродовж 5 хв на ампліфікаторі Gene Amp® PCR System 2700, Applied Biosystems, США. На другому етапі до суміші додавали 2 мкл dNTP (×10), 4 мкл Buffer RT, 0,5 мкл Ribo Lock RNase inhibitor та 0,9 мкл RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. Отримані зразки термостатували при 42°С протягом 60 хв., після чого інкубували при 70°С впродовж 10 хв.

2.10. Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі

Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі проводилася на термоциклері 7500 Fast Real Time PCR від Applied Biosystems (США). Для здійснення полімеразної ланцюгової реакції у 96-лунковий планшет вносили по 10 мкл суміші із 5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix, 2 мкл кДНК, 0,15 мкл зонду для довгої некодуючої РНК PRINS 0,2 мкл Rox (1:9) та 2,65 мкл Н₂О. Денатурацію кДНК здійснювали за температури 95°С протягом 15 с. Приєднання зонду та елонгація здійснювалася за температури 60°С протягом 1 хв. Програма полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі складалася із 50 циклів.

2.11. Експресія довгої некодуючої РНК HAS2-AS1

Рівень експресії HAS2-AS1 визначали за допомогою набору TaqMan Assay: Hs99999903_m1 (Каталожний номер: 4326315E) відносно рівня експресії ендogenous гена людини АСТВ (Beta Actin) (VIC™/MGB зонд,

обмежений праймер). Рівні мРНК кількісно обчислювали за методом delta-Ct.

2.12. Експресія мРНК ізоформ транскрипційного фактору HIF: HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α

Рівень експресії мРНК різних ізоформ HIF визначали за допомогою набору TaqMan Assay: Hs00153153_m1 та Hs00541709_m1 відносно рівня експресії ендogenous гена людини АСТВ (Beta Actin) (VICTM/MGB зонд, обмежений праймер). Рівні мРНК кількісно обчислювали за методом delta-Ct.

2.13. Експресія довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1

Рівень експресії HIF1A-AS1 визначали за допомогою набору Assay ID: Hs04407794_m1 відносно рівня експресії ендogenous гена людини АСТВ (Beta Actin) (VICTM/MGB зонд, обмежений праймер). Рівні мРНК кількісно обчислювали за методом delta-Ct.

2.14. Експресія мРНК mTOR

Рівень експресії mTOR визначали за допомогою набору Assay ID: Hs00234508_m1 відносно рівня експресії ендogenous гена людини АСТВ (Beta Actin) (VICTM/MGB зонд, обмежений праймер). Рівні мРНК кількісно обчислювали за методом delta-Ct.

2.15. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводився в середовищі R (www.R-project.org, V.4.0) та за допомогою ліцензійного програмного забезпечення Origin (<https://www.originlab.com/>). Односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA) використовувався для порівняння групових середніх. Рівність дисперсій аналізували за допомогою критерію Левіна. Tukey HSD використовувався

для кількох порівнянь. Для встановлення значущості відмінностей між групами при нормальному розподілі використовували двосторонній t-критерій, в іншому випадку - критерій Манна–Уїтні. Дані представлені як середня арифметична \pm SEM (стандартне відхилення середнього значення випадкових вибірок, взятих із вихідної сукупності). Кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона для нормально розподілених даних. Робочі характеристики приймача (ROC) були розраховані пакетом R «pROC». Площа під кривою ROC (AUC) і порогові значення вибраних параметрів використовувалися для розрізнення легких і важких випадків. Різниця середніх вважалася статистично значущою при $p < 0,05$. Омега-квадрат (ω^2) використовувався для оцінки величини ефекту у кожній групі дослідження. Цей показник дозволяє оцінити практичну значущість результатів, вказуючи на частку загальної дисперсії, поясненої впливом досліджуваного фактора. Значення ω^2 інтерпретували відповідно до загальноприйнятих критеріїв: малий ефект (0,01–0,06), середній (0,06–0,14) та великий ($>0,14$). Розрахунки виконувались у середовищі R із використанням пакету «effectsize».

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Згідно з критеріями ВОЗ по класифікації важкості коронавірусної хвороби пацієнти були розподілені на три групи за ступенем тяжкості: легкий (n =14), середній (n =42) і важкий (n=37). Розподіл чоловіків по групам складав: легкий ступінь тяжкості – 9 осіб; середній ступінь важкості – 24 особи. Важкий перебіг – 18 осіб. Розподіл жінок по групам складав: легкий ступінь тяжкості – 5 осіб; середній ступінь важкості – 18 осіб. Важкий перебіг: 19 осіб. Середня тривалість лікування в групі пацієнтів з легким перебігом складала 8,17 днів, у середній групі – 11 днів, у групі з важким перебігом – 20,8. В групі з важким перебігом 5 пацієнтів померли.

Встановлено, що на початку захворювання (7-12 доба) пацієнти з різним ступенем тяжкості захворювання мали відмінності за деякими клінічними показниками (табл. 1, 2 – див. додаток 1). На відміну від пацієнтів з легким і середньотяжким перебігом, хворі з тяжким перебігом мали тенденцію до більш високої кількості еритроцитів та лейкоцитів у периферичній крові, тоді як кількість моноцитів була вірогідно меншою і зростала кількість паличкоядерних нейтрофілів (табл. 1). Це може вказувати на напруженість імунітету і зниження його резервів уже на початку захворювання у хворих, перебіг захворювання у котрих згодом ставав тяжким.

Серед біохімічних показників звертає на себе увагу більш високий рівень Д-димеру у групах з середньотяжким та тяжким перебігом, ніж у легко хворих, тоді як рівні глюкози, АЛТ, АСТ, креатиніну, сечовини, ПТТ та фібриногену не мали відмінностей між групами (табл. 2). Оцінка цих результатів свідчить, що ні гематологічні, ні біохімічні показники не надавали вірогідних прогностичних критеріїв щодо подальшого перебігу захворювання. Тому пошук таких критеріїв уявлявся важливим завданням цього дослідження.

При аналізі цих показників окремо у чоловіків і жінок виявлено (табл. 3, 4 – див. додаток 1), що у чоловіків більш тяжкий перебіг захворювання асоціювався з більш високими рівнями глюкози, еритроцитів, лейкоцитів, паличкоядерних нейтрофілів та сечовини, але більш низькими рівнями тромбоцитів і лімфоцитів у периферичній крові порівняно з пацієнтами з легким перебігом (табл. 3). У жінок ці відмінності були менш значущими, але спостерігали більш високий рівень паличкоядерних нейтрофілів і тромбоцитів при тяжкому перебігу захворювання (табл. 4).

3.1. Оцінка рівня спонтанного та індукованого НЕТозу

Для оцінки стану системи неспецифічного захисту була виконана оцінка рівня спонтанного та індукованого НЕТозу у пацієнтів з COVID-19 та контрольної групи добровольців.

У здорових донорів з контрольної групи рівень спонтанного НЕТозу без індукції становив 1,92% від загального числа нейтрофілів. Спонтанний НЕТоз хворих на COVID-19 був у чотири рази вищим і досягав 7,57% від загального числа нейтрофілів (рис. 3.1.1). Таким чином, нейтрофіли, виділені від пацієнтів із COVID-19, виробляли більше NET у стабільному стані (без стимуляції), ніж нейтрофіли здорових людей.

Після поділу пацієнтів із COVID-19 на групи за ступенем тяжкості захворювання (помірна, яка об'єднує легку та середню та важка) статистично значущої різниці у спонтанному та стимульованому НЕТозу між групами не спостерігалось, втім рівень індукованого НЕТозу у обох групах достовірно вищий, в порівнянні з рівнем спонтанного НЕТозу без стимуляції РМА (Рис.3.1.2).

Рівень РМА-стимульованого НЕТозу в контрольній групі здорових добровольців становив 10,14%. В той час як індукований НЕТоз у групі хворих на COVID-19 пацієнтів становив 16,74 % від загального числа нейтрофілів. (рис.3.1.2).

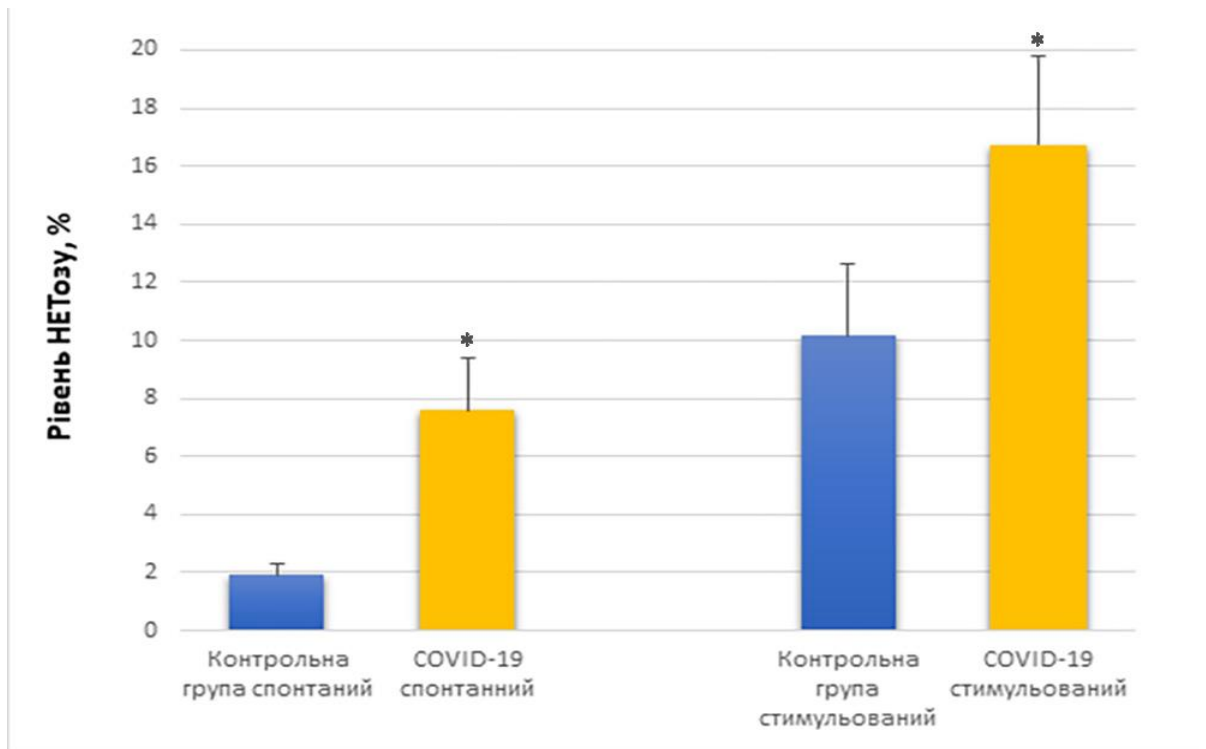


Рис. 3.1.1. Спонтанний та індукований НЕТОз ізольованих нейтрофілів в групі здорових добровольців та пацієнтів з COVID-19. * $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою

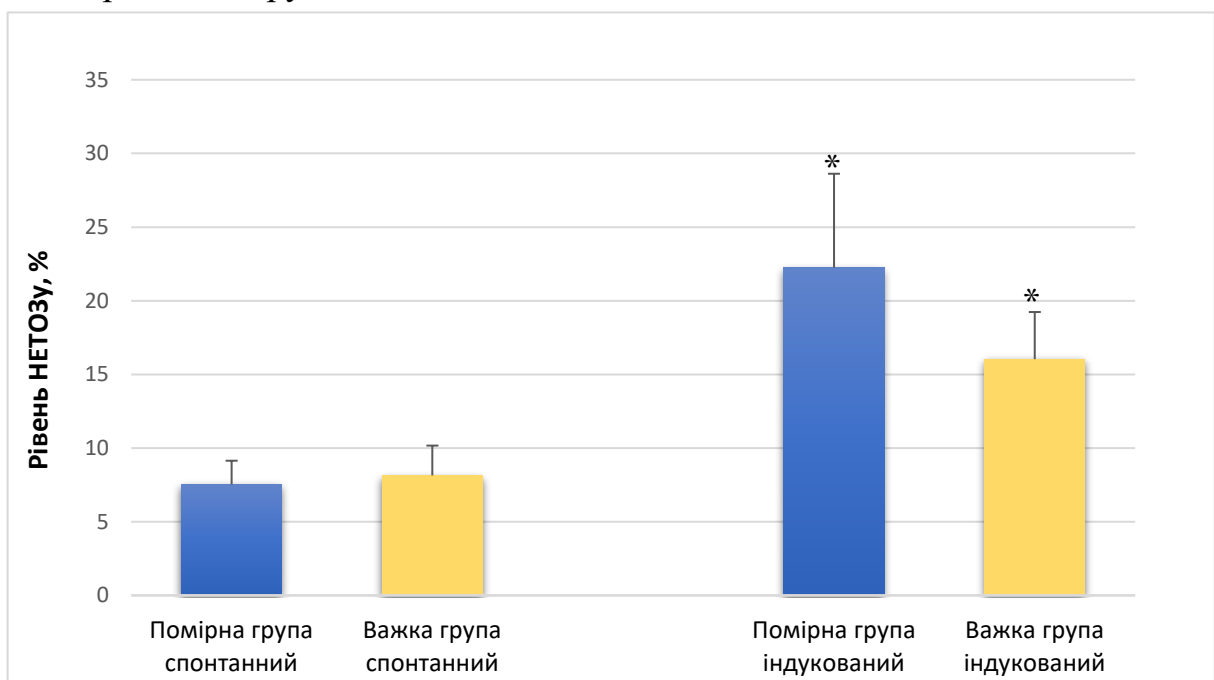


Рис. 3.1.2. Спонтанний та індукований НЕТОз ізольованих нейтрофілів в різних групах пацієнтів із COVID-19. * $p < 0,05$ порівняно з рівнем спонтанного НЕТОзу

Показові дані флуоресцентної мікроскопії у здорових добровольців і пацієнтів з COVID-19 представлені на рисунках 3.1.3 та 3.1.4. На даних флюоресцентних мікроскопіях ми бачимо деконденсовані нитки хроматину, які екстрадуковані в судинне русло після програмованої смерті нейтрофіла на тлі коронавірусної інфекції (НЕТоз).

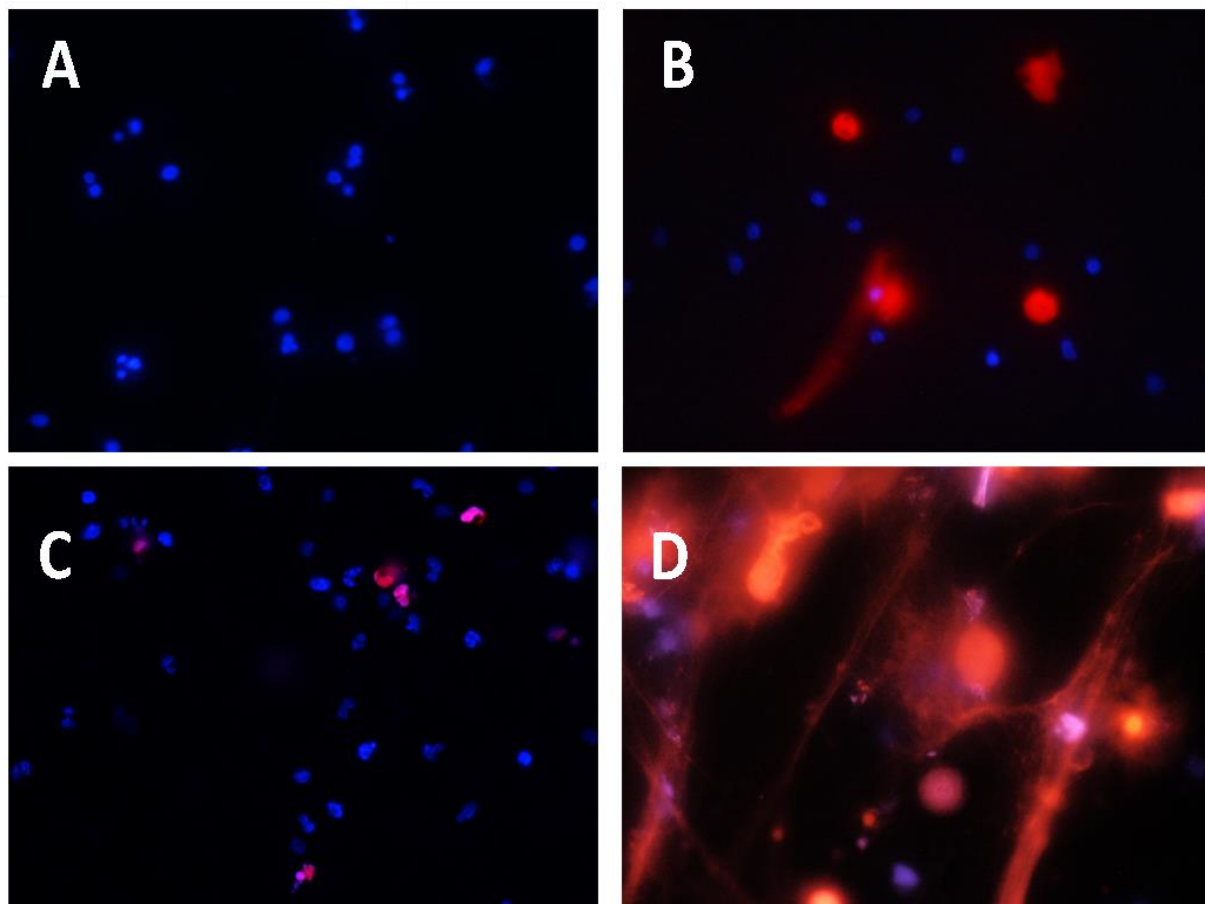


Рис. 3.1.3. Флуоресцентна мікрофотографія ізольованих нейтрофілів, пофарбованих Hoechst 33342 (синій) і пропідієм йодидом (червоний). Збільшення $\times 40$. А – нейтрофіли пацієнта в рівноважному стані; В – нейтрофіли здорового донора без COVID-19 після стимуляції PMA; С – нейтрофіли пацієнта з COVID-19 у рівноважному стані; D –нейтрофіли пацієнта з COVID-19 після стимуляції PMA.

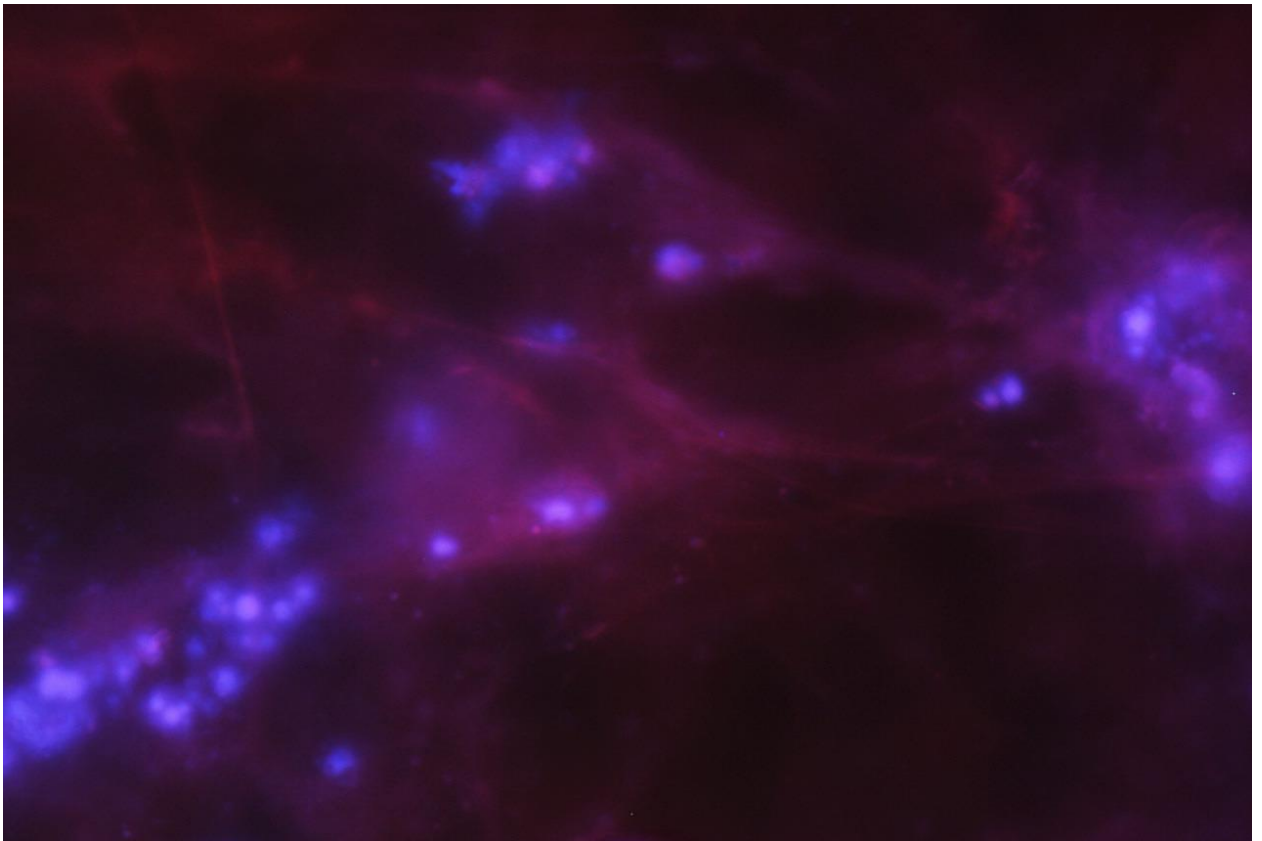


Рис. 3.1.4. Флуоресцентна мікрофотографія ізольованих нейтрофілів пацієнта із COVID-19, який належить до групи ризику, пофарбованих Hoechst 33342 (синій) і пропідієм йодидом (червоний). Збільшення x40.

Отримані показники свідчать про активацію системи неспецифічного захисту у пацієнтів, а саме, її нефагоцитарної ланки. Результати показують, що показники резерву активації нейтрофілів у хворих на ковід значно нижчі, що говорить про меншу здатність до стимуляції вже активованих нейтрофілів під дією ковіду навіть таким потужним активатором, як РМА.

3.2. Оцінка рівня позаклітинної ДНК в плазмі крові хворих на COVID-19.

Другим етапом нашого дослідження стало вимірювання рівня позаклітинної ДНК у добровольців та пацієнтів із різним ступенем тяжкості перебігу COVID-19 згідно протоколу ВОЗ, які було визначено пізніше, ретроспективним аналізом на основі спостереження за хворими в стаціонарі.

Згідно з отриманими даними рівень пкДНК у плазмі крові пацієнтів суттєво коливався від 1650,94 до 30691,73 нг/мл (Рис. 3.2.1.). У групі здорових донорів рівень пкДНК становив $2489,47 \pm 142,62$ нг/мл. Рівень пкДНК плазми у пацієнтів з майбутнім легким перебігом становив $3054,9 \pm 255,94$ нг/мл, що в 1,2 рази більше в порівнянні з групою здорових добровольців. У групі хворих із майбутнім помірним перебігом COVID-19 у подальшому, рівень пкДНК становив $4466,15 \pm 286,14$ нг/мл, що вже відрізняється від групи контролю здорових донорів та групи пацієнтів із легким перебігом в 1,7 раз та 1,4 рази відповідно. У пацієнтів з майбутнім тяжким перебігом коронавірусної хвороби рівень пкДНК в плазмі крові становив $8631,29 \pm 983,62$ нг/мл, що в 3,4 раз вище в порівнянні з показниками пкДНК в групі контролю, в 2,8 раз вище в порівнянні з показником у пацієнтів із легким перебігом COVID-19 та в 1,9 раз в порівнянні з рівнем пкДНК у пацієнтів із середнім ступенем тяжкості COVID-19.

Отримані результати свідчать про прогресивне зростання рівня вільної позаклітинної ДНК на момент госпіталізації у пацієнтів, що подальшому мали тяжкий перебіг COVID-19.

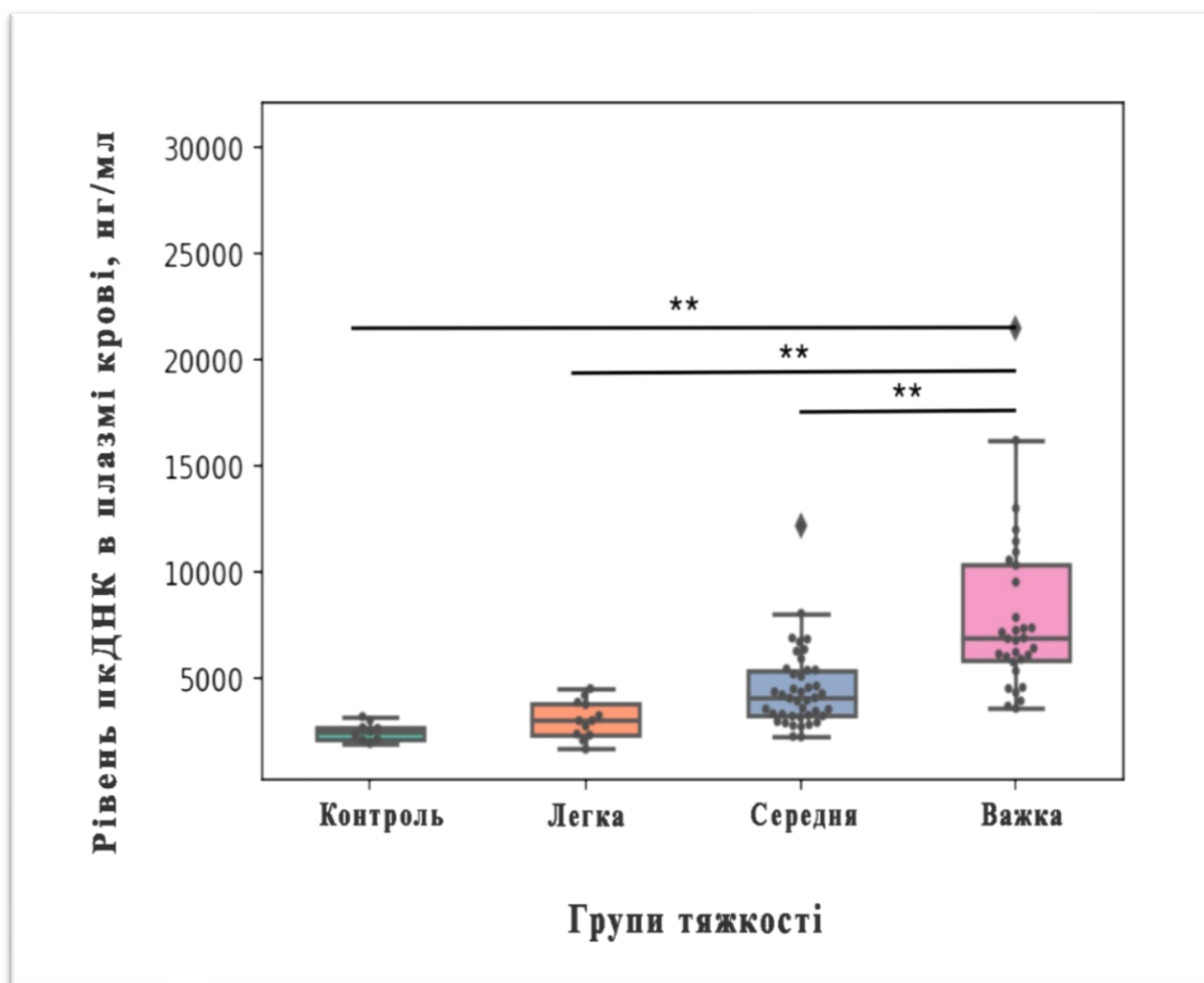


Рис. 3.2.1. Рівні позаклітинної ДНК в плазмі крові здорових донорів та пацієнтів із COVID-19 при різних ступенях тяжкості захворювання. ** ($p < 0,05$)

Також було проведено кореляційний аналіз між показниками вільної позаклітинної ДНК у плазмі крові хворих та рівнем НЕТоза. Зв'язок між рівнем спонтанного НЕТозу й кількістю позаклітинної вільної ДНК показано на рис. 3.2.2. Графік демонструє середню силу кореляційної значущості ($r = 0,4239$, $p < 0,05$). Графік кореляції між рівнем індукованого НЕТозу та концентрацією позаклітинної вільної ДНК представлено на рис. 6Б, де показано кореляцію середньої сили ($r = 0,5319$, $p < 0,05$).

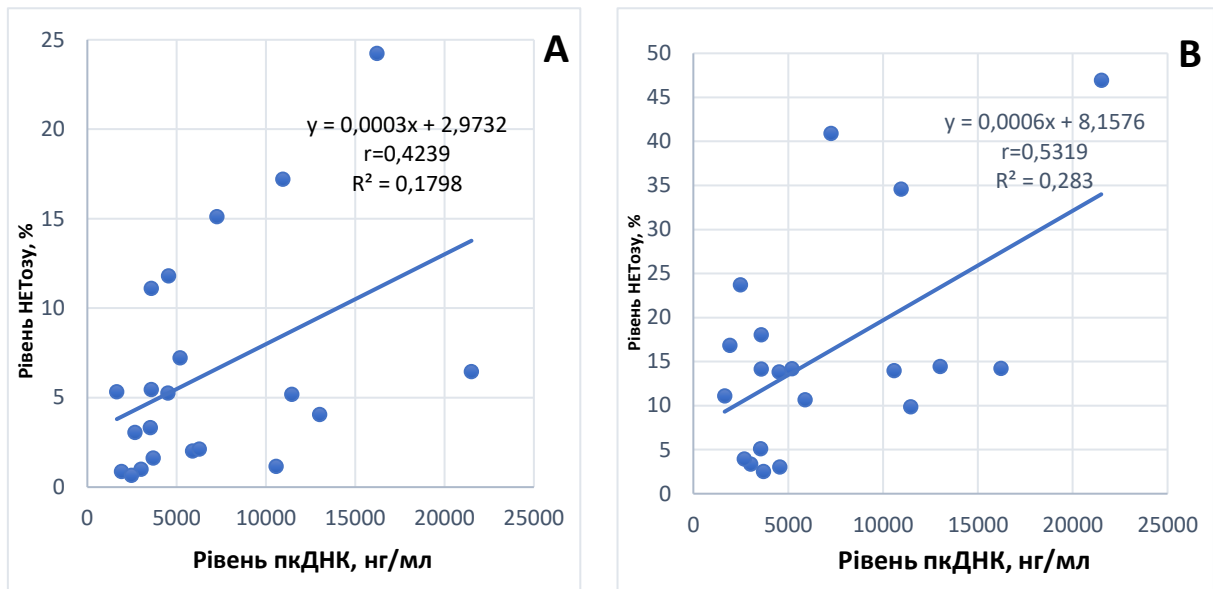


Рис. 3.2.2. Залежність між рівнем спонтанного (А) і стимульованого (Б) НЕТозу та рівнем позаклітинної ДНК у плазмі крові пацієнтів на COVID-19.

Одержані показники кореляції можуть вказувати, що значна частина позаклітинної ДНК в плазмі крові пацієнтів обумовлювалася розвитком НЕТозу, в тому числі індукованого розвитком запального процесу при коронавірусній інфекції.

Для оцінки специфічності та чутливості такого маркера, як рівень позаклітинної вільної ДНК було побудовано ROC крива (Receiver Operating Characteristic Curve), за допомогою якої можна прогнозувати тяжкість перебігу COVID-19 у групі високого ризику, яка включає пацієнтів із ожирінням, цукровим діабетом та артеріальною гіпертензією (рис. 3.2.3.). Площа під кривою склала 85%, що робить цю модель надійною. Ми розрахували граничне значення, щоб визначити значення маркера, який би розрізняв і передбачав тяжкість захворювання. Значення становить 4297 нг/мл з чутливістю 82 % і специфічністю 72 % (AUC0,856, 95 % ДІ 0,778-0,935, $p < 0,05$). Результати аналізу ROC-кривої для позаклітинної ДНК (пкДНК) демонструють її ефективність 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. Специфічність 72 % вказує, що 72 % пацієнтів із легким перебігом або без ускладнень коректно визначаються як такі, мінімізуючи хибнопозитивні результати. Порогове значення 4297 нг/мл використовується для розмежування груп ризику: рівень пкДНК вище цього значення асоціюється з важчим перебігом COVID-19.

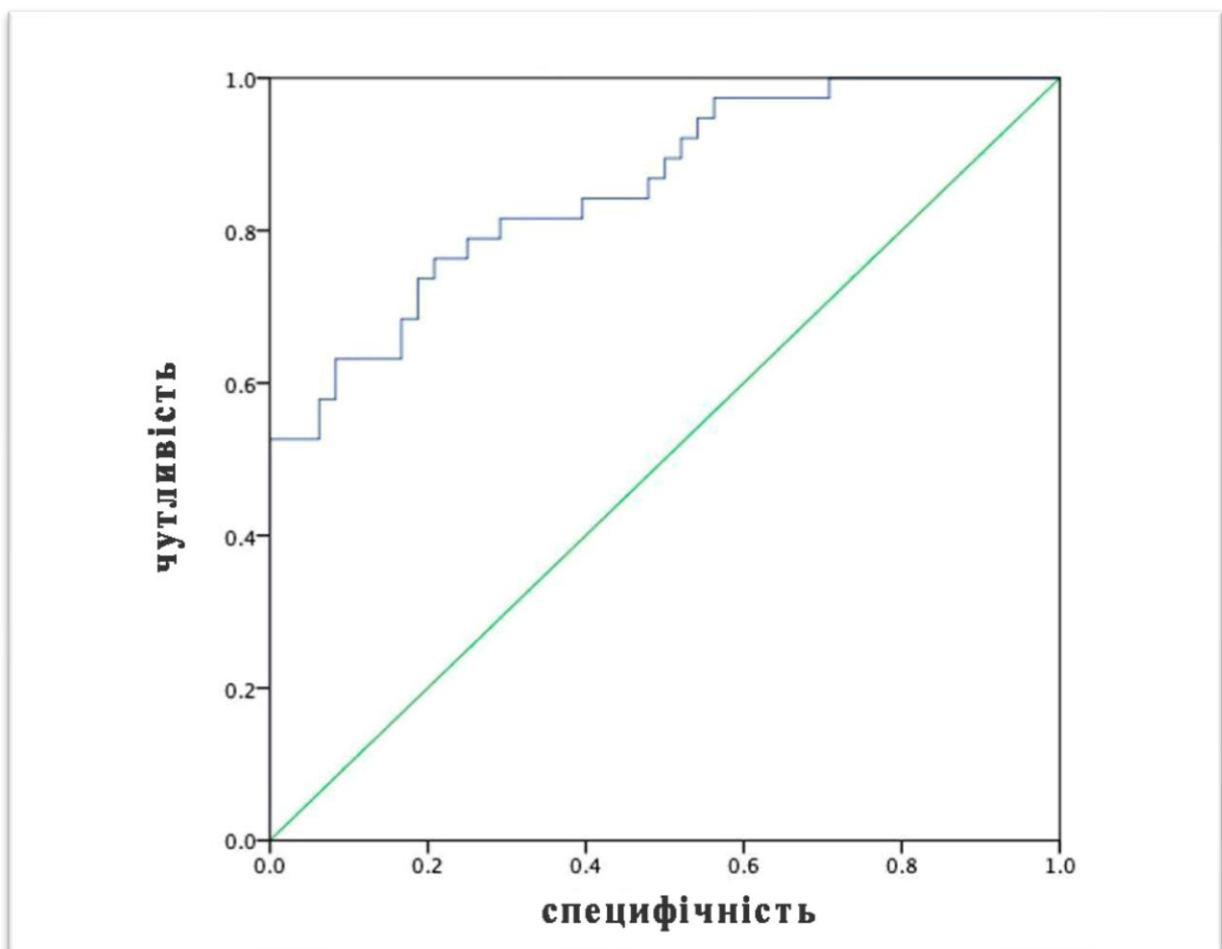


Рис. 3.2.3. ROC-крива для визначення специфічності та чутливості такого маркера, як концентрація пкДНК у плазмі крові пацієнта. Пороговий рівень становить 4297 нг/мл із чутливістю 82% і специфічністю 72% (AUC0,856, 95% ДІ 0,778-0,935, $p < 0,05$).

3.3. Визначення рівня нейтрофільної еластази та мієлопероксидази (MPO) в плазмі крові хворих на COVID-19.

Рівень нейтрофільної еластази в плазмі крові у хворих з легким перебігом COVID-19 становив $10,59 \pm 0,56$ нг/мл та статистично не відрізнявся від показника у групі контролю здорових добровольців й практично не відрізнявся від рівня еластази у групі хворих із помірним перебігом, який становив $11,29 \pm 0,567$ нг/мл. Рівень нейтрофільної еластази у хворих з тяжким перебігом вищий на 1,5 раз та становить $17,06 \pm 1,01$ нг/мл. Рівень еластази в плазмі крові пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 показує статистично значущу різницю з рівнем пацієнтів з легким та середнім ступенем тяжкості ($p < 0,001$) (рис. 3.3.1.). Втім, в роботі Karampoor, показник нейтрофільної еластази в контрольній групі був в 1,9 раз нижчий в порівнянні з групою пацієнтів із помірним перебігом [119], але поділ на групи був дещо іншим.

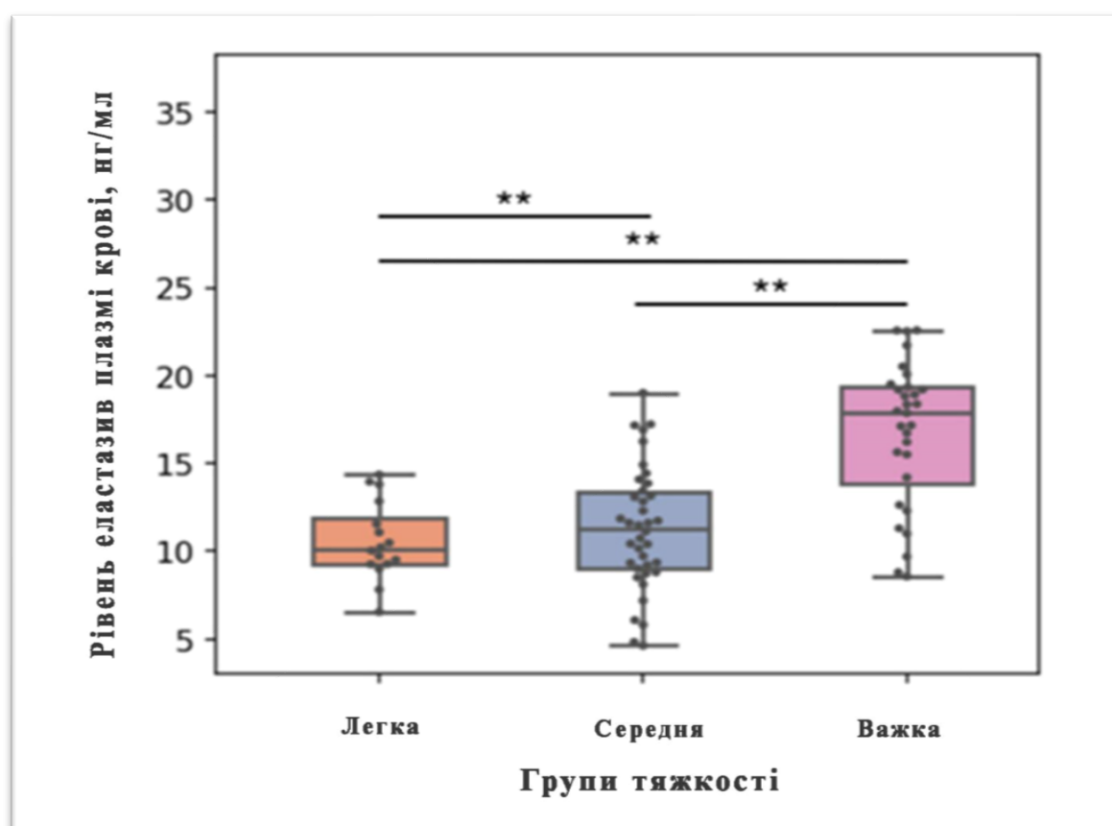


Рис. 3.3.1. Рівень еластази у пацієнтів з різними ступенями тяжкості COVID-19. ** – $p < 0,05$.

Показано, що у пацієнтів із легким перебігом COVID-19 рівень МПО у плазмі становив $4031,6 \pm 606,09$ нг/мл, що відрізнявся від показника, отриманому на статистично значущій когорті пацієнтів, у здорових добровольців в два рази [120]. У групі пацієнтів із середньо-тяжким перебігом рівень МПО зростає в 2,2 рази відносно показника в групі пацієнтів із легким перебігом та становить $9068,9 \pm 699,257$ нг/мл. У пацієнтів із тяжким перебігом рівень МПО становить $16423,5 \pm 1120,57$ нг/мл, що в 4,1 раза більше в порівнянні з значенням показника в групі з легким перебігом COVID-19. Дані демонструють статистично значущі відмінності рівнів МПО між усіма групами пацієнтів із COVID-19 (рис. 3.3.2).

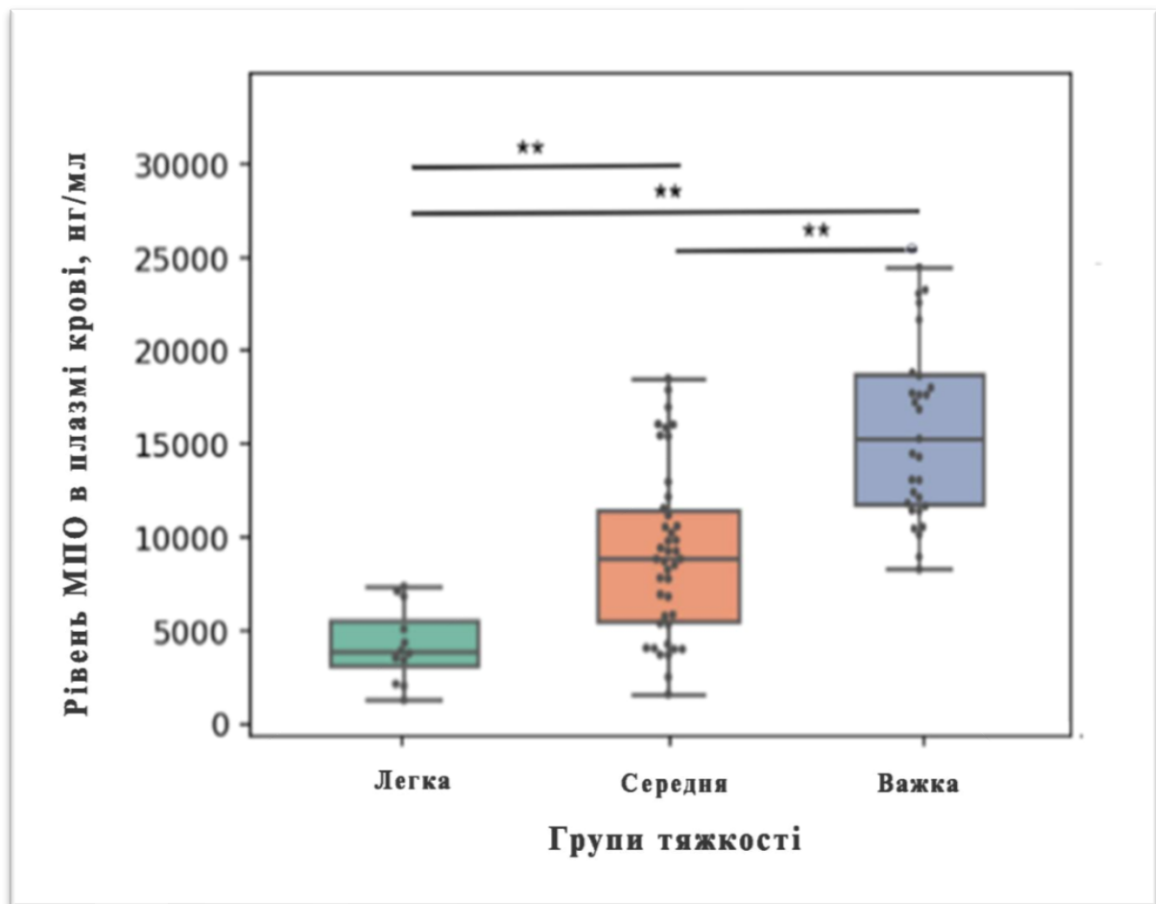


Рис. 3.3.2. Рівень мієлопероксидази у пацієнтів з різними ступенями тяжкості COVID-19 . ** ($p < 0,05$)

Ми використали подвійну логістичну регресію для визначення найбільш критичних предикторів, пов'язаних із ризиком важкого перебігу COVID-19. Базова модель, без включення будь-яких предикторів, дозволяла продемонструвати 57 % класифікаційної здатності. Після додавання всіх клінічних факторів, а саме рівня гемоглобіну, кількості еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів, моноцитів, еозинофілів, трансаміназ (АЛТ та АСТ), загального білка, глюкози, креатиніну, ПТІ, фібріногену та Д-димеру була побудована класична модель з 85 % прогностичним потенціалом, яка включала такі фактори: 1) рівень позаклітинної ДНК; 2) глюкоза; 3) паличкоядерні нейтрофіли. Таким чином, після того, як були обрані найбільш значущі фактори, була побудована модель, дані якої представлені в таблиці 1.

Таблиця 5. Логістична регресія, яка відображає прогностичний потенціал найбільш значущих предикторів важкого перебігу COVID-19, якими математично виявились пкДНК, в поєднанні з рівнем глюкози та кількістю паличкоядерних нейтрофілів.

		B	S.E.	Wald	Sig.
Крок 1	Рівень пкДНК, нг/мл	0.00054	0.00017	9.69807	0.00184
	Глюкоза	-0.00005	0.00002	5.14506	0.02331
	Паличкоядерні нейтрофіли	0.13175	0.06549	4.04653	0.04426
	Константа	-2.78589	1.36829	4.14540	0.04174
a. Variable(s) entered in step 1: Levels of free-cell DNA ng/ml, glucose, and stab neutrophils.					

B – коефіцієнт регресії, S.E. – стандартна похибка, W - Wald Statistic, Sig - p-value

Результати, представлені в цьому розділі, опубліковано у наукових працях автора:

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>
2. Позаклітинна ДНК у плазмі пацієнтів з діабетом 2 типу та ожирінням як прогностичний маркер важкого перебігу COVID-19. **Дубровський Є.І.**, Древицька Т.І., Строй Д.О., Пашевін Д.О., Тумановська Л.В., Досенко В.Є., Портниченко А.Г. IX Національний Конгрес патофізіологів України (Івано-Франківськ – 2024).

3.4. Визначення гіалуронової кислоти в плазмі крові хворих на COVID-19

Рівень гіалуронової кислоти у плазмі крові здорових добровольців становив 50,5 нг/мл і вірогідно не відрізнявся від рівня у здорових людей, отриманому на статистично значущій когорті пацієнтів [121]. У групі пацієнтів з легким перебігом рівень ГК становив $68,4 \pm 44,98$ нг/мл (рис. 3.4.1).

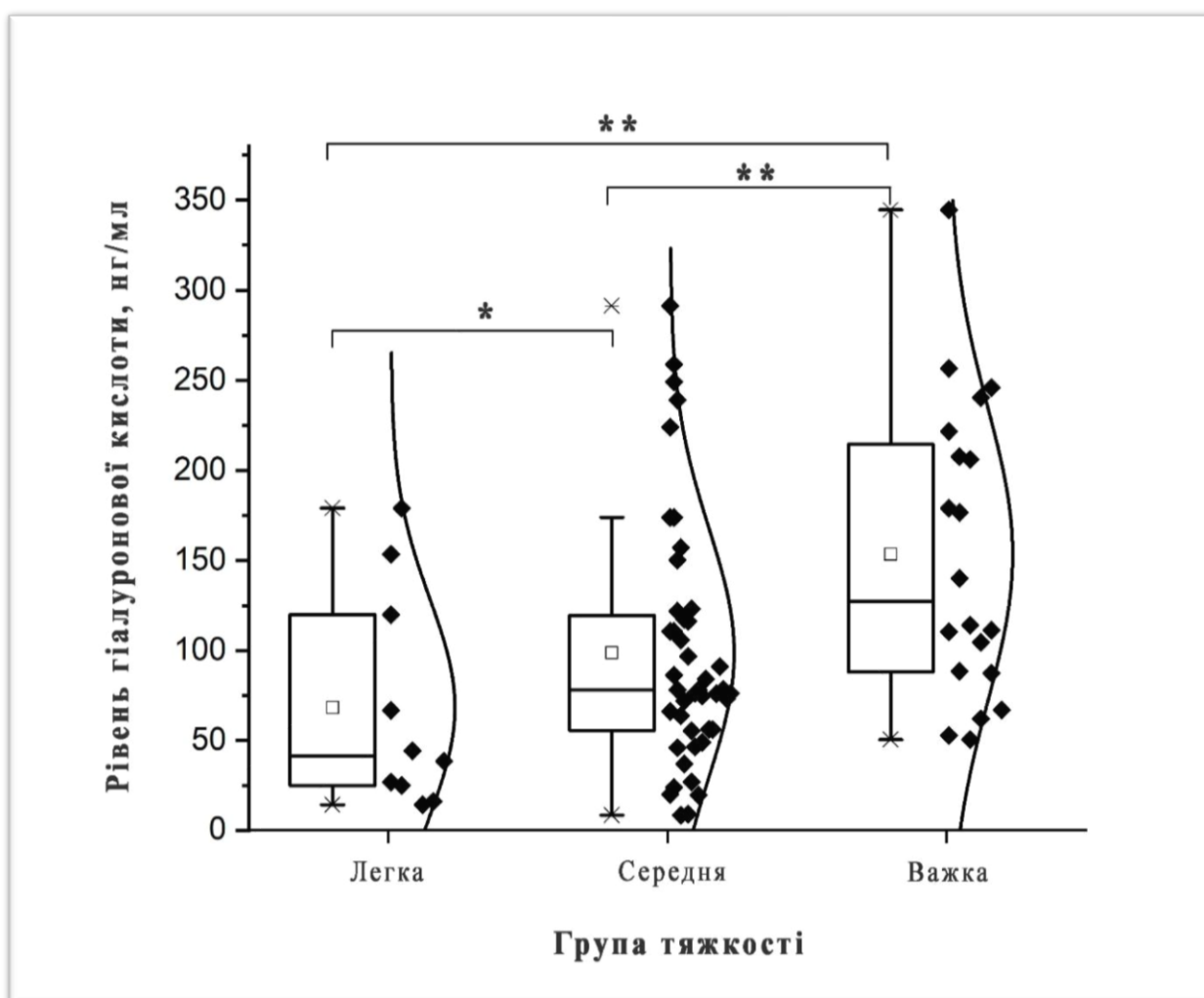


Рис 3.4.1. Визначення рівня гіалуронової кислоти в плазмі крові пацієнтів COVID-19. * - $p > 0,05$; ** $p < 0,05$

У групі хворих з середньоважким перебігом рівень гіалуронової кислоти становив $96,8 \pm 51,63$ нг/мл. У пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 рівень ГК в плазмі крові в 2 рази вищий в порівнянні із рівнем ГК в групі пацієнтів із легким перебігом та в 1,4 рази вищий від рівня ГК у

пацієнтів із середньою тяжкістю захворювання й становить $140,4 \pm 67,43$ нг/мл.

Втім, статистично значуща різниця між показниками рівня ГК між групами пацієнтів з легким та середньоважким перебігом відсутня, що пояснюється відсутністю в цих групах ознак дихальної недостатності. В той час як статистична різниця між легкою або/і середньоважкою групою та групою пацієнтів із важким перебігом є значущою ($p = 0,006$).

Рівень ГК у пацієнтів з COVID-19 відрізняється в залежності від тяжкості захворювання й статистично достовірно вищий у пацієнтів із в подальшому важким перебігом коронавірусної хвороби.

3.5. Визначення експресії lncRNA HAS2-AS1 у лейкоцитах хворих на COVID-19

Було показано, що експресія довгої некодуючої РНК HAS2-AS1 у контрольній групі волонтерів майже не визначається (вона складає 0,004 ум. од.). У пацієнтів з легким перебігом COVID-19 вже реєструється досить великий рівень довгої некодуючої РНК ($4,8 \pm 1,77$ ум.од.). У пацієнтів із середньою важкістю перебігу COVID-19 експресія HAS2-AS1 збільшується у 7,7 разів в порівнянні з групою пацієнтів із легким перебігом та становить $37,0 \pm 13,27$ ум.од. ($p < 0.05$). В групі пацієнтів із важким перебігом COVID-19 рівень експресії збільшується в 22,6 рази в порівнянні із рівнем експресії в групі пацієнтів із легким перебігом та у 3 рази в порівнянні із показником експресії в групі пацієнтів із середнім ступенем тяжкості й становить $108,2 \pm 25,28$ ум.од. ($p < 0.05$) (рис. 3.5.1.).

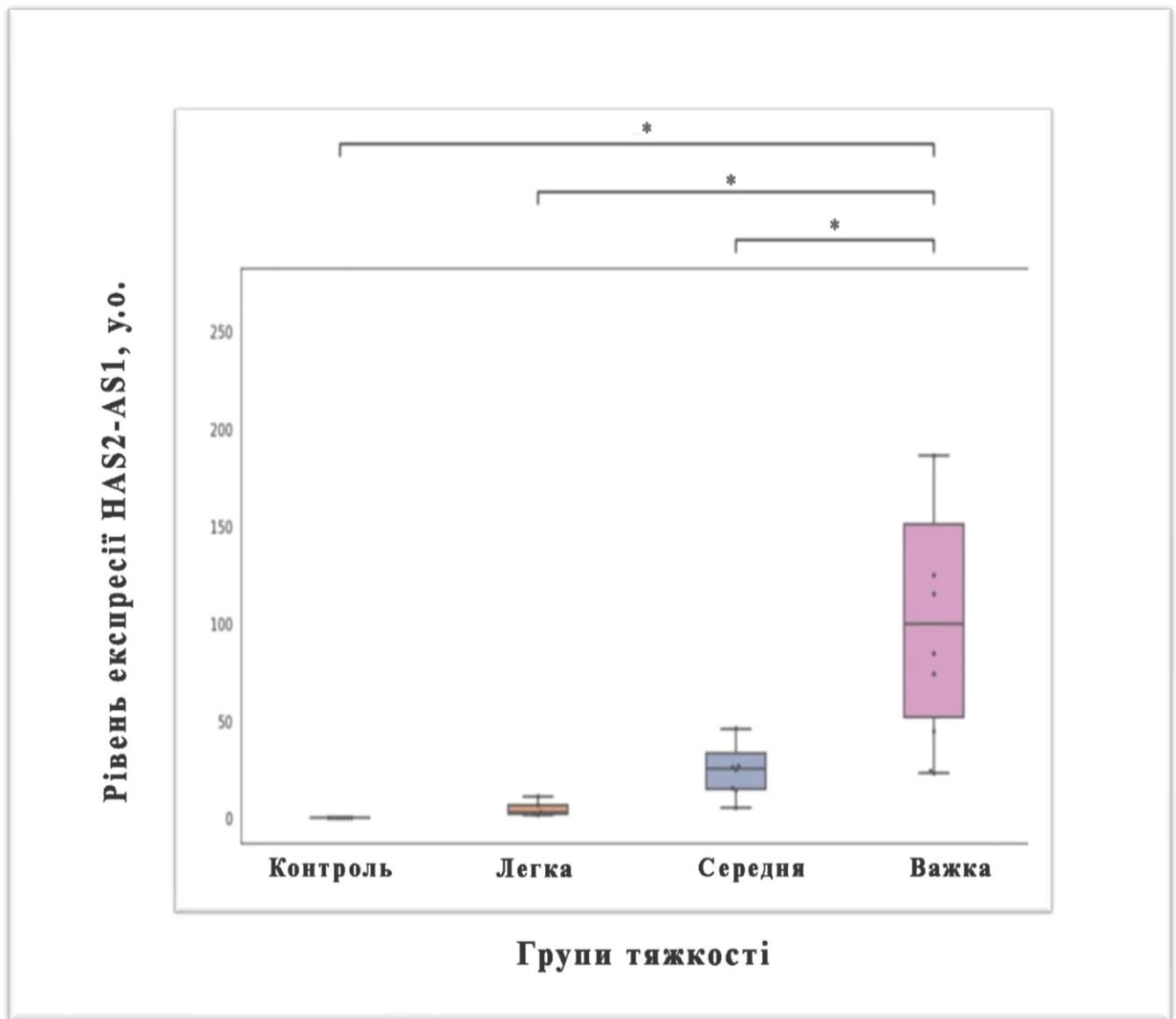


Рис. 3.5.1. Визначення експресії lncRNA HAS2-AS1 у лейкоцитах хворих на COVID-19. Рівень експресії представлений в умовних одиницях. Референтний ген β -актин. Статистично значущі результати: * - $p < 0,05$.

На рисунку зображено рівень експресії довгої некодуючої РНК HAS2-AS1 у лейкоцитах пацієнтів із різним ступенем тяжкості COVID-19. Статистично значущі відмінності в групі вказують на яскраву показову відмінність рівня експресії в групі важких пацієнтів в порівнянні із пацієнтами із легкою та середньою ступенями важкості.

Ми побудували ROC-криву для HAS2-AS1, яка дозволяє оцінити діагностичну ефективність біомаркера, а такі показники, як чутливість, специфічність, порогові значення (treshhold) та Cut-off value, допомагають оптимізувати його використання у клінічній практиці.

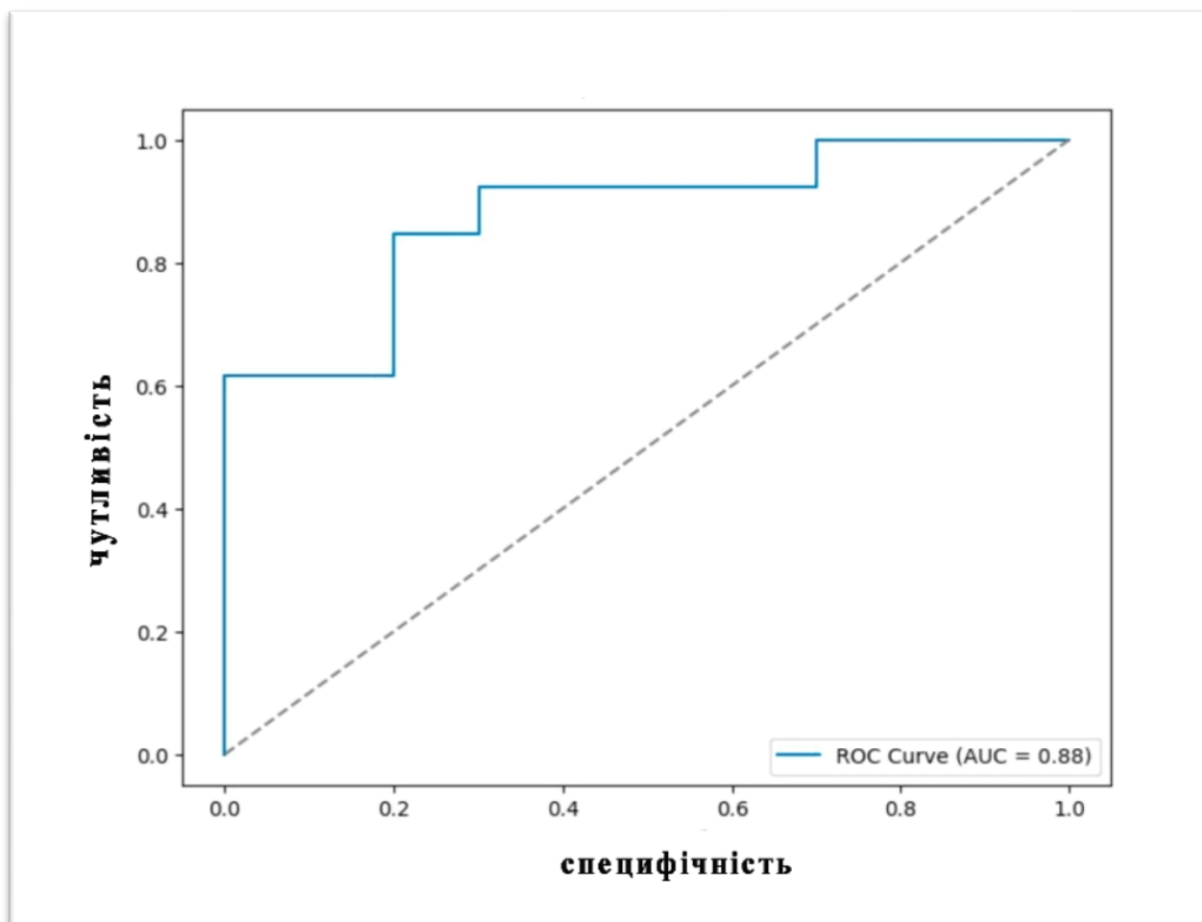


Рис. 3.5.2. ROC-крива для визначення специфічності та чутливості такого маркера, як рівень експресії HAS2-AS1 в лейкоцитах хворих на COVID-19. Пороговий рівень становить 61,8 у.о. із чутливістю 88% і специфічністю 80%.

Побудована ROC-крива демонструє показник чутливості (Sensitivity) – 0,88, що означає, що рівень експресії довгої некодууючої РНК HAS2-AS1 як біомаркер здатен правильно виявити 88% пацієнтів із тяжким перебігом COVID-19. Висока чутливість свідчить про здатність біомаркера мінімізувати кількість хибнонегативних результатів. Специфічність 0,8 показує, що HAS2-AS1 здатен правильно ідентифікувати пацієнтів без

тяжкого перебігу COVID-19 у 80% випадків. Це додатково допомагає уникнути хибнопозитивних результатів. Cut-off Value (граничний поріг) становить 61,8 у.о., що вказує на граничне кількісне значення для рівня експресії HAS2-AS1 у клінічному тестуванні. Пацієнти з рівнем біомаркера вище 61,8 у.о. мають підвищений ризик важкого перебігу COVID-19. Значення нижче цього порогу, вказує на прогностично менш тяжкий перебіг хвороби.

Результати, представлені в цьому розділі, опубліковано у наукових працях автора:

1. **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>
2. **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>
3. **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.

3.6. Визначення експресії мРНК HIF-1 α

У контрольній групі здорових добровольців рівень експресії становив $6,8 \pm 3,2$ у.о., що в 4,3 рази менше ніж у групі пацієнтів в групі з легким перебігом ($29,4 \pm 4,1$ у.о.) (рис. 3.6.1). У групі хворих з середньоважким перебігом рівень експресії HIF-1 α становить $55,7 \pm 16,8$ у.о., що в майже 2 рази вище від показника експресії в групі пацієнтів з легким перебігом COVID-19, втім, статистично значуща різниця між групами з легким та середньоважким ступенем тяжкості відсутня ($p=0,24$).

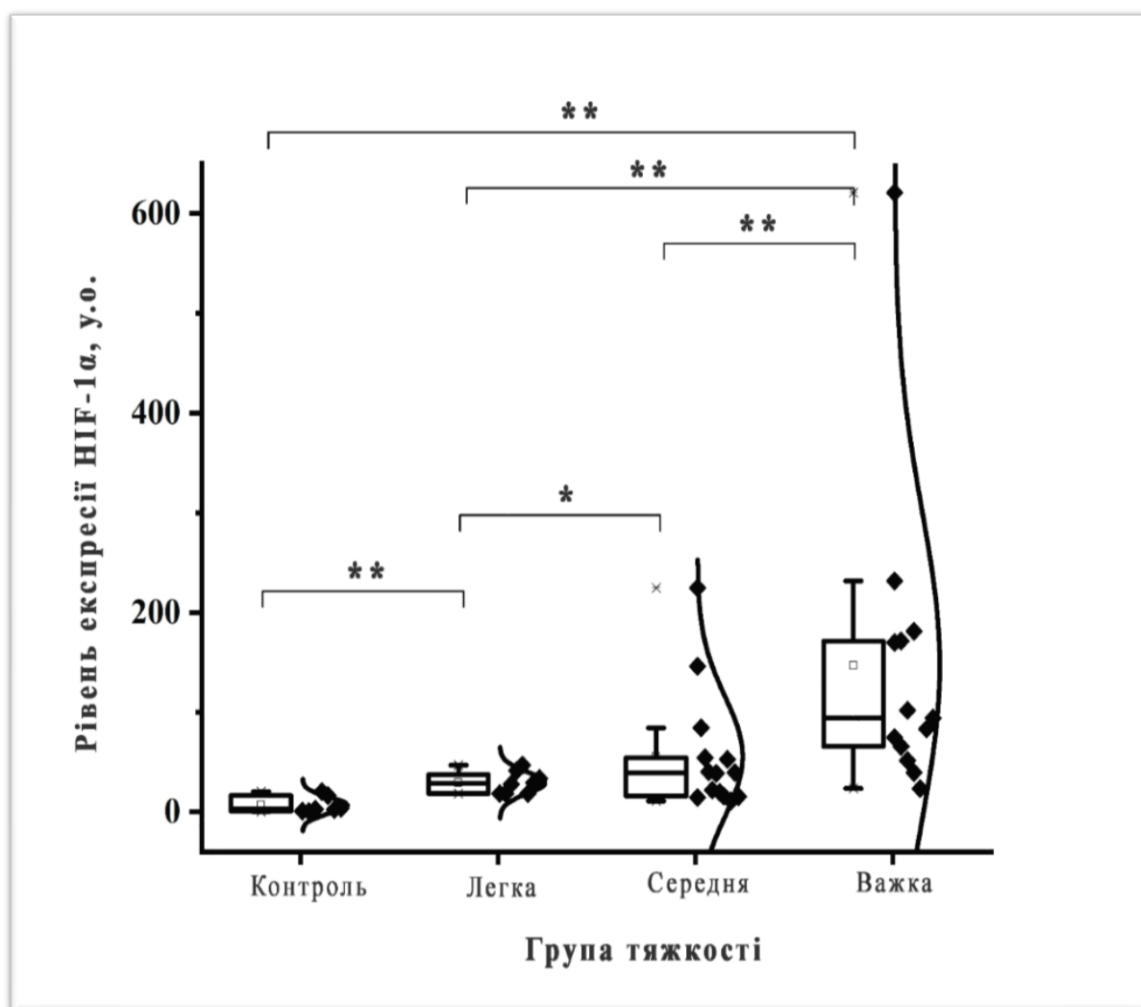


Рис. 3.6.1. Рівень експресії HIF-1 α у лейкоцитах пацієнтів із різним ступеням тяжкості COVID-19. Рівень експресії представлений в умовних одиницях. Референсний ген β -актин. * - $p > 0,05$, ** - $p < 0,05$.

У пацієнтів з тяжким перебігом рівень експресії HIF-1 α становив $146,9 \pm 44,9$, що в 5 раз вище показника експресії HIF-1 α в групі пацієнтів з легким перебігом, та в 2,6 раз вище рівня експресії в групі пацієнтів з середньоважким перебігом ($p=0,04$ та $0,05$).

На рис. 3.6.1. показано, як змінюється рівень експресії HIF-1 α в залежності від ступеня важкості. Різниця між легкою та середньою групою статистично незначуща, що можна пояснити відсутністю в подальшому клінічно вираженої гіпоксії в цих групах пацієнтів. В той час, як у пацієнтів з важким перебігом коронавірусної хвороби рівень експресії мРНК транскрипційного фактору HIF-1 α вже різко збільшений ще на етапі госпіталізації, прогностично демонструючи в подальшому клінічно виражену гіпоксію.

3.7. Визначення експресії мРНК HIF-2 α у лейкоцитах хворих на COVID-19

Рівень експресії HIF-2 α у лейкоцитах пацієнтів з групи контролю становив $10,6 \pm 4,4$ у.о. У групі пацієнтів з легким перебігом експресія зросла в 5,8 раз та становила $61,3 \pm 15,8$. Між групами присутня статистично значуща різниця ($p=0,008$) (Рис. 3.7.1). У групі хворих з середньоважким перебігом рівень експресії HIF-2 α становить $112,5 \pm 29,9$ у.о. й в 1,8 раз вищий в порівнянні з рівнем експресії HIF-2 α в групі легких пацієнтів, але статистично групи не відрізняються ($p=0,23$). У пацієнтів з тяжким перебігом рівень експресії HIF-2 α збільшується у 17,7 раз відносно групи контролю, у 3 рази в порівнянні з легкою групою та в 1,6 раз відносно середньої групи та становить $188,1 \pm 38,1$ у.о. ($p=0,002$; $p=0,01$; $p=0,1$).

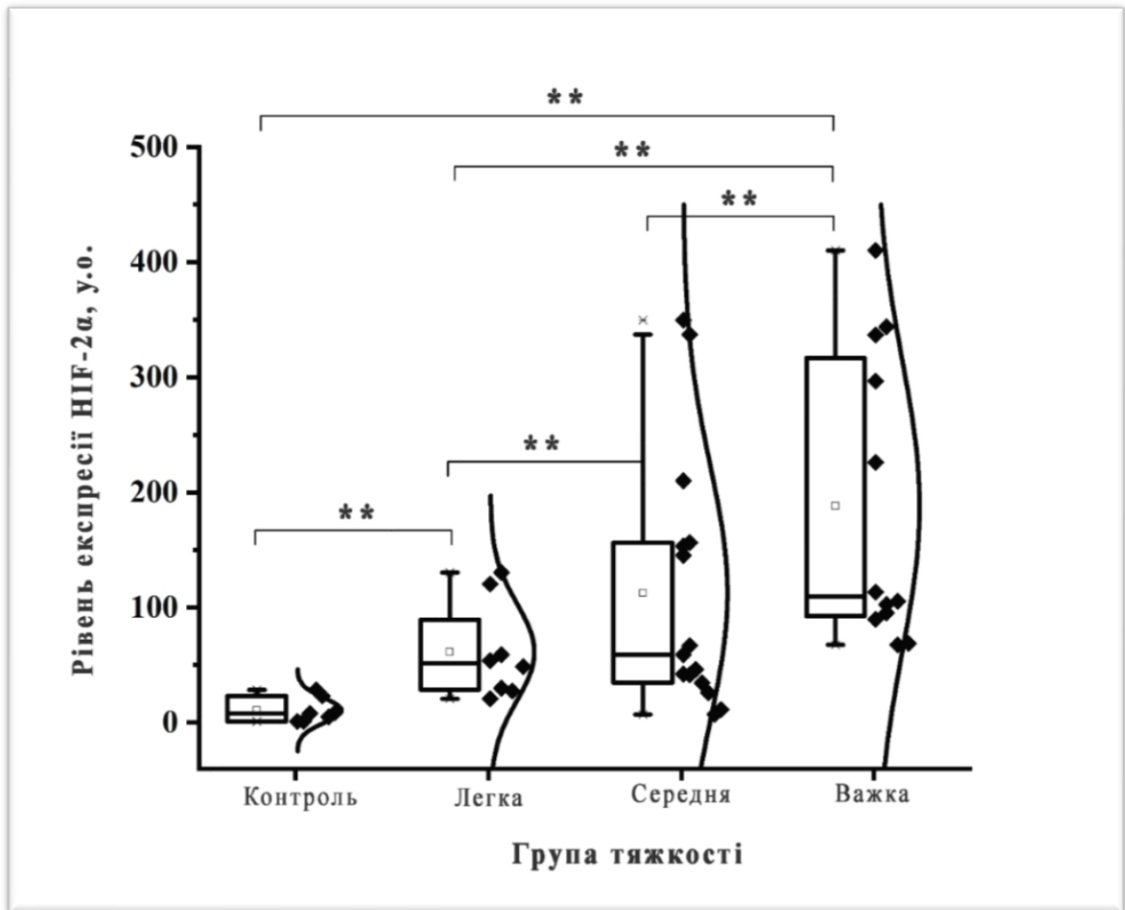


Рис. 3.7.1. Рівень експресії HIF-2α у лейкоцитах пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19. Рівень експресії представлений в умовних одиницях. Референсний ген β-актин. * - $p > 0.05$, ** - $p < 0.05$.

3.8. Визначення експресії HIF-3α у лейкоцитах хворих на COVID-19

Рівень експресії HIF-3α у лейкоцитах пацієнтів з групи контролю становив $3,2 \pm 1,15$ у.о. У групі пацієнтів з легким перебігом експресія HIF-3α виросла в 6 раз ($19,5 \pm 4,3$) й демонструє статистично значущу різницю ($p=0,002$). (Рис. 3.8). У групі з середньоважким перебігом рівень експресії HIF-3 становив $22,1 \pm 5,2$ з відсутністю статистичної різниці між легкою та середніми групами. В той час як у пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 рівень експресії HIF-3α різко збільшився в 5,3 рази відносно групи з легкими перебігом та в 4,7 відносно групи з середньоважким перебігом ($104,6 \pm 31,9$)

й демонструє статистично значущу різницю групи з усіма іншими групами ($p=0,05$; $p=0,014$ $p=0,008$).

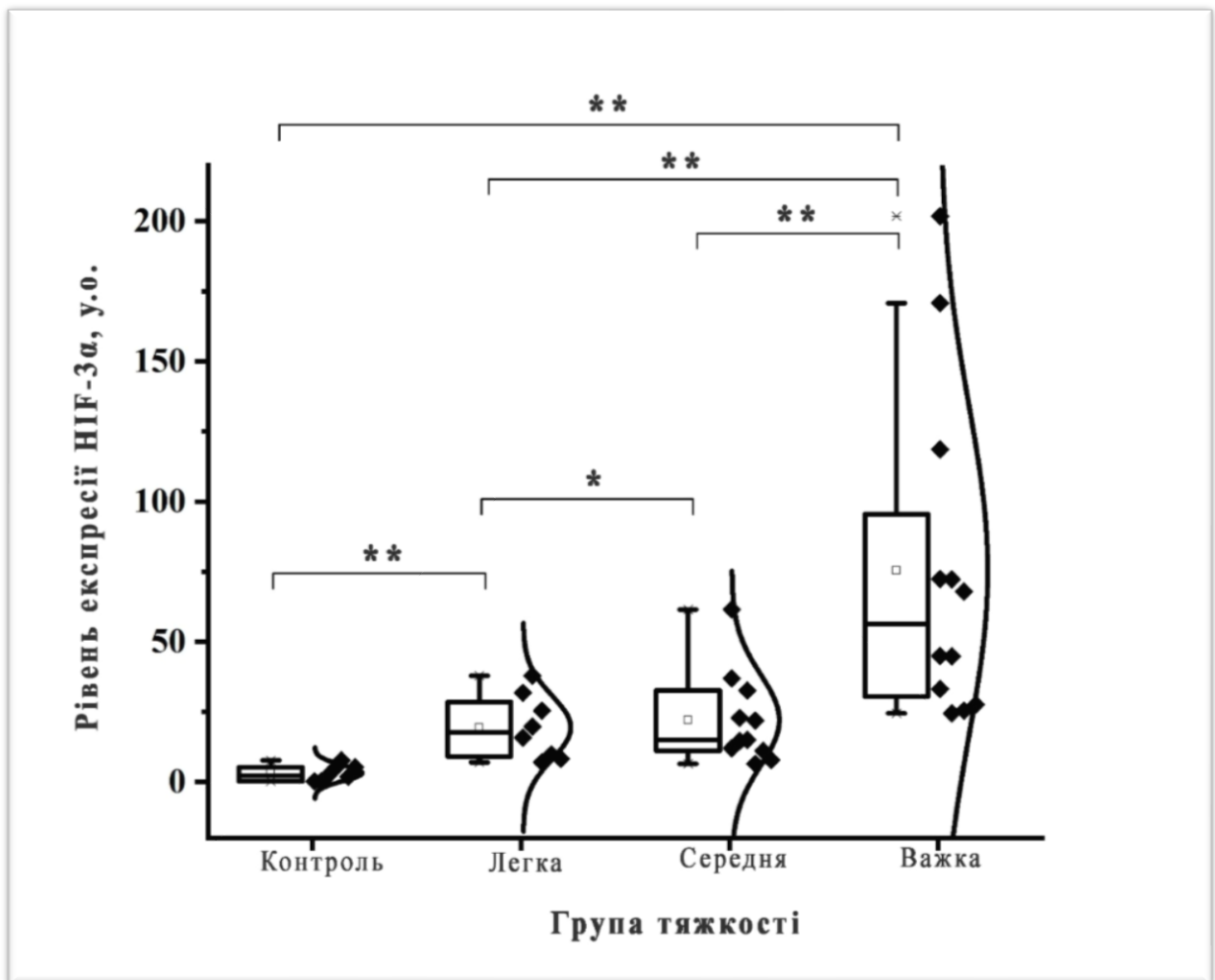


Рис. 3.8.1. Рівень експресії HIF-3 α у лейкоцитах пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19. Рівень експресії представлений в умовних одиницях. Референсний ген β -актин. * - $p > 0.05$, ** - $p < 0.05$.

Таким чином, показники експресії всіх субодиниць HIF вірогідно зростали у хворих з COVID-19, а їх рівень на початку захворювання прямо асоціювався зі зростанням тяжкості перебігу в подальшому часі. При цьому у хворих з подальшим легким перебігом дещо більшою мірою зростала експресія HIF-3 α в порівнянні з групою контролю (у 6 разів), ніж інших субодиниць, що може посилювати гальмівну роль цієї субодиниці щодо активності HIF-1 α і HIF-2 α .

У той же час у хворих, які потім будуть класифіковані як пацієнти із середньоважким перебігом, вже під час госпіталізації найбільше зростала експресія субодиниці HIF-2 α (у 10,6 разів), менше - HIF-1 α (у 8,2 раза) і найменше - HIF-3 α (у 6,9 раза). Це вказує на вагомий внесок глікемія-залежної субодиниці HIF-2 α у погіршення перебігу захворювання у пацієнтів з метаболічними розладами, тоді як гальмівна роль субодиниці HIF-3 α зменшується.

У хворих, які потім будуть класифіковані як пацієнти із тяжким перебігом, найменшим вже на час госпіталізації виявляється зростання субодиниці HIF-2 α (у 17,7 разів), натомість зростає внесок гіпоксія-залежних субодиниць HIF-1 α (у 21,6 разів) і особливо - HIF-3 α (у 32,7 разів), в порівнянні з групою контролю. Одержані результати можуть вказувати на значну трансактивацію гіпоксія-залежних генів у цій групі хворих, що може значно потенціювати розвиток «цитокінового шторму» і запалення, незважаючи на активність гальмівної ланки фактора HIF-3 α .

Одержані дані можуть свідчити, що співвідношення експресії ізоформ фактора HIF у хворих на COVID-19 з метаболічними розладами може бути одним з визначальних факторів патогенезу захворювання і тяжкості його перебігу.

3.9. Визначення експресії lncRNA HIF1A-AS1 у лейкоцитах хворих на COVID-19

Було показано, що рівень експресії довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1 у контрольній групі волонтерів та пацієнтів з легким перебігом COVID-19 практично однаковий, та становить $32,096 \pm 7,9$ та $29,3 \pm 7,1$ (рис. 3.9.1). При цьому у групі пацієнтів з середньою важкістю перебігу COVID-19 експресія збільшується у 5 разів відносно групи з пацієнтами з легким перебігом та становить $146,4 \pm 37,4$ ($p < 0.05$).

При тяжкому перебігу рівень експресії зростає у 9,8 разів відносно групи з легким перебігом ($p < 0,05$) та зростає у 1,9 раз відносно пацієнтів з групи із середньоважким перебігом ($p > 0,05$) та становить $286,7 \pm 77,3$.

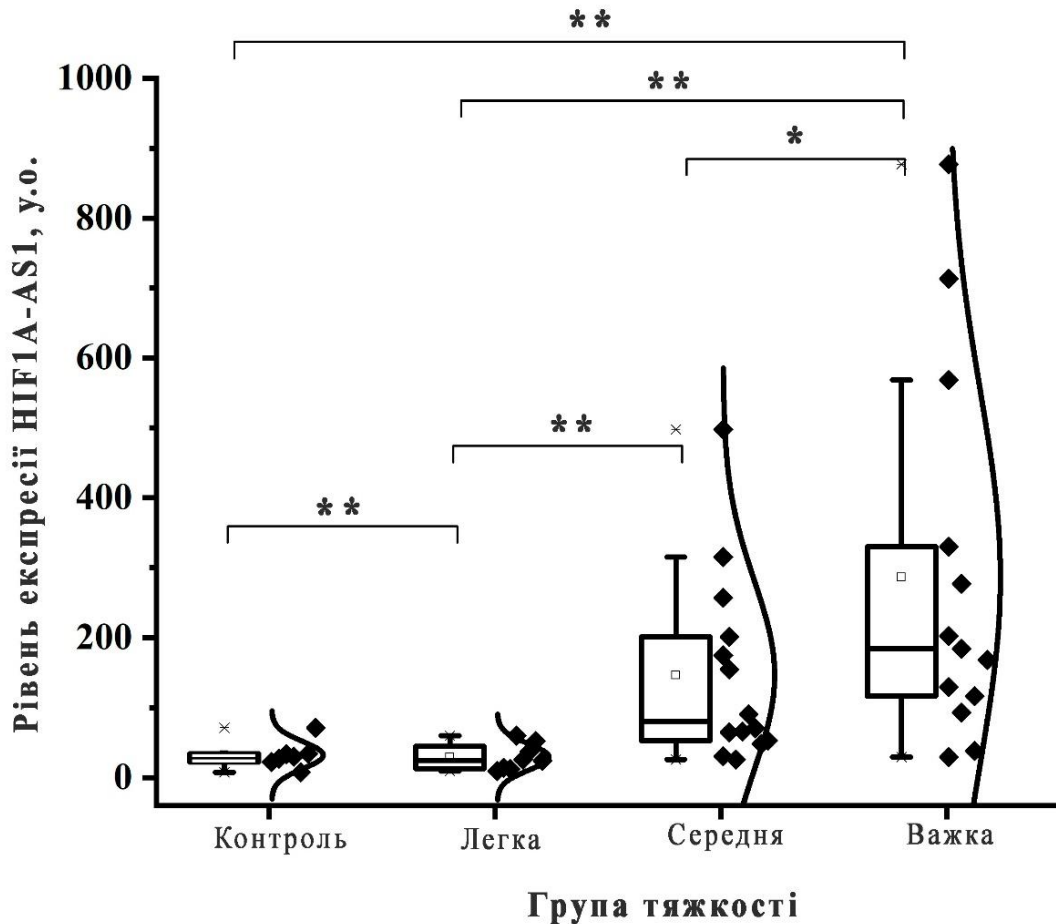


Рис. 3.9.1. Рівень експресії lncRNA HIF1A-AS1 у лейкоцитах пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19. Рівень експресії представлений в умовних одиницях. Референсний ген β -актин. * - $p > 0,05$; ** - $p < 0,05$.

Побудована ROC-крива демонструє показник чутливості (Sensitivity) – 0,73, який показує, що рівень експресії HIF1-AS1 як прогностичний біомаркер виявляє більшість хворих із важким станом, але деякі випадки можуть залишитися нерозпізнаними. Однак, 100%-й показник специфічності свідчить про ідеальну здатність маркера HIF1-AS1 правильно визначати здорових або пацієнтів із легким перебігом COVID-19. Це

означає, що при використанні цього маркера немає хибнопозитивних результатів, що є великим плюсом 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.

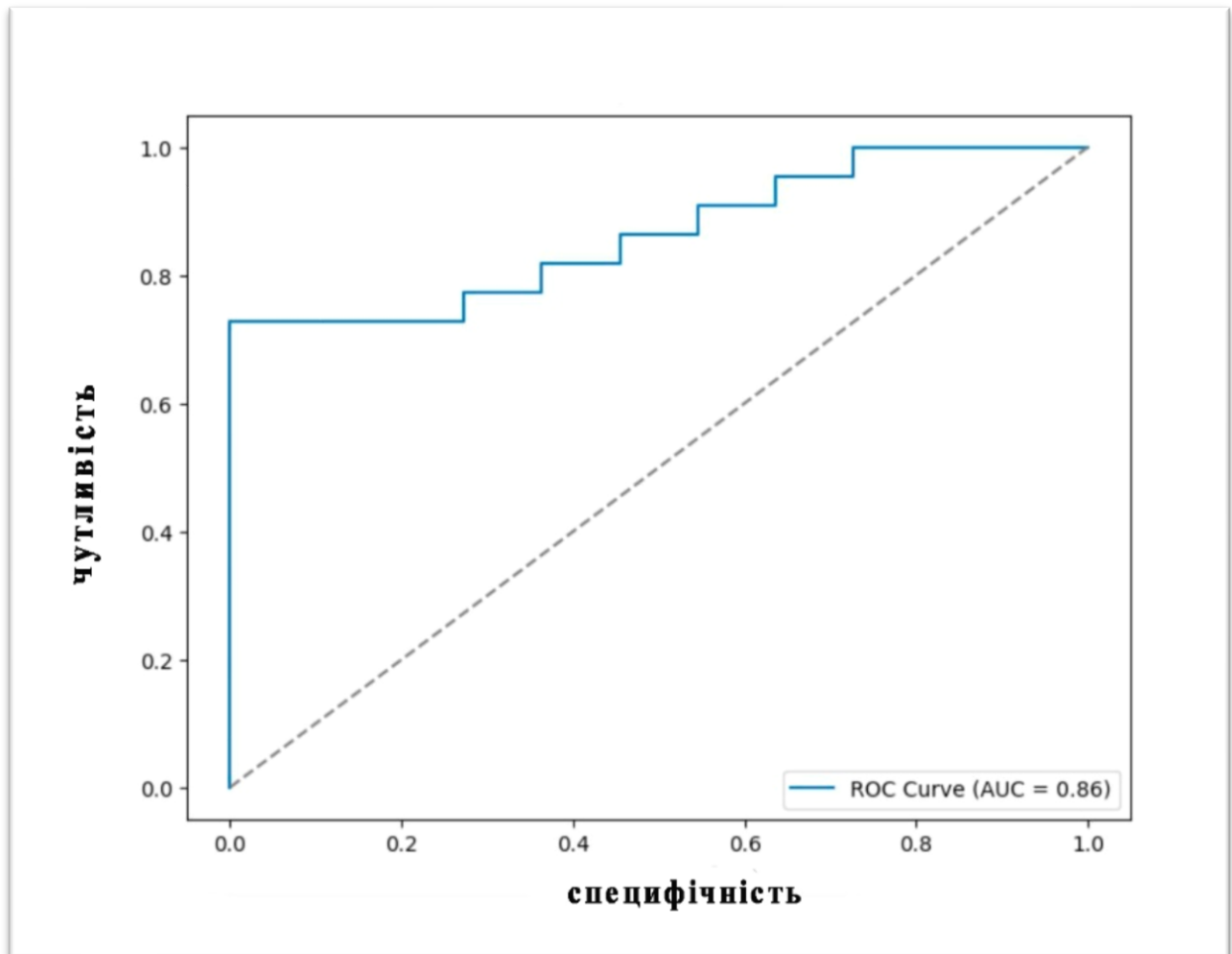


Рис. 3.9.2. ROC-крива для визначення специфічності та чутливості такого маркера, як рівень експресії HIF1-AS1 в лейкоцитах хворих на COVID-19. Пороговий рівень становить 277,85 у.о. із чутливістю 73% і специфічністю 100%.

Таблиця 6. Рівень експресії різних ізоформ транскрипційного фактору HIF у групі контролю та у пацієнтів із різними ступенями тяжкості перебігу COVID-19

Ступінь тяжкості	Ізоформи фактору HIF			lnc RNA
	HIF-1 α	HIF-2 α	HIF-3 α	HIF1A-AS1
Група контролю	6,7 \pm 3,2	10,6 \pm 4,4	3,1 \pm 1,2	32,09 \pm 7,9
Легкий	29,4 \pm 4,13	61,3 \pm 15,83	19,5 \pm 4,32	29,3 \pm 7,1
Середньоважкий	55,7 \pm 16,8	112,5 \pm 29,88	22,1 \pm 5,17	146,4 \pm 37,4
Важкий	146,9 \pm 44,89	188,1 \pm 38,10	104,6 \pm 31,93	286,7 \pm 77,3

Рівень експресії всіх трьох ізоформ білків HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) залежить від майбутнього ступеня важкості перебігу COVID-19: найменшим він був у контрольних пацієнтів, а найбільшим у пацієнтів з важким перебігом. Це не дає нам можливість прийти до однозначного висновку про роль системи білків HIF в патогенезі COVID-19, оскільки HIF-3 α має антогоністичну роль по відношенню до HIF-1 α та HIF-2 α в активації HIF-залежних генів. Отже, визначальне значення має саме співвідношення між цими факторами.

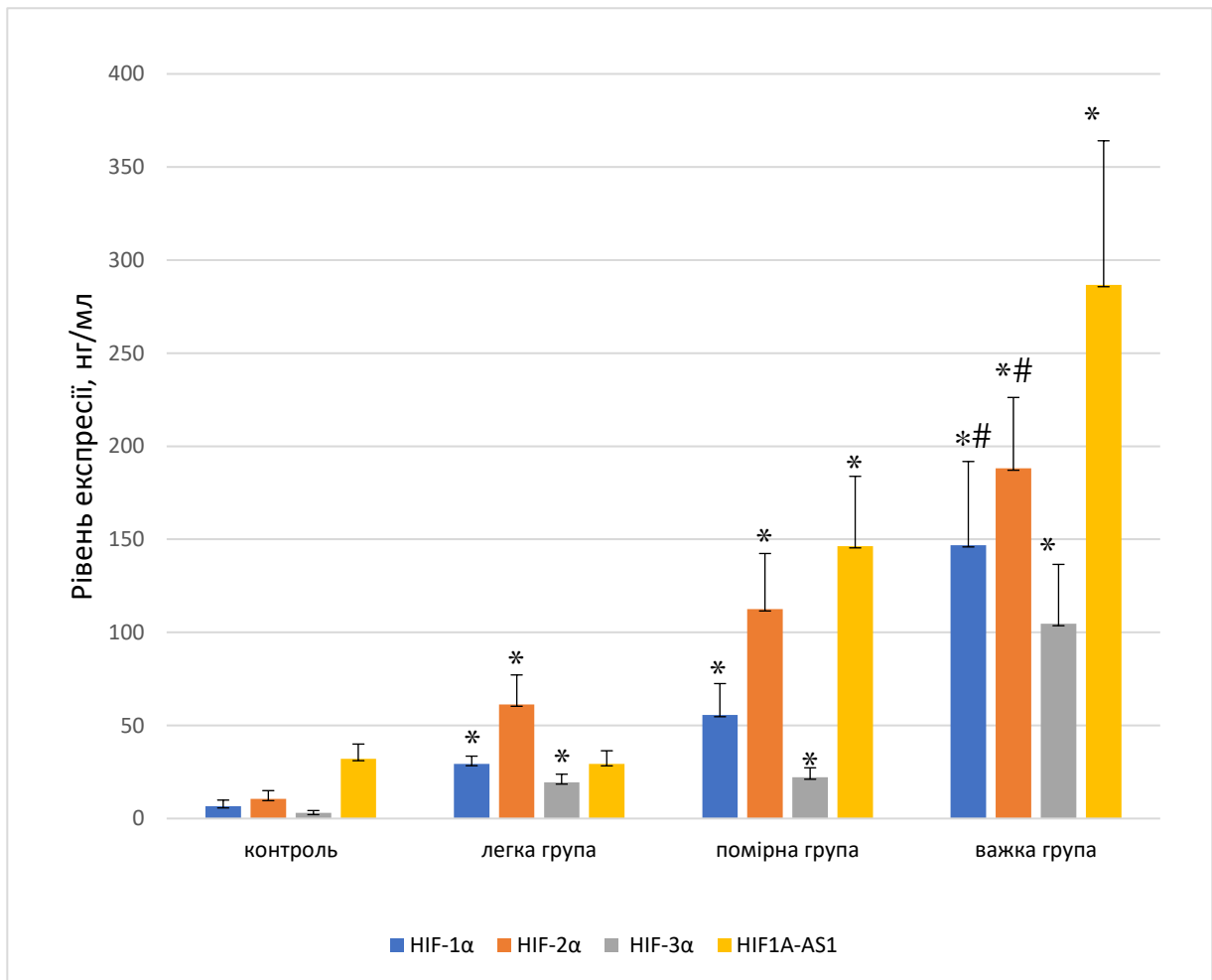


Рис 3.9.3 Рівень експресії різних ізоформ транскрипційного фактору HIF у групі контролю та у пацієнтів із різними ступенями тяжкості перебігу COVID-19. * – порівняно з групою контролю ($p < 0,05$), # – порівняно з легкою групою ($p < 0,05$)

Ми порахували співвідношення між рівнями експресії різних субодиниць транскрипційного фактору HIF між собою та окремо з рівнем експресії довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1 у групі контролю та у пацієнтів із важким перебігом COVID-19 (таб. 7)

Таблиця 7. Співвідношення між рівнями експресії різних субодиниць транскрипційного фактору HIF та lnc RNA HIF1A-AS1 у групі контролю та у пацієнтів із різними ступенями тяжкості перебігу COVID-19

Ступінь тяжкості	HIF-1 α / HIF-3 α	HIF-2 α / HIF-3 α	HIF1A- AS1/ HIF- 1 α	HIF1A- AS1/ HIF-2 α	HIF1A- AS1/ HIF-3 α
Група контролю	2,5 \pm 0,6	3,6 \pm 0,63	15,8 \pm 4,4	11,7 \pm 4,31	46,5 \pm 25,6
Легкий	1,9 \pm 0,4	3,4 \pm 0,5	1,0 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	2,2 \pm 0,7
Середньоважкий	2,6 \pm 0,8	5,6 \pm 1,8	5,6 \pm 1,9	5,5 \pm 2,3	11,2 \pm 6,6
Важкий	1,7 \pm 0,24	2,8 \pm 0,34	3,4 \pm 1,36	2,4 \pm 1,19	6,4 \pm 2,6

У групі контролю експресія HIF-1 α в 2,5 раз вище за експресію HIF-3 α , експресія HIF-2 α в 3,6 разів вища за експресію HIF-3 α . В той час як рівень експресії HIF1A-AS1 в групі контролю в 16 раз вищий за рівень експресії HIF-1 α та в 11 раз вищий за рівень експресії HIF-2 α .

У групі пацієнтів із важким перебігом COVID-19 результати дещо інші. Відношення рівня експресії HIF-1 α до HIF-3 α в групі пацієнтів з важким перебігом менше ніж в групі контролю на 32% й становить різницю в 1,7 раз. Рівень експресії HIF-2 α вище за рівень експресії HIF-3 α в 2,8 раз, що також на 23% менше, порівнюючи відношення експресії HIF-2 α та HIF-3 α в групі контролю. Також в групі важких пацієнтів змінилось відношення між рівнями експресії HIF1A-AS1 та HIF-1 α й HIF-2 α . Рівень експресії HIF1A-AS1 в групі важких пацієнтів в 3,4 рази вищий за рівень експресії HIF-1 α (що на 79% менше, порівнюючи відношення між рівнями експресії в групі контролю) та в 2,4 раз вищий за рівень експресії HIF-2 α (що на 80% менше, порівнюючи відношення між рівнем експресії HIF1A-AS1 та HIF-2 α в групі контролю).

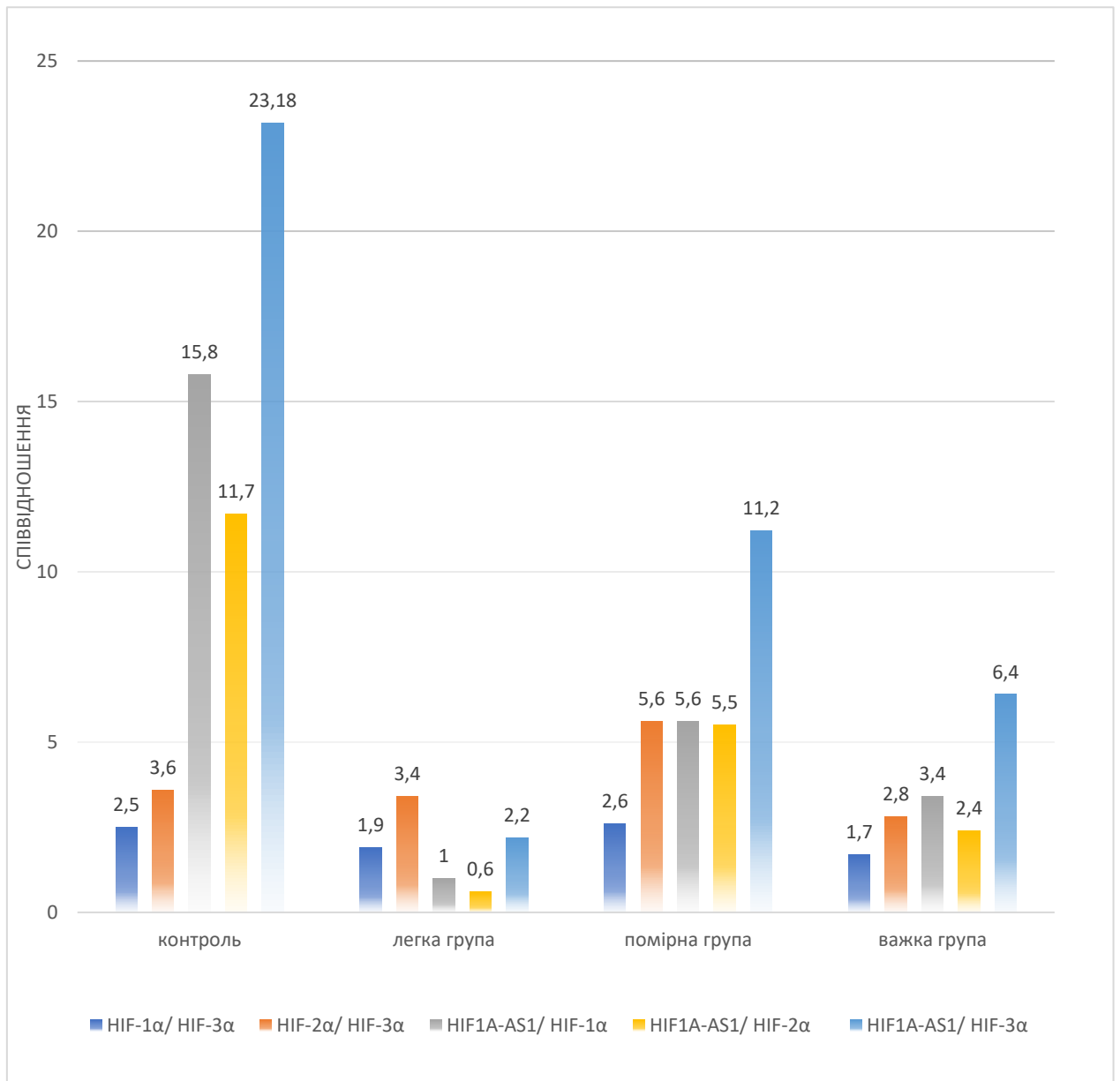


Рис. 3.9.4. Співвідношення між рівнем експресії lnc RNA HIF1A-AS1 та рівнями експресії різних субодиниць транскрипційного фактору HIF у групі контролю та у пацієнтів із різними ступенями тяжкості перебігу COVID-19

3.10. Визначення експресії mTOR у лейкоцитах хворих на COVID-19

Було показано, що рівень експресії мРНК mTOR у контрольній групі здорових добровольців становив $10,5 \pm 5,55$ у.о. В групі пацієнтів з легким

перебігом COVID-19 рівень експресії зростає в 5,6 раз та становить $58,8 \pm 20,27$ у.о. ($p = 0,04$).

В групі пацієнтів з середньою важкістю перебігу експресія mTOR збільшується у 1,6 рази відносно експресії в групі з пацієнтами з легким перебігом та становить $90,082 \pm 32,4$ ($p = 0,4$). При тяжкому перебігу COVID-19 рівень експресії mTOR зростає у 2,3 рази відносно групи пацієнтів із середньоважким перебігом ($p = 0,04$), у 3,5 раз порівнюючи з легкою групою ($p = 0,006$), та в 19 раз відносно рівня експресії mTOR в групі здорових добровольців з групи із ($p = 0,00006$) та становить $203,6 \pm 43,18$ (рис 3.10.1)

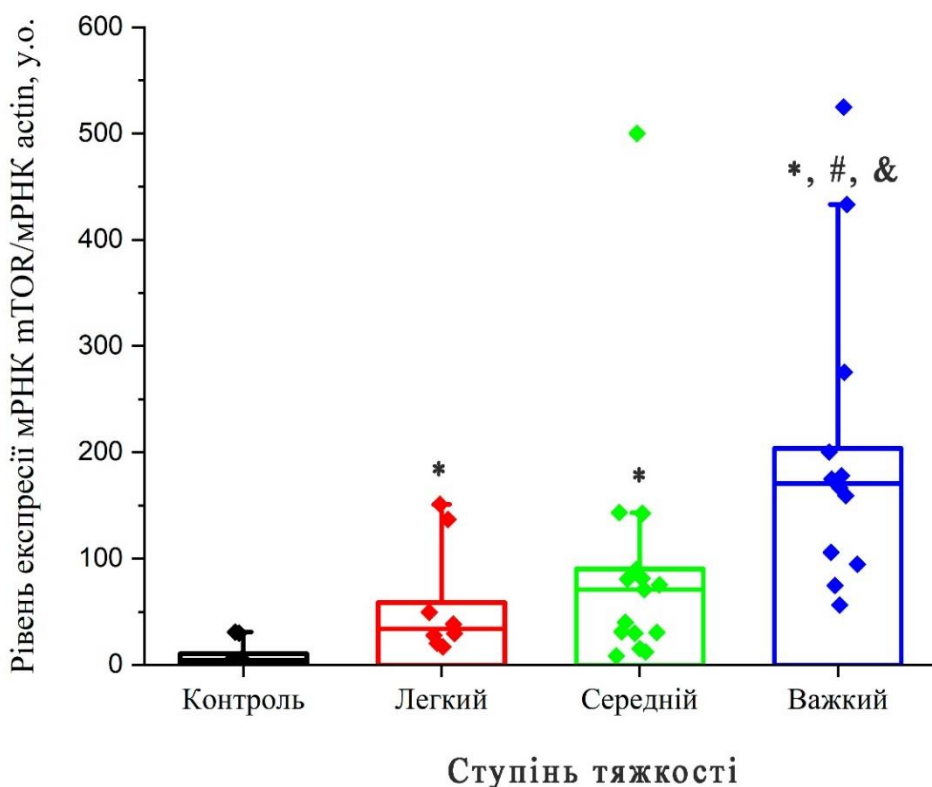


Рис. 3.10.1. Рівень експресії мРНК mTOR у лейкоцитах пацієнтів з різним ступенем тяжкості COVID-19. Рівень експресії представлений в умовних одиницях. Референсний ген β -актин. * – порівняно з групою контролю ($p < 0,05$), # – порівняно з легким ступенем ($p < 0,05$), & – порівняно з середнім ступенем ($p < 0,05$)

Кореляційний аналіз між показниками експресії мРНК mTOR та HIF-1 α у лейкоцитах хворих на COVID-19 ($r = 0,7801$, $p < 0,05$) демонструє сильну позитивну кореляцію ($r = 0,7801$; $p < 0,05$).

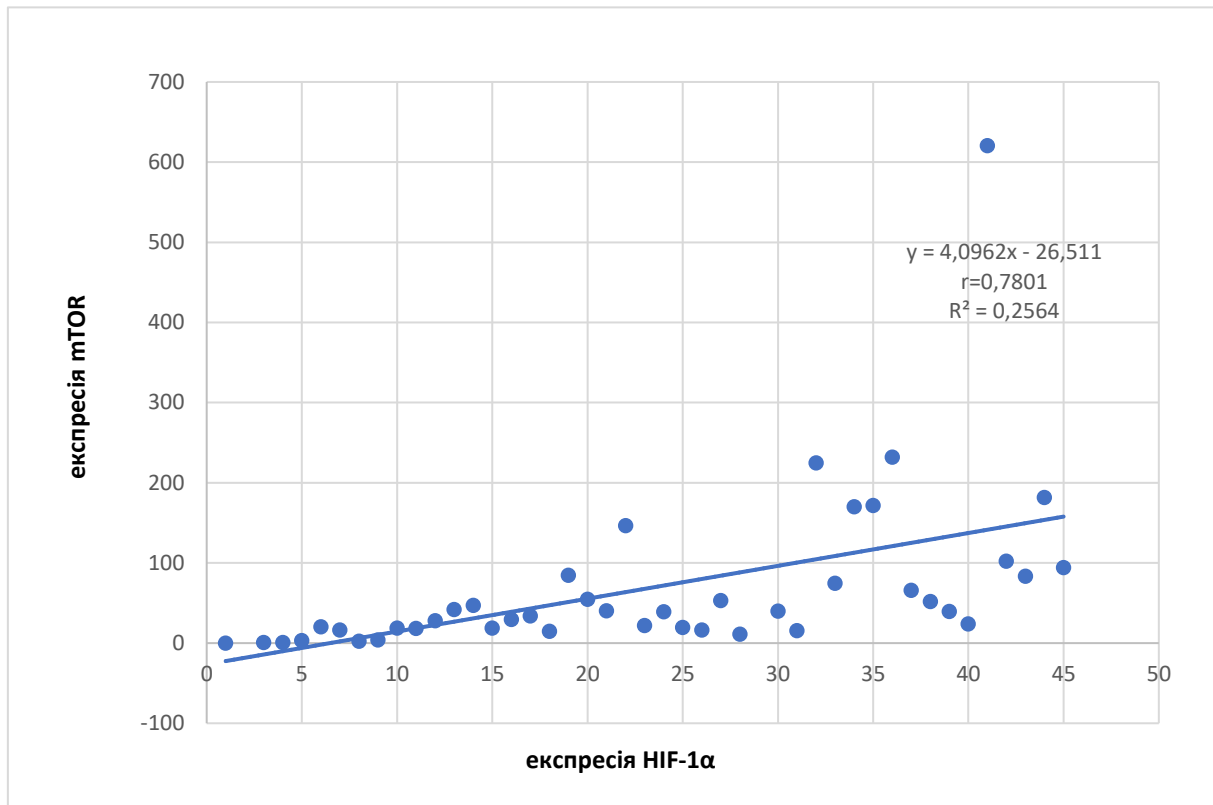


Рис. 3.10.2. Залежність між рівнем експресії мРНК mTOR та мРНК HIF-1 α у лейкоцитах хворих на COVID-19.

Результати, представлені в цьому розділі, опубліковано у наукових працях автора:

1. **Е. Dubrovskiy**, Т. Drevytska, А. 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>
2. Рівень експресії довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1 як прогностичний маркер важкого перебігу COVID-19 у пацієнтів з діабетом та ожирінням. **Дубровський Є. І.**, Древицька Т. І., Портниченко А. Г., Досенко В. Є. Науково-практична конференція для лікарів Харківського регіону. «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань», 4 липня 2024 року, м. Харків

Таблиця 8. Зведена таблиця всіх прогностичних маркерів у пацієнтів із різною ступеню важкістю перебігу COVID-19 та коморбідними станами.

Прогностичні маркери важкого перебігу COVID-19	Ступінь тяжкості		
	Легкий перебіг	Середньоважкий перебіг	Важкий перебіг
Вік, роки	65,5 ± 3,14	60,4 ± 2,46	66,4 ± 1,78
Глюкоза, ммоль/л	9,7 ± 3,07	7,08 ± 0,63	8,01 ± 0,8
Паличкоядерні лейкоцити	7 ± 1,5	8,5 ± 0,97	11,05 ± 2,26
пкДНК, нг/мл	3054,9 ± 255,94	4466,2 ± 286,14	8631,3 ± 983,62
Еластаза нейтрофілів, нг/мл	10,59 ± 0,56	11,29 ± 0,567	17,06 ± 1,01
МПО, нг/мл	4031,9 ± 606,09	9068,9 ± 699,257	16423,4 ± 1120,57
Гіалуронова кислота, нг/мл	68,4 ± 44,98	96,8 ± 51,63	140,4 ± 67,43
lnc RNA HAS2-AS1, у.о.	4,8 ± 1,98	37,0 ± 15,16	108,2 ± 25,28
мРНК HIF-1α, у.о.	29,4 ± 4,13	55,7±16,8	146,9 ± 44,89
мРНК, HIF-2α, у.о.	61,3 ± 15,83	112,5 ± 29,88	188,1 ± 38,10
мРНК, HIF-3α, у.о.	19,5 ± 4,32	22,1 ± 5,17	104,6 ± 31,93
lnc RNA HIF1A-AS1	29,3 ± 7,13	146,4 ± 37,42	286,7 ± 77,38
мРНК mTOR, у.о.	58,8 ± 20,27	90,1 ± 32,4	203,6 ± 43,18

На даній таблиці представлені всі вищеописані параметри, які ми дослідили на можливість використання як ефективних доказових прогностичних маркерів.

Представлений в таблиці рівень глюкози та вік пацієнтів демонструє максимально наближену однорідність групи, щоб виключити вплив загальновідомого факту, що вік та рівень глюкози є одними із основних прогностично неблагоприємних маркерів перебігу COVID-19.

Для підтвердження статистично значущої відмінності між групами при визначенні кількості або рівня експресії біомаркерів в різних групах тяжкості ми провели дисперсійний аналіз варіацій (ANOVA) та вибрали статистично достовірні показники.

Після цього, для визначення, наскільки суттєвий вплив має кожний окремо показник на перебіг COVID-19 ми провели оцінку практичного значення ефекту, використовуючи достовірний статистичний показник величини ефекту Omega-squared (ω^2). Omega-squared дозволяє оцінити, наскільки великий вплив має окремий фактор (в нашому випадку, біомаркер) на варіабельність залежної змінної — у цьому випадку тяжкість перебігу COVID-19. Використання ω^2 забезпечує не тільки статистичну достовірність висновків, але й демонструє практичну значущість кожного з аналізованих показників. Це допомагає оцінити практичну значущість результатів дослідження.

Значення ω^2 лежить у межах від 0 до 1:

- 0,01–0,06: малий ефект.
- 0,06–0,14: середній ефект.
- > 0,14: великий ефект.

Дані представлені в таблиці:

Таблиця 9. Показники ефекту величини прогностичних маркерів при COVID-19

Біомаркер	ω^2	p
пкДНК	0,24	0,000002
МПО	0,43	0,000000000005
lnc RNA HAS2-AS1	0,33	0,006
мРНК HIF-1 α	0,14	0,026
мРНК HIF-2 α	0,13	0,037
мРНК HIF-3 α	0,29	0,0028
lnc RNA HIF1A-AS1	0,27	0,0028

Результати отриманих даних ω^2 для всіх прогностичних маркерів свідчать про наступне: показник ефекту величини ω^2 пкДНК становить 0,24. Це демонструє великий вплив позаклітинної ДНК на подальший перебіг COVID-19, яка може розглядатись як достовірний прогностичний маркер важкого перебігу коронавірусної інфекції. Показник ω^2 для мієлопероксидази становить 0,43 та свідчить про найвищий рівень впливу серед розглянутих маркерів. Цей цитолітичний фермент є ключовим компонентом активації нейтрофілів і формування NETs, що робить його основним регулятором запальної відповіді. В поєднанні з визначенням пкДНК, МПО може розглядатись як дуже ефективний та достовірно показовий біомаркер важкого перебігу коронавірусної інфекції.

Показник Omega-squared для довгої некодуючої РНК HAS2-AS1 становить 0,33. Це свідчить про суттєвий і практично значущий ефект. Поєднання визначення HAS2-AS1 з визначенням рівня ГК в плазмі крові є достовірним та показовим для прогнозування тяжкості перебігу COVID-19.

Значення ω^2 для HIF-1 α становить 0,14 й вказує на помірний, але значущий вплив HIF-1 α на залежну змінну (перебіг COVID-19). Показник ефекту величини для HIF-2 α становить 0,13 й демонструє ще менший вплив у порівнянні з HIF-1 α . Втім, ефект величини маркеру HIF-3 α демонструє найвищий рівень впливу серед ізоформ HIF та становить 0,29, що може вказувати на його ключову роль у регуляції гомеостазу та адаптації до гіпоксії. Показник ω^2 для HIF1-AS1 становить 0,27. Дане значення показника вказує великий ефект на змінну, що є вагомим у клінічних дослідженнях та обґрунтовано може вважатись ефективним біомаркером важкого перебігу COVID-19.

Результати, представлені в цих розділах, опубліковано у наукових працях автора:

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>
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>
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>
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>
5. Рівень експресії довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1 як прогностичний маркер важкого перебігу COVID-19 у пацієнтів з діабетом та ожирінням. **Дубровський Є. І.**, Древицька Т. І., Портниченко А. Г., Досенко В. Є. Науково-практична конференція для лікарів Харківського регіону. «Інноваційні підходи в лікуванні та профілактиці ендокринних захворювань», 4 липня 2024 року, м. Харків

6. **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, ХХІІІ-і читання В. В. Підвисоцького. (16-17 травня 2024 року). – Одеса.
7. Позаклітинна ДНК у плазмі пацієнтів з діабетом 2 типу та ожирінням як прогностичний маркер важкого перебігу COVID-19. **Дубровський Є.І.**, Древицька Т.І., Строй Д.О., Пашевін Д.О., Тумановська Л.В., Досенко В.Є., Портниченко А.Г. ІХ Національний Конгрес патологістів України (Івано-Франківськ – 2024).
8. Відносне збільшення HIF-3 α в лейкоцитах хворих на COVID-19 є несприятливим прогностичним фактором перебігу захворювання. **Дубровський Є. І.**, Древицька Т. І., Портниченко А. Г., Досенко В. Є. VII науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ І ХВОРОБ ТА ЇХ ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ». 14 листопада 2024 р. ХАРКІВ – Україна

РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Основною метою дослідження було знайти відповідь на питання, як охарактеризувати групу ризику серед захворілих на COVID-19 й визначити прогноз перебігу коронавірусної хвороби у конкретного пацієнта. Адже навіть пацієнти з серйозними коморбідними станами мали досить різноманітний перебіг й не обов'язково хворіли важко.

Для відповіді на ці питання отримані нами дані можуть є дуже вагомими, оскільки показують, що попри загальноприйняті симптоми та критерії оцінки стану пацієнта є специфічні параметри, які критично важливі для виявлення справжньої групи ризику. Орієнтуючись тільки на клінічні показники, суб'єктивні скарги чи наявність коморбідних станів для прогностичної оцінки тяжкості перебігу респіраторних захворювань, таких як COVID-19 чи грип, можна отримати хибні (хибно-позитивні або хибно-негативні) результати. Але, використовуючи ефективні біомаркери, виміряні ще на етапі амбулаторного лікування, можна завчасно прогнозувати тяжкість коронавірусної хвороби.

За ідеальних обставин імунна система забезпечує збалансовану, врівноважену відповідь, яка опосередковує опір проникаючим мікроорганізмам і дозволяє хазяїну пережити інфекцію. Для багатьох інфекцій скоординована продукція постійних циркулюючих рівнів прозапальних цитокінів є природним наслідком відповідної вродженої та адаптивної відповіді, яка, тим не менш, є вбивчою для контролю патогенів без ушкодження самого організму.

Однією з головних тем в імунології за останні роки є посилення уваги до балансу й противаг, які обмежують кожен аспект вродженого та адаптивного клітинного та гуморального імунітету.

До таких противаг належать спеціалізовані типи регуляторних клітин, які мають протизапальні властивості, а також численні механізми, які

пом'якшують шкідливу дію цитокінів. Оскільки надмірне вироблення цитокінів є серйозною проблемою для організму в цілому, наявність цих регуляторних шляхів припускає, що вони можуть бути результатом еволюційного надбання, щоб збалансувати контроль над патогенами та толерантність до можливого супутнього пошкодження, щоб вижити при інфекції [122].

Для прикладу, системи рецептор-ліганд для цитокінів характеризуються наявністю розчинних рецепторів, антагоністів рецепторів і рецепторів-приманок, експресованих у високих рівнях у тканинах і сироватці. Ці антагоністи можуть буферизувати сплески активності цитокінів і обмежувати імунопатологію [122]. Існують численні природні антагоністи рецепторів і цитокінів, такі як антагоніст рецептора ІЛ-1 (ІЛ-1RA), які є властивістю систем передачі сигналів цитокінів, які обмежують імунну активність локальними ділянками вивільнення цитокінів [123].

Інші цитокіни та регуляторні шляхи можуть діяти більш безпосередньо, обмежуючи величину імунної відповіді. Наприклад, ІЛ-10 виробляється багатьма типами клітин (підгрупами моноцитів, а також природними кілерами (NK), Т- і В-клітинами) і пригнічує здатність популяцій макрофагів і дендритних клітин (ДК) виробляти TNF, ІЛ-1 ІЛ-6 та ІЛ-12 і знижує здатність цих клітин презентувати антиген і забезпечувати коstimуляцію. ІЛ-10 є ключовим негативним регулятором допоміжних функцій, необхідних для відповідей, опосередкованих Т-клітинами, і є численні приклади, коли інфекція мишей без ІЛ-10 характеризується підвищеними, стійкими циркулюючими рівнями ІЛ-12, TNF, та IFN γ [123].

Однак, ці захисні механізми мають свої межі, і надмірне або тривале виробництво цитокінів може виснажити ці регуляторні механізми.

Також трапляються ситуації, коли організму доводиться співіснувати з деякими патогенами, адже повна елімінація збудника може бути неможливою або занадто шкідливою, наприклад, при герпетичній інфекції.

Ідея про те, що стійкість перед обличчям інфекції — це баланс між захисними та патологічними реакціями, не є новою [124].

На даний момент досі залишається дискутабельним питання що є основою та передумовою важкого перебігу коронавірусної хвороби. Чи гіперактивність імунної системи, чи нездатність усунути запальну відповідь через триваючу реплікацію вірусу або, врешті решт, порушення імунної регуляції. Втім механізм пошкодження вже є зрозумілим. Беззаперечні дані про підвищений рівень утворення тромбів і загибель ендотеліальних клітин у пацієнтів з COVID-19 вказують на пошкодження ендотелію судин і залучення цитокінів й розвиток імунотромбозу [9].

Хоча однозначної відповіді, чому саме COVID-19 спричинив такий високий відсоток важкого перебігу в порівнянні з іншими вірусними інфекціями, немає, можна висловити припущення, що все ж таки, на фоні підвищеної експресії рецептору ангіотензинперетворюючого ферменту 2 (ACE2) з віком та коморбідними станами, як вхідних воріт для вірусу SARS-CoV-2 [15, 20], однією з основних причин стало порушення противірусного адаптаційного імунітету, а саме, відповіді на інтерферон (ІФН) і як наслідок – тривала персистенція вірусу та розвиток нерегульованих запальних реакцій, як це спостерігалось при інших зоонозних коронавірусних інфекціях, таких як важкий гострий респіраторний синдром (SARS) і близькосхідний респіраторний синдром (MERS) [125].

В деяких роботах показано, що при COVID-19 на відміну від сильної активації В- і Т-клітин паралельно спостерігалось значне зниження плазмоцитоїдних дендритних клітин (pDC) [126]. Так, Чоп'як із співавторами вказує, що функція дендритних клітин, які є прекрасними антигенпрезентуючими клітинами, блокується, що в перші дні не дає активізуватись клітинам адаптивного імунітету і продукувати достатньо відповідних цитокінів, як стимулюючих, так і гальмуючих [127]. Channappaavar також показує, що продукція pDC, основних виробників ІФН типу I, порушуються при інфекції COVID-19 [125].

Із цього можна зробити припущення, що інфекція SARS-CoV-2 призводить до вираженого дисбалансу у вродженій імунній відповіді, яка характеризується пригніченням периферичного вродженого імунітету на фоні активації прозапальних реакцій [128]. У важких і критичних пацієнтів спостерігався чіткий фенотип, який складався з виражено ослабленої відповіді на інтерферон I типу, що було пов'язано з постійним вірусним навантаженням у крові та загостренням запальної реакції [129].

Схожий процес було помічено при грипі, де пригнічення синтезу інтерферону типу I вже на початку захворювання на фоні підвищення IL-1 β та IL-17 чітко корелювало з важкістю перебігу [130].

Оскільки існуючі захворювання, які впливають на здоров'я судин, такі як діабет, гіпертонія та серцево-судинні захворювання, виявляються найбільш критичним фактором, який лежить в основі патогенезу COVID-19, цілком можливо, що ці супутні захворювання можуть сприяти порушенню регуляції та балансу дії імунних клітин [122]. Статистичні дані підтверджують це припущення, адже загальновідомо, що люди похилого віку та люди з основними супутніми захворюваннями, такими як серцево-судинні захворювання, цукровий діабет, ожиріння, гіпертонія або рак, мають набагато вищий рівень смертності, ніж здорові молоді дорослі [131].

В нашому дослідженні ми ще з 2021 року, в розпал пандемії, почали визначати й оцінювати прогностичну цінність певних патогенетичних параметрів, шукаючи пояснення причини важкого перебігу COVID-19 у хворих із коморбідними станами.

4.1. NETоз та позаклітинна ДНК як прогностичні маркери важкого перебігу COVID-10

Одним з найбільш перспективних біомаркерів при важкому перебігу COVID-19 є рівень вільної позаклітинної ДНК в плазмі крові.

Оскільки забір крові проводився нами ще до погіршення стану хворих, а рівень пкДНК у плазмі статистично чітко вирізнявся у пацієнтів на

ранньому періоді захворювання й корелював з клінічним перебігом COVID-19 (див. рис. 3.2.1), ми вважаємо за можливе використовувати пкДНК як доказовий прогностичний маркер для пацієнтів з групи ризику із коморбідними станами.

У досліджуваній групі на початку захворювання пацієнти з подальшим легким перебігом мали в середньому значно нижчі рівні пкДНК у плазмі, ніж у групі пацієнтів з тяжким перебігом. Рівень позаклітинної ДНК (пкДНК) у плазмі крові хворих на COVID-19 зростає пропорційно тяжкості перебігу, досягаючи максимальних значень у пацієнтів із важким перебігом (в 3,4 рази вище, ніж у здорових осіб, $p < 0,05$). Оскільки одним із суттєвих факторів стратифікації пацієнтів є насичення крові киснем, можна стверджувати, що рівень пкДНК асоціюється з рівнем оксигенації та взаємопов'язаний із продукцією гіалуронової кислоти та транскрипційним фактором HIF, про що буде сказано нижче. Оцінка рівня мієлопероксидази, яка є одним із основних нейтрофільних цитолітичних ферментів й є маркером утворення пкДНК, 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 в поєднанні, або навіть ізольовано від пкДНК в плазмі крові є одним з найбільш перспективних методик для точного прогнозування важкого перебігу COVID-19.

Проведений кореляційний аналіз підтверджує середню силу зв'язку між NETозом та рівнем пкДНК, а побудована ROC крива яскраво демонструє її ефективність 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. Специфічність 72 % вказує, що 72 % пацієнтів із легким перебігом або без ускладнень коректно визначаються як такі, мінімізуючи хибнопозитивні результати. Отримане нами порогове значення 4297 нг/мл використовується для розмежування

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

Рівень позаклітинної вільної ДНК є важливим лабораторним показником, який дозволяє проводити ранній скринінг пацієнтів з SARS-CoV-2 для прогнозування майбутнього перебігу тяжкості захворювання з кисневою недостатністю та можливості раннього початку відповідної терапії.

Визначення позаклітинної вільної ДНК в плазмі крові при COVID-19 є обґрунтованим, адже її роль доведена у трьох можливих патогенетичних процесах: утворення тромбу, аутоімунного ураження та активації мембранних рецепторів імунокомпетентних клітин.

Участь НЕТозу і пкДНК у розвитку коронавірусної хвороби можна підтвердити результатами ряду досліджень. Так, Соренсен та Боррегаард показують у своїй роботі, що НЕТс, які продукують пкДНК, в більшій мірі сприяють прогресуванню аутоімунного зриву (цитокіновий шторм) та тромбозу, ніж активації протективних механізмів вродженого імунного захисту [34]. Janiuk та Narasaraju у своїх роботах демонструють, що вивільнення NET підвищуються циркулюючими або інфільтруючими нейтрофілами у пацієнтів з COVID-19 [132, 133].

Підвищений рівень активації нейтрофілів і утворення NET у групі пацієнтів, госпіталізованих із COVID-19 та здатність нейтрофілів сприяти появі NETs-пов'язаній коагулопатії авторами беззаперечно асоціюється з вищим ризиком патологічних тромботичних ускладнень [134].

Про патофізіологічну роль позаклітинних нейтрофільних пасток при COVID-19 доповідали ще Middleton та Zuo, які у своїх дослідженнях публікували дані, які свідчать про різке збільшення NET у плазмі та легенях пацієнтів із COVID-19 [5, 46].

В іншій ключовій роботі також було описано переконливі докази того, надмірне утворення NET може викликати пряме пошкодження судин,

спричинюючи закупорювання мікросудин агрегованими NET й сприяє летальним наслідкам при COVID-19 [9].

Гіпотеза, що пкДНК призводить до розвитку цитокинового шторму, пошкодження ендотеліальних клітин та імунотромбозу, вже перестає бути гіпотезою.

У пацієнтів з COVID-19 є поширеною аномальна коагуляція, і в більшості випадків дисеміноване внутрішньосудинне згортання крові (ДВЗ) спостерігалось в осіб із критично важким перебігом COVID-19 [135]. Взаємодія численних компонентів NET, включаючи тромбоцити, ендотеліальні клітини, фактори згортання крові сприяють NET-індукованому внутрішньосудинному згортанню крові [136-137].

У випадках COVID-19, основні компоненти NET, такі як позаклітинна ДНК і цитрулінований гістон H3, є саме тими індукторами коагуляції [138].

В роботі Liaw було продемонстровано, що циркулююча позаклітинна ДНК впливає на первинний і вторинний гемостаз шляхом індукції агрегації тромбоцитів, сприяння активації коагуляції, пригнічення фібринолізу та прямого перешкоджання стабільності згустку [138].

Liu В. одним з перших виказує важливу думку, що смертельні ускладнення при COVID-19 були спричинені пошкодженням судин із-за позаклітинної ДНК та цитокинового шторму, але не лише самим вірусом Liu [139].

Незалежно один від одного, Zuo та Hammad висловлюють припущення, що продукцію NET та рівень пкДНК в плазмі крові можна вважати предиктором тяжкості захворювання та клінічного перебігу COVID-19 [46, 140].

В іншій роботі Ng із співавторами було також показано позитивну кореляцію між рівнем NETosis та кількістю позаклітинної ДНК з іншими маркерами тяжкості COVID-19 [141].

У своєму великому дослідженні Andargie з колегами приводить дані, що рівень пкДНК у плазмі протягом перших 2 днів після госпіталізації був

в 4,5 рази вищий у пацієнтів, які зрештою померли від COVID-19, порівняно з пацієнтами, які одужали, називаючи профіль cfDNA прогностичним маркером захворювання на COVID-19 [142]. Цікавим є додаткове порівняння, які приводять автори: середній рівень cfDNA був у 4,7 разів та 67 разів вищим у пацієнтів з COVID-19 порівняно з пацієнтами з грипом та риновірусною інфекцією відповідно. Автори наголошують, що нейтрофіли були основним фактором підвищення рівня пкДНК у пацієнтів з COVID-19, особливо у пацієнтів, які потребували лікування у відділенні інтенсивної терапії або які згодом померли [142].

В іншій роботі Huckriede у своєму масштабному дослідженні окремо розбирає значущість та динаміку різних маркерів при COVID-19 [143], серед яких пкДНК, нейтрофільна еластаза та гістони, які активуються при COVID-19, на думку автора, чітко відображають дисфункцію органів при важкій формі коронавірусної хвороби. Детально описуючи модель дослідження, Huckriede показує, що зв'язок між рівнями пкДНК і клінічним статусом відображає легеневу функцію у пацієнтів у відділенні інтенсивної терапії, які проходили інвазивну вентиляцію легенів. Особливо важливо, що автором була показана динаміка змін пкДНК й зв'язок із перебігом COVID-19. Так, пацієнти, які постійно потребували штучної вентиляції легенів, продемонстрували менше зниження пкДНК порівняно з тими, які припинили вентиляцію. Коливання пкДНК від ранньої до пізньої фази корелювали з кількістю днів без ШВЛ. Для тих осіб, які вижили, рівні пкДНК були вищими в ранніх зразках порівняно з ранніми зразками від тих, хто не вижив. Однак у тих, хто вижив, спостерігалось значне зниження концентрації пкДНК на 38% у пізніх зразках плазми [143].

Huckriede також стверджує, що cfDNA - це DAMP, здатний активувати TLR. Такої самої думки дотримується й Stawski, який в своїй роботі доводить, що позаклітинна ДНК є ефективним маркером ускладнень COVID-19, а також служить маркером стану здоров'я та факторів ризику важкого захворювання під час інфікування COVID-19 [144].

Зрештою, як ми і прогнозували, моделюючи наше дослідження в розпал пандемії, пкДНК на сьогоднішній день є загальноприйнятим фактором, який можна використовувати для прогнозування тяжкості COVID-19.

Узагальнюючи весь масив проаналізованих літературних даних та отримані власні експериментальні результати, можна стверджувати, що рівень позаклітинної ДНК у плазмі є не лише ефективним маркером тяжкості COVID-19, який чітко корелює з важкістю перебігу коронавірусної хвороби, але й важливим патогенетичним фактором у перебігу коронавірусної хвороби.

Економічна доцільність проведення визначення окремих прогностичних маркерів суттєво відрізняється між собою. Не дивлячись на те, що отримані нами дані щодо реакцій нейтрофілів у пацієнтів із COVID-19 є дуже показовими, адже у стабільному стані нейтрофіли пацієнтів із COVID-19 виробляли в 4 рази більше NET, ніж нейтрофіли здорових людей, а при стимуляції РМА рівень індукованого NETosis пацієнтів із COVID-19 ставав вдвічі вищим, в порівнянні з групою контролю, треба зауважити, що технічне виконання визначення рівня NETозу у пацієнтів, які звертаються за допомогою в лікарню, є складним, тривалим та дуже дорогим. Використання цього методу в клінічних цілях недоцільне та є нераціональним для впровадження в широку медичну практику.

На противагу цьому, методика визначення позаклітинної ДНК в плазмі крові є більш простою і доступною у виконанні, а її результати, як показує наше дослідження, більш показові. Позаклітинну ДНК можна лабораторно визначити різними методиками, такими як ПЛР або спектрофлюометрія, що дає можливість широко використовувати цей аналіз в клінічній практиці при поступленні пацієнтів до лікарень.

4.2. Гіалууронова кислота та довга некодуєча РНК HAS2-AS1 як ранні маркери гіпоксії

Інтерстиціальний набряк легень є одним із провідних симптомів тяжкого перебігу захворювання COVID-19 та безпосередньо пов'язаний із гострою дихальною недостатністю та потребою в кисневій підтримці [53, 155, 146]. Ранній візуальний симптом на комп'ютерній томограмі при SARS-CoV-2, який називається «матовим склом» (ground-glass opacity symptom – англ.) та асоціюється з інтерстиціальним набряком легень [147-150], потребує глибшого розуміння цього явища. Після того, як з'явилися поодинокі припущення, що симптомом «матового скла» може бути пов'язаний із метаболізмом гіалууронової кислоти [151], з'явилась потреба оцінити патогенетичну роль гіалууронової кислоти при ускладненнях COVID-19, її зв'язок з активацією НЕТозу та можливість використання ГК як маркера перебігу тяжкості коронавірусної хвороби.

Як було сказано раніше, вірус SARS-CoV-2 проникає не лише в дихальні клітини, але й в ендотелій судин, через рецептор ACE2 [152, 153]. Це призводить до пошкодження судинної оболонки, що викликає масову активацію нейтрофілів, які запускають НЕТоз [132]. Позаклітинна ДНК, яка утворюється в процесі, сприяє запаленню і закупорці судин, що є типовим для тяжкого COVID-19 [46]. Hellman один з перших висловлює думку, що при COVID-19 синтез гіалууронової кислоти клітинами ендотелію і фібробластами є відповіддю на пошкодження судин і тканин [51]. На думку автора, ГК діє як своєрідний "гель", що підтримує тканини, але при цьому може сприяти накопиченню рідини в легенях, що особливо небезпечно для пацієнтів із тяжким COVID-19 [51].

Zhao описує типовий для COVID ГРДС через призму взаємозв'язку ГК та НЕТоз: високий рівень ГК у поєднанні з НЕТозом створює гелеподібні структури, що накопичуються в легеневих альвеолах, спричиняючи важкі набряки і значно погіршуючи газообмін [66].

Гіалуронова кислота, накопичуючись у тканинах, здатна сама по собі активувати прозапальні рецептори, такі як TLR і CD44, що активують HIF навіть за відсутності гіпоксії. Це посилює прозапальну відповідь, підтримуючи високий рівень HIF і стимулюючи подальше утворення NETs і продукцію ГК, що призводить до порочного кола запалення і пошкодження тканин [81]. NETs і ГК можуть взаємодіяти з прозапальними цитокінами, такими як IL-6 та TNF- α , що утворює хибне коло: підвищені рівні цитокінів стимулюють вироблення NETs та ГК, що ще більше посилює запалення та набряки. Це може значно погіршувати стан пацієнтів з COVID-19 та спричиняти ускладнення [154].

Отримані нами експериментальні дані продемонстрували чітку кореляцію між рівнем гіалуронової кислоти в плазмі крові у пацієнтів із COVID-19 та подальшим перебігом захворювання, ще до початку появи клінічних ускладнень. У пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19 рівень ГК в плазмі крові в 2 рази вищий в порівнянні із рівнем ГК в групі пацієнтів із легким перебігом та групою контролю, та в 1,4 рази вищий від рівня ГК у пацієнтів із середньою тяжкістю захворювання й чітко корелює з ризиком розвитку клінічної гіпоксії та дихальної недостатності у пацієнтів із важким перебігом COVID-19.

Важливо відмітити, що інші дослідники також приводять дані, які підтверджують отримані нами результати, демонструючи, що визначення рівня гіалуронової кислоти в плазмі крові так само корелює з перебігом захворювання, як і збільшений рівень ГК у респіраторних виділеннях у людей із тяжкою формою COVID-19 порівняно зі здоровими людьми

Так, в роботі Ding, автори також розглядали гіалуронову кислоту як індикатор раннього попередження несприятливого прогнозу для важких пацієнтів із COVID-19 [155].

Іншою роботою, яка підтверджує наші дані, є праця Zhao із співавторами, в якому радіоізотопне дослідження на основі міченої ГК показало її роль як маркера запалення та гострого респіраторного дистрес-

синдрому [66]. Zhao запропонував використовувати мічену ГК для моделювання перебігу COVID-19, оскільки ГК накопичується у зонах ураження та дозволяє оцінити рівень пошкодження тканин при ГРДС [66]. Soldati та Demi в своїй роботі щодо ефективності використання ультразвукових методів візуалізації, для швидкої діагностики накопичення рідини, також вказують, що набряки можуть корелювати з рівнем ГК і допомагають прогнозувати тяжкість перебігу [54].

В 2023 році, вже згаданий вище Borrmann із співавторами, показав, що рівні гіалуронової кислоти в плазмі у пацієнтів із важким перебігом, які були госпіталізовані з пневмонією COVID-19, були значно вищими при госпіталізації, ніж у пацієнтів із раннім одужанням. Автори доводять, що циркулюючі компоненти глікокаліксу під час інфекції SARS-CoV-2 є біологічно активними маркерами мікросудинного ураження, маючи чіткий зворотний вплив на сигнальні мережі в імунних та ендотеліальних клітинах, що призводить до активації імунних та ендотеліальних клітин із посиленням запалення та подальшим посиленням мікротромбоутворення [154].

Також в 2023 році Huang описав патологічну роль позаклітинного матриксу у розвитку COVID-19, включаючи ГК, наголошуючи на значенні гіалуронової кислоти як важливого прогностичного маркера [156].

Вже в 2024 році, в іншій масштабній роботі той самий Hellman із Швеції, який був одним із перших, хто висловив припущення про зв'язок між гіалуроновою кислотою та інтерстиційним набряком легень [51], досліджуючи морфологію легень у 3D, продемонстрував наявність фрагментованої ГК під час важкого перебігу COVID-19 і провів кореляцію між системними рівнями ГК та дифузійною здатністю легень після одужання. Більше того, Hellman стверджує, що лікування, спрямоване на синтез ГК, може бути актуальним не тільки для інфекції SARS-CoV-2, але й для багатьох інших типів легеневих інфекцій [157].

Розгляд ГК не лише як патогенного фактору чи індикатора тяжкості захворювання, але й як перспективної мішені для лікування COVID-19 дійсно відкриває можливості для терапевтичного втручання.

На сьогодні вже показано в деяких роботах, що гімекромон (4-Methylumbelliferone, 4-MU), схвалений FDA препарат для лікування спазмів жовчовивідних шляхів, має пряму дію на синтез ГК [158], і було доведено, що він знижує рівень ГК у сироватці крові й в мокротинні у здорових учасників [159]. Нещодавнє клінічне випробування гімекромону показало ефективне пригнічення прогресування COVID-19 і потребує подальших досліджень [160].

Визначивши не тільки рівень ГК в плазмі крові, але і рівень експресії довгої некодуючої РНК HAS2-AS1 в лейкоцитах, яка здатна зв'язуватися з матричною РНК (мРНК) ферменту HAS2, впливаючи на її стабільність та транскрипційну активність [69], ми отримали дуже показові дані.

Результати показали, що в порівнянні з визначенням ГК в плазмі крові, рівень HAS2-AS1 в лейкоцитах пацієнтів ще на етапі госпіталізації у стаціонар є більш надійним та показовим прогностичним критерієм важкого перебігу COVID-19 та чітко відрізняє хворих із подальшим легким, середнім чи важким перебігом вже на ранньому етапі. У пацієнтів із групи із середньою важкістю перебігу COVID-19 експресія HAS2-AS1 збільшується у 7,7 разів ($p < 0,05$), а при тяжкому перебігу вже у 22,6 разів ($p < 0,05$) порівняно з пацієнтами із легким перебігом.

Значущість HAS2-AS1 та її роль у прогнозуванні перебігу COVID-19 підтверджена дуже високим показником ефекту величини ω^2 (0,33), що свідчить про те, що HAS2-AS1 має потужний вплив на перебіг COVID-19 у загальній популяції. Даний статистичний показник припускає, 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 є дуже ефективним інструментом для індивідуального прогнозування тяжкості перебігу. Визначене нами граничне значення цього

біомаркера становить 61,8 у.о., що вказує на те, що пацієнти з рівнем експресії HAS2-AS1 вище 61,8 у.о. потенційно мають значно підвищений (88%) ризик ускладнень. Ми припускаємо, що довга некодуюча РНК HAS2-AS1 може використовуватися для створення стратифікаційних моделей ризику, комбінуючи рівень її експресії з визначенням ГК в плазмі крові та іншими маркерами, про які буде сказано нижче (HIF-3 α , HIF1-AS1). Це забезпечує високу прогностичну точність появи клінічної гіпоксії й ускладненого перебігу COVID-19, а також практично унеможливорює отримання хибнопозитивних результатів для прогнозування перебігу COVID-19.

Ми припускаємо, що впровадження в широку медичну практику визначення рівня довгої некодуючої РНК HAS2-AS1 та HIF1A-AS1, про яку буде сказано нижче, буде мати важливу прогностичну цінність та сприятиме адекватному сортуванню хворих ще на етапі амбулаторного лікування або раннього потрапляння в стаціонар. Методика постановки та визначення даних показника є простою та може бути легко впроваджена.

Роль гіалуронової кислоти в патогенезі утворення інтерстиційного набряку легень при важкому перебігу COVID-19 схематично показано на рисунку 4.1. (Див. Додаток 2)

4.3. Транскрипційний фактор HIF та довга некодуюча РНК HIF1-AS1 в контексті COVID-19

Важкий перебіг коронавірусної хвороби супроводжується глибокою гіпоксією. Основним регулятором адаптаційних реакцій на гіпоксію є фактор, викликаний гіпоксією – HIF, який безпосередньо активує експресію кількох сотень цільових генів для підтримки гомеостазу кисню в клітинах [161]. Загальноприйнято, що індуковані HIF адаптивні реакції на гіпоксію є захисними при багатьох захворюваннях, але також можуть бути і згубними. Патологічна роль HIF добре вивчена в контексті онкології [161],

втім, в контексті метаболічних розладів та респіраторних захворювань роль транскрипційного фактору HIF є суперечливою.

В нашій роботі ми визначили експресію різних ізоформ транскрипційного фактору HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) та показали, що показники експресії всіх субодиниць HIF вірогідно зростали у хворих з COVID-19, а їх рівень на початку захворювання прямо асоціювався зі зростанням тяжкості перебігу в подальшому часі.

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). Це вказує на вагомий внесок глікемія-залежної субодиниці HIF-2 α у погіршення перебігу захворювання у пацієнтів з метаболічними розладами, тоді як гальмівна роль субодиниці HIF-3 α зменшується.

У тяжкохворих найменшим виявляється зростання субодиниці HIF-2 α (у 17,7 разів), натомість зростає внесок гіпоксія-залежних субодиниць HIF-1 α (у 21,6 разів) і особливо - HIF-3 α (у 33,7 разів). Одержані результати можуть вказувати на значну трансактивацію гіпоксія-залежних генів у цій групі хворих, що може значно потенціювати розвиток «цитокінового шторму» і запалення, незважаючи на активність гальмівної ланки фактора HIF-3 α .

Оскільки довга некодуюча РНК HIF1-AS1 в контексті COVID-19 є маловивченою, а її рівень у різних групах хворих при інфекції SARS CoV-2 не визначався наші дані є актуальними та показовими.

Згідно нашим результатам рівень експресії HIF1A-AS1 COVID-19 практично однаковий у контрольній групі волонтерів та пацієнтів з легким перебігом, але при середньотяжкому перебігу COVID-19 експресія збільшується у 5 разів, а при тяжкому перебігу рівень експресії зростає майже у 10 раз відносно групи з легким перебігом та 2 рази відносно пацієнтів із середньоважким перебігом. Аналіз показників ROC-кривої для HIF1-AS1 вказує на те, що маркер виявляє більшість хворих із важким

станом (чутливість становить 73%), хоча деякі випадки можуть залишитися нерозпізнаними. На противагу цьому специфічність 1.0 (100%) свідчить про ідеальну здатність маркера HIF1-AS1 правильно визначати здорових або пацієнтів із легким перебігом COVID-19. Граничне значення (277,85 у.о.) та специфічність HIF1-AS1 можна використовувати для виключення важкого перебігу COVID-19, тоді як велике значення показника Omega-squared (0,27) підтверджує його важливість як прогностичного фактора. Використання HIF1-AS1 практично унеможливорює хибнопозитивні результати, що є великим плюсом для клінічної діагностики. HIF1-AS1 може служити "фільтром", який допомагає уникнути хибнопозитивних результатів, тоді як інші маркери компенсують його нижчу чутливість.

Аналізуючи отримані дані, постає запитання: незважаючи на адаптаційну роль HIF в умовах гіпоксії, HIF є шкідливим чи захисним при захворюваннях, які протікають з ГРДС? Відповідь на це питання не є простою. Оскільки важкий перебіг COVID-19 зазвичай спостерігається у пацієнтів із коморбідними станами, це створює численні обмеження та ускладнення для вивчення ролі HIF та інтерпретації змін його експресії при цих поєднаних патологіях.

Загальновідомо, що вік, стать і наявні супутні захворювання, такі як артеріальна гіпертензія, ожиріння й особливо цукровий діабет, є основними факторами ризику для пацієнтів з COVID-19 [162].

За допомогою створеної нами моделі логарифмічної регресії (таб. 5) додатково вкотре підтверджується прямий зв'язок між тяжкістю захворювання та двома лабораторними показниками: паличкоядерними лейкоцитами та рівнем глюкози крові. Оскільки хворі на цукровий діабет належать до групи високого ризику і потребують підвищеної уваги та своєчасного лікування, аналіз цих параметрів є необхідним для точного визначення групи ризику пацієнта.

Командою науковців з Китаю було проведено велике ретроспективне багатоцентрове дослідження 7337 випадків COVID-19 у провінції Хубей,

серед яких 952 пацієнта мали вже існуючий ЦД 2 типу. Було показано, що пацієнти з цукровим діабетом 2-го типу потребували більшої кількості медичних втручань і мали значно вищу смертність (7,8% проти 2,7%) і поліорганні ушкодження, ніж в осіб без діабету [3].

Ідея та модель нашого дослідження не ставила за мету доводити ці загальновідомі твердження. Ми навпаки, створили однорідну вибірку з пацієнтів, які мали приблизно однакові показники рівня глюкози, однакові супутні хронічні захворювання (ожиріння, цукровий діабет та артеріальну гіпертензію) та приблизно рівні строки поступлення в стаціонар. Це дало можливість в подальшому рівноцінно оцінити розподілення по групам тяжкості й виокремити справжню групу ризику.

Втім, розуміння, чому пацієнти з цукровим діабетом та ожирінням більш схильні до розвитку важкої форми COVID-19 є дуже важливим для розширення діагностично-терапевтичних та профілактичних заходів.

На думку деяких авторів, гірший прогноз COVID-19 у людей із діабетом може бути пов'язаний із неферментативним глікуванням людського ACE2, що сприяє більш схильній взаємодії з S-білком вірусу [163].

Також висловлюється припущення про зв'язок між підвищеним рівнем глюкози в крові та рівнем експресії HIF [82].

Під час гіпоксичного стресу швидкість окисного фосфорилування знижується, перемикаючи клітинний метаболізм на використання анаеробних гліколітичних шляхів через транскрипційну активність HIF-1 α [164]. Епітеліальні клітини дихальних шляхів реагують подібним чином, демонструючи як аеробну, так і анаеробну гліколітичну здатність [165]. Ouiddir та ін. продемонстрували, що епітеліальні клітини дихальних шляхів, які піддавалися дії гіпоксії, індукували триразове збільшення експресії транспортера глюкози GLUT1 як на рівні мРНК, так і на рівні білка [166]. Автори прийшли до висновку, що здатність епітеліальних клітин підтримувати виробництво АТФ під час гіпоксії була зумовлена

збільшенням анаеробного гліколізу та збільшенням транспорту глюкози на рівні мембрани. Епітеліальні клітини дихальних шляхів під впливом гіпоксії здатні призводити до збільшення експресії HIF-1 α . У цих гіпоксичних клітинах мітохондріальне дихання, швидкість синтезу білка та потреба в АТФ згодом були знижені, а активність GAPDH зросла [165].

Дані механізми успішно використовують різноманітні патогени. Так, було виявлено, що вірус грипу H1N1 використовує цей механізм, імітуючи гіпоксичну відповідь для стабілізації HIF-1 α під час інфікування епітеліальних клітин дихальних шляхів [91]. Іншою групою дослідників було показано, що риновірусна інфекція також індукує метаболічні зміни в клітинах-господарях шляхом збільшення експресії GLUT1 із збільшенням поглинання глюкози та посилення реплікації вірусу [167].

SARS-CoV-2 не став виключенням. Tian в своїй роботі показуючи, що HIF-1 α відіграє ключову роль у регулюванні метаболічних шляхів і запальних реакцій, визначав вплив HIF-1 α на регуляцію реплікації SARS-CoV-2 і запальних реакцій [82]. Codo із співавторами в іншій роботі демонструє, що моноцити, інфіковані SARS-CoV-2, призвели до опосередкованої мітохондріями стабілізації HIF-1 α та посилення гліколізу [168]. Автори приводять докази, що HIF-1 α є необхідним для індукції гліколізу та подальшого прозапального стану моноцитів, інфікованих CoV-2, й зрештою, збільшення гліколізу сприяє реплікації SARS-CoV-2 і експресії цитокінів.

Втім, навіть без вірусного втручання, гіпоксичне ураження супроводжує коморбідні стани та викликає активацію транскрипційного фактору HIF.

Гіпоксія в жировій тканині є ранньою подією в перебігу ожиріння і призводить до порушення регуляції продукції адипокінів, запалення та метаболічного синдрому. Деякі дослідження показують шкідливу роль активації HIF у патогенезі ожиріння та метаболічних захворювань. Так, Regazzetti із співавторами показує в своїй експериментальній роботі, що

надмірна експресія HIF-1 α або HIF-2 α пригнічує передачу сигналів інсуліну, в той час як пригнічення активності HIF відновлює стимуляцію інсулінового рецептора інсуліном. Автори висувають припущення, що гіпоксію можна уявити як новий механізм, який бере участь у резистентності до інсуліну в жировій тканині пацієнтів із ожирінням [169].

В іншій роботі Jiang також показує, що генетична або фармакологічна інактивація HIF-1 може запобігти або повернути назад викликане ожирінням запалення та інсулінорезистентність [170]. Це підтверджується даними, що демонструють резистентність до інсуліну та фіброз жирової тканини у трансгенних мишей із надмірною експресією HIF-1 α [171]. Gonzalez також доводить, що гіпоксія на тлі ожиріння стабілізує та активує передачу HIF-1 α та HIF-2 α , що призводить до несприятливих метаболічних ефектів, включаючи резистентність до інсуліну та неалкогольну жирову хворобу печінки [172]. В роботі Yuan показано, що генетичне або хімічне інгібування передачі сигналів HIF-1 α і HIF-2 α в жировій тканині та тонкому кишечнику полегшує метаболічні захворювання, пов'язані з ожирінням й вказує на те, що інгібітори цих двох ізоформ транскрипційного фактору HIF можуть бути спрямовані на лікування метаболічних розладів [173].

Також було показано, що ендогенне виробництво фруктози з утворенням сечової кислоти відбувається в гіпоксичних та ішемізованих тканинах, і є докази того, що вплив багатьох факторів, індукованих гіпоксією, може бути опосередкований стимуляцією вироблення та метаболізму фруктози. На жаль, незважаючи на захисну функцію в гострому періоді, ці системи при тривалій надмірній активації призводять до хронічного запалення, а також можуть брати участь у розвитку метаболічного синдрому та пов'язаних із ним захворювань [174]. Шкідлива роль HIF-1 α як центрального стимулятора ангиогенезу в проліферативній фазі діабетичної ретинопатії чітко встановлена й не викликає сумнівів [175].

Однак, нещодавні дослідження з використанням генетичного або фармакологічного інгібування пролілгідроксилази (PHD) виявили корисну

роль активації HIF-1 α метаболічних захворюваннях. PHD2-гіпоморфні миші, яких годували звичайною їжею або дієтою з високим вмістом жиру, показали зменшення ожиріння, запалення жирової тканини та стеатоз печінки разом із покращеною толерантністю до глюкози та чутливістю до інсуліну [176].

Результати досліджень з фармакологічною індукцією HIF-1 α демонструють ще більш неоднозначну картину. В своєму обширному огляді Catrina приводить дані численних доклінічних експериментів на моделях тварин з цукровим діабетом, які показали, що інгібування PHD може запобігти прогресуванню діабетичної нефропатії, атеросклерозу, захистити ішемізоване серце, й інгібування PHD є корисним для профілактики та лікування ожиріння та метаболічних розладів [177].

Автор робить висновки, що адаптивні відповіді на гіпоксію порушуються через порушення регуляції сигналізації HIF-1 α при діабеті, що в кінцевому випадку сприяє прогресуванню діабету та його ускладнень, які потенційно можна запобігти або лікувати шляхом модуляції експресії або активності HIF-1 α [177].

Інша група авторів також стверджує, що вища експресія HIF-1 α в експериментах по інтервальному гіпоксичному тренуванні у пацієнтів з преддіабетом була позитивно пов'язана з вищою толерантністю до гіпоксії та кращим гомеостазом глюкози [178].

Суперечливість експериментальних даних частково може бути вирішена завдяки глибокому вивченню діабетичної нефропатії та її зв'язку з HIF-1 α , адже при цукровому діабеті спостерігається знижена доставка кисню внаслідок мікросудинного пошкодження, пов'язаного з гіперглікемією, і підвищена потреба в кисні через підвищену реабсорбцію натрію, спричинену клубочковою гіперфільтрацією, підвищеним еферентним артеріолярним опором й посиленням котранспортера натрію й глюкози [179]. Останні дослідження показали, що накопичення HIF-1 α в нирках при хронічній гіпоксії викликає різні ураження подоцитів [180].

Dallatu із співавторами продемонстрували на щурчій моделі гіпертензії, спричиненої дієтою з високим вмістом солі та відмовою від оксиду азоту, що підвищені рівні HIF-1 α також посилюють прогресування пошкодження і фіброзу нирок [181], а Liu та Gilkes окремо один від одного показують, що активація передачі сигналів HIF-1 α може відігравати роль у ремоделюванні позаклітинного матриксу при фіброзі нирок шляхом індукції генів, відповідальних за відкладення колагену, вирівнювання колагенових волокон і посилення позаклітинного матриксу, й врешті рещт прискорити фіброгенез при ХХН [182, 183].

На противагу цьому багато дослідників висловлюють іншу думку, що ускладнення діабету — як макросудинні, так і мікросудинні — викликані не стільки патологічною роллю самого фактору HIF, як недостатністю та порушенням його регуляції. Знижена активність HIF-1 α також доказово пов'язана з більшістю ускладнень цукрового діабету. Інактивація HIF-1 α в експериментальних моделях погіршує більшість ускладнень діабету, а також саму функцію β -клітин [184].

В своїй роботі Gunton доводить, що важка гіпоксія є шкідливою і не може бути повністю компенсована HIF та їхніми мішенями. Накопичення повністю гідроксильованого HIF-1 α , як видно з делецією білка фон Гіппель-Ліндау (VHL), є шкідливою. І навпаки, накопичення частково гідроксильованих або негідроксильованих HIF, що спостерігається при помірній гіпоксії, делеції PHD, делеції фактору, що інгібує HIF (FIH) або інгібуванні PHD/FIH, має певні сприятливі ефекти [185]. Дослідження експресії генів показують, що при дефіциті VHL спостерігаються різні ефекти, що вказує на те, що повністю гідроксильовані HIF мають зовсім інші дії [185]. В той же час, посиляючись на роботу Бранта [186], Gunton робить висновок, що HIF-2 α взагалі не відіграє головної ролі у функції β -клітин.

Розуміння цих складних процесів дають часткову відповідь, чому при коронавірусній хворобі саме пацієнти з ожирінням та цукровим діабетом мали найбільший ризик важких ускладнень. Порушення регуляції та

балансу в системі фактору HIF могло не дати організму можливості адаптаційної позитивної перебудови в умовах гіпоксії на тлі важкого перебігу COVID-19.

В нашому дослідженні для визначення рівня експресії різних ізоформ HIF ми використовували лейкоцити хворих пацієнтів на COVID-19 із коморбідними станами, адже метою було оцінити рівень експресії HIF поза легеневиими структурами, а також відшукати ранні прогностичні маркери розвитку важкої гіпоксії, намагаючись зрозуміти, чи існує зв'язок між рівнем експресії HIF, розвитком HETc та накопиченням гіалуронової кислоти.

Втім, знову ж таки постає питання, чого більше, користі чи шкоди завдає підвищена експресія HIF при коронавірусній хворобі. При аналізі співвідношення рівнів експресії різних ізоформ HIF та HIF1A-AS1, визначених нами у пацієнтів з різним перебігом COVID-19 видно, що експресія HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α в групі контролю у здорових добровольців знаходиться на певному базовому рівні при відносно високому рівні експресії HIF1A-AS1. В групі пацієнтів з легким перебігом COVID-19 експресія всіх ізоформ HIF пропорційно збільшується, з переважанням HIF-2 α , втім експресія HIF1A-AS1 не змінюється. У пацієнтів із середньотяжким перебігом COVID-19 при пропорційному збільшенні рівня експресії HIF-1 α , HIF-2 α та різкому збільшенні (в 5 разів) рівня експресії HIF1A-AS1, в порівнянні з групою пацієнтів із легким перебігом, експресія HIF-3 α не змінюється. При аналізі показників пацієнтів із важким перебігом видно, що хоча й рівень експресії HIF-3 α різко зростає (в 4,7 рази в порівнянні із експресією в групі пацієнтів із середньоважким перебігом), співвідношення HIF-1 α /HIF-3 α , HIF-2 α /HIF-3 α та HIF1A-AS1/HIF-3 α стає в рази непропорційно меншим у порівнянні групою контролю та із групою із середньоважким перебігом.

Це не дає нам можливість прийти до однозначного висновку. Можна висловити припущення про зрив адаптаційних процесів та взаєморегуляції

фактору HIF на тлі важкого перебігу COVID-19, що й призводить зрештою до декомпенсації й прогресування проявів важкої клінічної гіпоксії. Антагоністична роль HIF-3 α по відношенню до HIF-1 α (експресія якого в 4,7 рази збільшується в групі із важким перебігом порівнюючи з групою із середньоважким перебігом та в 33 рази вища порівнюючи з групою контролю), теоретично мала інгібувати активність HIF-1 α та зменшувати формування HETc, але дані свідчать про протилежне. Рівень експресії HIF-1 α , HIF-2 α та HIF1A-AS1 значно зростає у групі пацієнтів із важким перебігом COVID-19, що, на нашу думку, не тільки не зупиняє гіпоксичне ураження тканин, але й сприяє виживанню нейтрофілів в плазмі крові та опосередковано позитивно впливає на неконтрольоване формування HETc, подальшому ушкодженню тканин та тромбоутворенню.

Отже, співвідношення між різними ізоформами HIF при прогресуванні COVID-19 має важливе прогностичне значення та доповнює ізольоване визначення рівнів експресії фактору HIF, а також показує важливу роль та значення транскрипційного фактору HIF-3 в контексті відповіді організму на гіпоксію при COVID-19. І хоча дослідження, що стосуються регуляції HIF-3 α при COVID-19, залишаються на початкових етапах та потребують детального вивчення, вони можуть допомогти визначити нові терапевтичні стратегії для лікування важких форм COVID-19.

Співвідношення між різними ізоформами HIF при прогресуванні COVID-19 скоріше за все мають визначальне прогностичне значення та доповнюють ізольоване визначення рівнів експресії фактору HIF.

Подібне дослідження по визначенню співвідношення рівнів експресії HIF-3 α по відношенню до HIF-1 α та HIF-2 α при гепатоцелюлярній карциномі виконав Liu [187] де демонструє, що HIF-3 α може пригнічувати опосередковану експресію генів HIF-1 α та HIF-2 α .

HIF-3 α , на відміну від HIF-1 α та HIF-2 α , здебільшого функціонує як негативний регулятор гіпоксичної відповіді. Було показано в деяких

роботах, що HIF-3 α може пригнічувати активність HIF-1 α через конкуренцію за гіпоксичні відділення та інші компоненти сигнальних шляхів [188]. В іншій роботі Huang з співавторами також показує, що HIF-3 α сприяє балансуєчій функції регуляції HIF генів [189]. Хоча автори не поспішають зробити висновок, що домінуюча негативна роль HIF-3 α , як частини гіпоксичної відповіді, відсутня, попередні та поточні дані свідчать про те, що HIF-2 α та HIF-3 α мають різні гени-мішені [190]. Так, Drevytska із співавторами припускає, що різні варіанти сплайсингу HIF-3 α відіграють особливу роль у регуляції функцій HIF-1 α та HIF-2 α , й гіпоксична індукція HIF-1 α і HIF-2 α призводить до транскрипційної активації експресії HIF-3 α як цільового гена [191].

Втім, як видно на отриманих нами результатах, ця система взаєморегуляції HIF не спрацьовує у багатьох пацієнтів при коронавірусній хворобі й не запобігає декомпенсації та переходу в важку стадію COVID-19. Можливо, HIF-3 α відіграє негативну роль в адаптації до гіпоксії. Як показано в певних роботах, пригнічення експресії HIF-3 α призводить до підвищення фізичної витривалості та покращення адаптаційних процесів в умовах гіпоксії [192].

Чи пов'язаний транскрипційний фактор HIF з утворенням позаклітинних нейтрофільних пасток?

HIF-1 α посилює регуляцію генів, що сприяють виживанню клітин, таких як гліколітичні ферменти, і його інгібування/видалення в макрофагах призводить до різкого зниження рівня АТФ і подальшого порушення їх рухливості та знищення бактерій [96], те саме спостерігається й у нейтрофілах, де збільшення HIF-1 α викликає метаболічний зсув у бік гліколізу, який головним чином живить ці клітини АТФ [97].

Оскільки задача нейтрофілів в умовах гіперзапалення та імунної відповіді є активація НЕТозу було показано, що експресія HIF-1 α корелювала з вивільненням NET при стимуляції бактеріальним

ліпополісахаридом, а інгібування HIF-1 α повністю запобігало утворенню NET [97].

Відповідно до вищезазначеного, McInturff із співавторами продемонстрували посилення регуляції HIF-1 α під час утворення NET після стимуляції ліпополісахаридом у первинних нейтрофілах людини в мішені ссавців залежним від рапаміцину (mTOR) способом [193]. В цій роботі показано еволюційно важливий механізм вродженого протибактерійного імунітету. Використовуючи первинні нейтрофіли людини та генетично змінені мієлоїдні лейкоцити, диференційовані на сурогатні нейтрофіли, автори виявили, що mTOR у ссавців регулює утворення NET шляхом посттранскрипційного контролю експресії HIF-1 α . Фармакологічний і генетичний нокдаун експресії та активності HIF-1 α пригнічував розгортання NET, а пригнічення mTOR і HIF-1 α пригнічувало опосередковане NET знищення позаклітинних бактерій [193].

Ми виміряли рівень експресії mTOR у пацієнтів із COVID-19 й показали, що рівень експресії мРНК mTOR в групі важких пацієнтів був у 19 разів вищий в порівнянні із групою контролю та в 3,4 рази вищий в порівнянні з експресією в групі пацієнтів із легким перебігом COVID-19. Показники експресії mTOR статистично корелювали як з рівнем експресії HIF-1 α (сила кореляції 0,78), так і з тяжкістю перебігу COVID-19 загалом.

В іншій роботі показано, що стабілізація HIF-1 α посилила вивільнення NET, а фармакологічний або генетичний нокдаун HIF-1 α призводив до меншого утворення NET і меншого опосередкованого NET знищення позаклітинних бактерій [96]. Автор посилається на інше дослідження, де показано, що гіпоксична попередня обробка нейтрофілів повністю скасувала РМА-індуковане утворення NET [194], пояснюючи це тим, що гіпоксія пригнічує виробництво АФК, й це може пояснити пригнічення утворення NET [28].

Таким чином, можна висловити припущення, що відповідь фактору HIF на гостру гіпоксію, попри позитивну роль з одного боку, також сприяє

виживанню нейтрофілів та підсилює активацію формування NETс, з іншого. Як і для більшості імунних клітин, для виживання організму необхідний тонкий баланс між активацією нейтрофілів на початку запалення та подальшим зниженням кількості нейтрофілів, щоб запобігти пошкодженню тканин.

Апоптоз є одним із основних регуляторних механізмів для усунення нейтрофільного запалення [195]. Декілька досліджень продемонстрували інгібування апоптозу нейтрофілів в умовах гіпоксії [196]. Це гальмування апоптозу гіпоксією супроводжується індукцією кількох гліколітичних ферментів, у тому числі GAPDH, що забезпечує продовження генерації АТФ, що є важливим для виживання та функціонування нейтрофілів [197].

Ймовірно, на думку Mecklenburgh, HIF-1 α і HIF-2 α відіграють певну роль у цьому виживанні. Нейтрофіли мишей з дефіцитом HIF-1 α демонструють підвищений апоптоз в умовах гіпоксії. Інгібітори NF- κ B також посилюють індукований гіпоксією апоптоз, і це залежить від HIF-1 α , оскільки гіпоксична індукція NF- κ B не відбувається в HIF-1 α -дефіцитних нейтрофілах [196, 197]. Нейтрофіли, виділені у пацієнтів із посиленням функції гена HIF-2 α , показали нижчу базову частоту конститутивного апоптозу, ніж у контрольних пацієнтів [199].

Гіпоксія також посилює фагоцитоз у нейтрофілах, а в нейтрофілах, що містять мутований VHL, підвищені рівні HIF-1 α призводять до зниження апоптозу та посилення бактеріального фагоцитозу за нормоксичних умов [198].

Ці дослідження показують, що HIF сприяє виживанню нейтрофілів і збільшує фагоцитоз, що, поряд із збільшенням утворення NET, може бути вигідним для організму при деяких бактеріальних інфекціях. Однак, надмірний фагоцитоз і утворення NET при вірусних захворюваннях, таких як COVID-19, може бути вкрай шкідливим для організму й сприяти прогресуючому ушкодженню тканин.

Як було сказано вище, у важких випадках COVID-19 активація HIF-1 α призводить до цитокинового шторму шляхом активації та стабілізації імунних клітин, що спричиняє вироблення макрофагами та нейтрофілами великої кількості запальних цитокінів, судинного витоку і руйнування бар'єрів між альвеоцитами та інтерстицієм [11.] Білкові мішені HIF-1 α беруть участь у спричиненій гіпоксією активації експресії прозапальних цитокінів і подальшому запальному процесі та фазі цитокинового шторму COVID-19 [200].

Наші результати показують доцільність використання вимірювання рівнів експресії різних субодиниць HIF як надійних прогностичних маркерів важкого перебігу COVID-19. Схожі дані було отримано у 2022 р. Yucel, який вимірював рівні HIF-1 α у пацієнтів із COVID-19 у відділенні інтенсивної терапії, порівнюючи їх зі здоровими контрольними групами, пропонуючи використовувати HIF-1 α як надійний маркер для прогнозу COVID-19 [201].

Але в той же час нами було демонстровано, що рівень експресії HIF варто розглядати в сукупності з іншими прогностичними маркерами важкого перебігу коронавірусного захворювання, адже порушення регуляції HIF спостерігається в поєднанні інфекції, яку спричиняє SARS-CoV-2 та коморбідних станів. Також ми продемонстрували, що рівень експресії довгої некодуючої РНК HIF1A-AS1 в лейкоцитах крові є більш надійним маркером для прогнозу перебігу COVID-19 й різко зростає в групі пацієнтів з середньоважким та важким перебігом COVID-19 на тлі коморбідних метаболічних розладів ще на догоспітальному етапі перед настанням клінічного погіршення.

Оскільки довга некодуюча РНК HIF1A-AS1 мало вивчена, і раніше експресія HIF1A-AS1 при COVID-19 взагалі не вивчалась, наші дані щодо можливості використання HIF1A-AS1 як прогностичного маркера є цінними й дуже показовими та потребують глибшого вивчення та можуть відкрити нові підходи для ранньої діагностики, прогнозування перебігу хвороби та розробки таргетної терапії для пацієнтів з тяжким перебігом COVID-19.

Націлювання на HIF-1 α може мати великий терапевтичний потенціал для розробки нових ліків для лікування COVID-19 [168]. Інгібітори HIF-1 α (інгібітори пролілгідроксилази) можуть знижувати запальну відповідь та мінімізувати ушкодження, спричинені цитокиновим штормом [202, 203].

Але такі підходи потребують подальшого глибшого вивчення, особливо в контексті специфічної дії на гіпоксичні механізми при COVID-19.

Цікавим та перспективним в цьому контексті є вивчення ролі метформіну при COVID-19, адже автори роботи, виходячи з патогенезу SARS-CoV-2, запропонували кілька механізмів, які пояснюють можливі переваги метформіну для пацієнтів із COVID-19 і наявним діабетом другого типу, наприклад, протизапальні ефекти та підвищення клітинного рН для інгібування вірусної інфекції [163].

Зв'язок між нейтрофільними позаклітинними пастками, гіалуроновою кислотою та транскрипційним фактором HIF відіграють важливу роль у реакції організму на гіпоксію, характерну для COVID-19. HIF є ключовим регулятором клітинної відповіді на низький рівень кисню (гіпоксію), що характерно для уражених легенів при COVID-19. HIF активується у відповідь на гіпоксію та сприяє виживанню нейтрофілів, активуючи їх і стимулюючи до вивільнення NETs. Це має значення для захисту від патогенів, однак при COVID-19, де гіпоксія є поширеним явищем, надмірна активація HIF може призводити до підвищеного NETозу і надлишкового вивільнення позаклітинної ДНК, що посилює запалення. HIF також впливає на клітини, відповідальні за синтез гіалуронової кислоти, такі як фібробласти та ендотеліальні клітини. У гіпоксичних умовах HIF активує експресію ферментів гіалуронан-синтаз (HAS1, HAS2), які відповідають за продукцію ГК. Це призводить до накопичення ГК у тканинах, створюючи гелеподібну субстанцію, яка сприяє набрякам і утруднює газообмін, погіршуючи стан пацієнтів з COVID-19. Важкий перебіг коронавірусної хвороби викликаний появою порочного кола: HIF активує нейтрофіли і

стимулює NETоз, це викликає пошкодження тканин і посилює запалення, що, у свою чергу, стимулює вироблення ще більшої кількості ГК як відповіді на пошкодження. ГК, у поєднанні з позаклітинною ДНК NETs, створює середовище з високою в'язкістю, що додатково погіршує дихання і спричиняє набряки, характерні для гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) у тяжких випадках COVID-19.

Розуміння цього взаємозв'язку відкриває перспективи для нових методів лікування, які спрямовані на різні ланки цього патологічного процесу, особливо на збереження регуляції та балансу NIF, щоб зменшити утворення NETs та продукцію ГК.

Узагальнююча схема патогенетичних механізмів важкого перебігу COVID-19 в контексті детального аналізу даних літератури та отриманих власних результатів представлена на рисунку 4.2 (Див. Додаток 3).

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено наукові завдання встановлення нових ланок молекулярно-генетичних та імунних механізмів важкого перебігу коронавірусної хвороби (COVID-19), зокрема, на тлі метаболічних розладів, та визначення нових прогностичних маркерів тяжкого перебігу COVID-19 у пацієнтів з групи ризику.

1. Встановлено, що пацієнтів із COVID-19 з групи ризику рівень спонтанного NETозу був у 4 рази вищим, ніж у здорових донорів, тоді як індукований NETоз зростав у 1,65 рази, що вказує на активацію нейтрофілів у відповідь на вірусну інфекцію.
2. 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, $p < 0,05$). ROC крива демонструє ефективність останнього показника як прогностичного маркера тяжкості перебігу COVID-19 з чутливістю 82 %.

Показники понад порогове значення 4297 нг/мл можна використовувати для розмежування груп ризику як предиктор важкого перебігу COVID-19.

3. Визначено, що рівень мієлопероксидази в плазмі крові пацієнтів із COVID-19 зростає у прямій 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 ($\omega^2 = 0,43$) і засвідчує патогенетичну 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.
4. Встановлено, що у хворих з групи ризику рівень гіалуронової кислоти у плазмі крові демонстрував значну варіабельність і мав лише тенденцію до зростання з обтяженням перебігу захворювання. Значно більш інформативним було визначення рівня HAS2-AS1 в лейкоцитах таких 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, у пацієнтів з середньою важкістю COVID-19 зростала у 7,7 разів ($p < 0.05$), а при тяжкому перебігу в 22,6 разів ($p < 0.05$) порівняно з пацієнтами із легким перебігом. Значущість HAS2-AS1 підтверджена показником ефекту величини ω^2 (0.33), який свідчить, що HAS2-AS1 має потужний вплив на перебіг COVID-19 у загальній популяції. ROC-показники (чутливість 0.88, специфічність 0.8) підтверджують, що HAS2-AS1 є ефективним інструментом для індивідуального прогнозування тяжкості перебігу. Пацієнти з рівнем експресії HAS2-AS1 вище порогового значення 61,8 у.о. потенційно мають високий (88%) ризик ускладнень.
5. Показано, що ізоформи транскрипційного фактору HIF (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) мають значний вплив на патогенез 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 рази) і найменше - HIF-3 α (у 6,2 та 7,1 рази). У тяжкохворих найменшим виявляється зростання субдиниці HIF-2 α (у 17,7 разів), натомість зростає внесок субдиниць HIF-1 α (у 21,6 разів) і особливо - HIF-3 α (у 33,7 разів). Співвідношення між рівнями експресії HIF-1 α , HIF-2 α та HIF-3 α може бути ключовим 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.

6. 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 (у 5 та 9,8 разів, відповідно), що вказує на її вагомий внесок у патогенез тяжкого перебігу COVID-19. ROC-крива HIF1A-AS1 демонструє 100% специфічність і 73% чутливість з відсутністю хибнопозитивних результатів. Граничне значення 277,85 у.о. вказує рівень експресії HIF1-AS1, при перевищенні якого пацієнт вважається в зоні ризику важкого перебігу COVID-19.

Практичні рекомендації

1. Результати дисертаційної роботи дозволяють надати клінічні рекомендації. Встановлено, що тяжкість коронавірусної хвороби у пацієнтів, зокрема, з групи ризику, корелює з раннім зростанням позаклітинної ДНК та мієлопероксидази у плазмі крові, формування нейтрофільних позаклітинних пасток, експресії довгих некодуючих РНК HAS2-AS1 та HIF1A-AS1, накопиченням гіалуронової кислоти в плазмі крові, а також особливостями співвідношення між рівнями експресії різних ізоформ транскрипційного фактору HIF. Це дозволяє розглядати

ці показники як надійні параметри клінічного моніторингу стану хворих на COVID-19.

2. Визначення маркерів запалення (МПО, пкДНК), судинної проникності (HAS2-AS1), та гіпоксії (HIF1-AS1 та HIF-3 α) необхідне на догоспітальному і ранньому госпітальному етапі як прогностичних біомаркерів важкого перебігу COVID-19. Впровадження цих досліджень у клінічну практику допоможе окреслити справжні групи ризику ще на догоспітальному етапі, оптимізувати лікування та зменшити ризики для пацієнтів, дозволивши при надзвичайних ситуаціях зосередитись на прогностично неблагополучних пацієнтах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aslan, A., Aslan, C., Zolbanin, N. M., & Jafari, R. (2021). Acute respiratory distress syndrome in COVID-19: possible mechanisms and therapeutic management. *Pneumonia (Nathan Qld.)*, 13(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s41479-021-00092-9>
2. Zhang, J. J., Dong, X., Liu, G. H., & Gao, Y. D. (2023). Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 64(1), 90–107. <https://doi.org/10.1007/s12016-022-08921-5>
3. Zhu, L., She, Z. G., Cheng, X., Qin, J. J., Zhang, X. J., Cai, J., Lei, F., Wang, H., Xie, J., Wang, W., Li, H., Zhang, P., Song, X., Chen, X., Xiang, M., Zhang, C., Bai, L., Xiang, D., Chen, M. M., Liu, Y., ... Li, H. (2020). Association of Blood Glucose Control and Outcomes in Patients with COVID-19 and Pre-existing Type 2 Diabetes. *Cell metabolism*, 31(6), 1068–1077.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.04.021>
4. Shah, C., Grando, D. J., Rainess, R. A., Ayad, L., Gobran, E., Benson, P., Neblett, M. T., & Nookala, V. (2020). Factors associated with increased mortality in hospitalized COVID-19 patients. *Annals of medicine and surgery (2012)*, 60, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.10.071>.
5. Middleton, E. A., He, X. Y., Denorme, F., Campbell, R. A., Ng, D., Salvatore, S. P., Mostyka, M., Baxter-Stoltzfus, A., Borczuk, A. C., Loda, M., Cody, M. J., Manne, B. K., Portier, I., Harris, E. S., Petrey, A. C., Beswick, E. J., Caulin, A. F., Iovino, A., Abegglen, L. M., Weyrich, A. S., ... Yost, C. C. (2020). Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*, 136(10), 1169–1179. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007008>
6. Saand, A. R., Flores, M., Kewan, T., Alqaisi, S., Alwakeel, M., Griffiths, L., Wang, X., Han, X., Burton, R., Al-Jaghbeer, M. J., & Abi Fadel, F.

- (2021). Does inpatient hyperglycemia predict a worse outcome in COVID-19 intensive care unit patients?. *Journal of diabetes*, 13(3), 253–260. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.13137>
7. Azevedo, R. B., Botelho, B. G., Hollanda, J. V. G., Ferreira, L. V. L., Junqueira de Andrade, L. Z., Oei, S. S. M. L., Mello, T. S., & Muxfeldt, E. S. (2021). Covid-19 and the cardiovascular system: a comprehensive review. *Journal of human hypertension*, 35(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-0387-4>
 8. Rashedi, J., Mahdavi Poor, B., Asgharzadeh, V., Pourostadi, M., Samadi Kafil, H., Vegari, A., Tayebi-Khosroshahi, H., & Asgharzadeh, M. (2020). Risk Factors for COVID-19. *Le infezioni in medicina*, 28(4), 469–474.
 9. Ackermann, M., Anders, H. J., Bilyy, R., Bowlin, G. L., Daniel, C., De Lorenzo, R., Egeblad, M., Henneck, T., Hidalgo, A., Hoffmann, M., Hohberger, B., Kanthi, Y., Kaplan, M. J., Knight, J. S., Knopf, J., Kolaczowska, E., Kubes, P., Leppkes, M., Mahajan, A., Manfredi, A. A., ... Herrmann, M. (2021). Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell death and differentiation*, 28(11), 3125–3139. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00805-z>
 10. Page, L. K., Staples, K. J., Spalluto, C. M., Watson, A., & Wilkinson, T. M. A. (2021). Influence of Hypoxia on the Epithelial-Pathogen Interactions in the Lung: Implications for Respiratory Disease. *Frontiers in immunology*, 12, 653969. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653969>
 11. Jahani, M., Dokaneheifard, S., & Mansouri, K. (2020). Hypoxia: A key feature of COVID-19 launching activation of HIF-1 and cytokine storm. *Journal of inflammation (London, England)*, 17, 33. <https://doi.org/10.1186/s12950-020-00263-3>
 12. Cao X. (2020). COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nature reviews. Immunology*, 20(5), 269–270. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0308-3>

13. Dubrovskiy, E. I., & Dons'koi, B. V. (2020). Dynamics of COVID-19 specific g-class immunoglobulins levels in patients after the recovery. *Likars'ka Sprava*, (3-4), 3-8. [https://doi.org/10.31640/JVD.3-4.2020\(1\)](https://doi.org/10.31640/JVD.3-4.2020(1))
14. Dubrovskiy, E. I., & Dons'koi, B. V. (2021). The duration and specificity of the humoral immune response to SARS-CoV-2. *Likars'ka Sprava*, (3-4), 10-16. [https://doi.org/10.31640/JVD.3-4.2021\(2\)](https://doi.org/10.31640/JVD.3-4.2021(2))
15. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004 Jun;203(2):631-7. doi: 10.1002/path.1570. PMID: 15141377; PMCID: PMC7167720.
16. Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., Slutsky, A. S., ... Penninger, J. M. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nature medicine*, 11(8), 875–879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>
17. Zhang, Y. H., Zhang, Y. H., Dong, X. F., Hao, Q. Q., Zhou, X. M., Yu, Q. T., Li, S. Y., Chen, X., Tengbeh, A. F., Dong, B., & Zhang, Y. (2015). ACE2 and Ang-(1-7) protect endothelial cell function and prevent early atherosclerosis by inhibiting inflammatory response. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 64(3-4), 253–260. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0805-1>
18. Bourgonje, A. R., Abdulle, A. E., Timens, W., Hillebrands, J. L., Navis, G. J., Gordijn, S. J., Bolling, M. C., Dijkstra, G., Voors, A. A., Osterhaus, A. D., van der Voort, P. H., Mulder, D. J., & van Goor, H. (2020). Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *The Journal of pathology*, 251(3), 228–248. <https://doi.org/10.1002/path.5471>

19. Fraga-Silva, R. A., Sorg, B. S., Wankhede, M., Dedeugd, C., Jun, J. Y., Baker, M. B., Li, Y., Castellano, R. K., Katovich, M. J., Raizada, M. K., & Ferreira, A. J. (2010). ACE2 activation promotes antithrombotic activity. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 16(5-6), 210–215. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00160>
20. Chen, Y., & Li, L. (2020). SARS-CoV-2: virus dynamics and host response. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(5), 515–516. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30235-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30235-8)
21. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
22. Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F. S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet. Respiratory medicine*, 8(4), 420–422. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
23. Zhang, B., Zhou, X., Zhu, C., Song, Y., Feng, F., Qiu, Y., Feng, J., Jia, Q., Song, Q., Zhu, B., & Wang, J. (2020). Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 157. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00157>
24. Bian, X. W., & COVID-19 Pathology Team (2020). Autopsy of COVID-19 patients in China. *National science review*, 7(9), 1414–1418. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa123>
25. Cavalcante-Silva, L. H. A., Carvalho, D. C. M., Lima, É. A., Galvão, J. G. F. M., da Silva, J. S. F., Sales-Neto, J. M., & Rodrigues-Mascarenhas, S.

- (2021). Neutrophils and COVID-19: The road so far. *International immunopharmacology*, 90, 107233. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107233>
26. Thiam, H. R., Wong, S. L., Wagner, D. D., & Waterman, C. M. (2020). Cellular Mechanisms of NETosis. *Annual review of cell and developmental biology*, 36, 191–218. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>
27. Tan, C., Aziz, M., & Wang, P. (2021). The vitals of NETs. *Journal of leukocyte biology*, 110(4), 797–808. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU0620-375R>
28. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
29. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of cell biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>
30. Yipp, B. G., & Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it?. *Blood*, 122(16), 2784–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>
31. Papayannopoulos V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature reviews. Immunology*, 18(2), 134–147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>
32. Schönrich, G., Raftery, M. J., & Samstag, Y. (2020). Devilishly radical NETwork in COVID-19: Oxidative stress, neutrophil extracellular traps (NETs), and T cell suppression. *Advances in biological regulation*, 77, 100741. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2020.100741>
33. Gupta, S., & Kaplan, M. J. (2016). The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nature reviews. Nephrology*, 12(7), 402–413. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.71>

34. Sørensen, O. E., & Borregaard, N. (2016). Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 126(5), 1612–1620. <https://doi.org/10.1172/JCI84538>
35. Song, C., Li, H., Li, Y., Dai, M., Zhang, L., Liu, S., Tan, H., Deng, P., Liu, J., Mao, Z., Li, Q., Su, X., Long, Y., Lin, F., Zeng, Y., Fan, Y., Luo, B., Hu, C., & Pan, P. (2019). NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization. *Experimental cell research*, 382(2), 111486. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.031>
36. Mikacenic, C., Moore, R., Dmyterko, V., West, T. E., Altemeier, W. A., Liles, W. C., & Lood, C. (2018). Neutrophil extracellular traps (NETs) are increased in the alveolar spaces of patients with ventilator-associated pneumonia. *Critical care (London, England)*, 22(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2290-8>
37. Ebrahimi, F., Giaglis, S., Hahn, S., Blum, C. A., Baumgartner, C., Kutz, A., van Breda, S. V., Mueller, B., Schuetz, P., Christ-Crain, M., & Hasler, P. (2018). Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial. *The European respiratory journal*, 51(4), 1701389. <https://doi.org/10.1183/13993003.01389-2017>
38. Li, H., Zhou, X., Tan, H., Hu, Y., Zhang, L., Liu, S., Dai, M., Li, Y., Li, Q., Mao, Z., Pan, P., Su, X., & Hu, C. (2017). Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS. *Oncotarget*, 9(2), 1772–1784. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22744>
39. Lefrançois, E., Mallavia, B., Zhuo, H., Calfee, C. S., & Looney, M. R. (2018). Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI insight*, 3(3), e98178. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98178>
40. Saand, A. R., Flores, M., Kewan, T., Alqaisi, S., Alwakeel, M., Griffiths, L., Wang, X., Han, X., Burton, R., Al-Jaghbeer, M. J., & Abi Fadel, F.

- (2021). Does inpatient hyperglycemia predict a worse outcome in COVID-19 intensive care unit patients?. *Journal of diabetes*, 13(3), 253–260. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.13137>
41. Azevedo, R. B., Botelho, B. G., Hollanda, J. V. G., Ferreira, L. V. L., Junqueira de Andrade, L. Z., Oei, S. S. M. L., Mello, T. S., & Muxfeldt, E. S. (2021). Covid-19 and the cardiovascular system: a comprehensive review. *Journal of human hypertension*, 35(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-0387-4>
42. Wong, S. L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A. B., Kahn, C. R., & Wagner, D. D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature medicine*, 21(7), 815–819. <https://doi.org/10.1038/nm.3887>
43. Rashedi, J., Mahdavi Poor, B., Asgharzadeh, V., Pourostadi, M., Samadi Kafil, H., Vegari, A., Tayebi-Khosroshahi, H., & Asgharzadeh, M. (2020). Risk Factors for COVID-19. *Le infezioni in medicina*, 28(4), 469–474.
44. Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J. S., Friday, S., Li, S., Patel, R. M., Subramanian, V., Thompson, P., Chen, P., Fox, D. A., Pennathur, S., & Kaplan, M. J. (2013). NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Science translational medicine*, 5(178), 178ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
45. Veras, F. P., Pontelli, M. C., Silva, C. M., Toller-Kawahisa, J. E., de Lima, M., Nascimento, D. C., Schneider, A. H., Caetité, D., Tavares, L. A., Paiva, I. M., Rosales, R., Colón, D., Martins, R., Castro, I. A., Almeida, G. M., Lopes, M. I. F., Benatti, M. N., Bonjorno, L. P., Giannini, M. C., Luppino-Assad, R., ... Cunha, F. Q. (2020). SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *The Journal of experimental medicine*, 217(12), e20201129. <https://doi.org/10.1084/jem.20201129>

46. Zuo, Y., Yalavarthi, S., Shi, H., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Blair, C., Weber, A., Barnes, B. J., Egeblad, M., Woods, R. J., Kanthi, Y., & Knight, J. S. (2020). Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI insight*, 5(11), e138999. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>
47. Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer biology & therapy*, 20(8), 1057–1067. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759> Khier S, Lohan L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Future Sci OA*. 2018 Feb 23;4(4):FSO295. doi: 10.4155/foa-2017-0140. PMID: 29682327; PMCID: PMC5905581
48. Xu, Y., Song, Y., Chang, J., Zhou, X., Qi, Q., Tian, X., Li, M., Zeng, X., Xu, M., Zhang, W., Cram, D. S., & Liu, J. (2018). High levels of circulating cell-free DNA are a biomarker of active SLE. *European journal of clinical investigation*, 48(11), e13015. <https://doi.org/10.1111/eci.13015>
49. De Vlaminc, I., Valantine, H. A., Snyder, T. M., Strehl, C., Cohen, G., Luikart, H., Neff, N. F., Okamoto, J., Bernstein, D., Weisshaar, D., Quake, S. R., & Khush, K. K. (2014). Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Science translational medicine*, 6(241), 241ra77. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007803>
50. Gould, T. J., Vu, T. T., Stafford, A. R., Dwivedi, D. J., Kim, P. Y., Fox-Robichaud, A. E., Weitz, J. I., & Liaw, P. C. (2015). Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(12), 2544–2553. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306035>
51. Hellman, U., Karlsson, M. G., Engström-Laurent, A., Cajander, S., Dorofte, L., Ahlm, C., Laurent, C., & Blomberg, A. (2020). Presence of hyaluronan in lung alveoli in severe Covid-19: An opening for new treatment options?. *The Journal of biological chemistry*, 295(45), 15418–15422. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.015967>

52. Weinbaum, S., Tarbell, J. M., & Damiano, E. R. (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual review of biomedical engineering*, 9, 121–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959>
53. Zubieta-Calleja, G. R., Zubieta-DeUrioste, N., de Jesús Montelongo, F., Sanchez, M. G. R., Campoverdi, A. F., Rocco, P. R. M., Battaglini, D., Ball, L., & Pelosi, P. (2023). Morphological and functional findings in COVID-19 lung disease as compared to Pneumonia, ARDS, and High-Altitude Pulmonary Edema. *Respiratory physiology & neurobiology*, 309, 104000. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2022.104000>
54. Soldati, G., & Demi, M. (2022). What Is COVID 19 Teaching Us about Pulmonary Ultrasound?. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(4), 838. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12040838>
55. Tavianatou, A. G., Piperigkou, Z., Barbera, C., Beninato, R., Masola, V., Caon, I., Onisto, M., Franchi, M., Galesso, D., & Karamanos, N. K. (2019). Molecular size-dependent specificity of hyaluronan on functional properties, morphology and matrix composition of mammary cancer cells. *Matrix biology plus*, 3, 100008. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2019.100008>
56. Ushiyama, A., Kataoka, H., & Iijima, T. (2016). Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologies. *Journal of intensive care*, 4(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40560-016-0182-z>
57. Parnigoni, A., Caon, I., Moretto, P., Viola, M., Karousou, E., Passi, A., & Vigetti, D. (2021). The role of the multifaceted long non-coding RNAs: A nuclear-cytosolic interplay to regulate hyaluronan metabolism. *Matrix biology plus*, 11, 100060. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2021.100060>
58. Reeves, S. R., Barrow, K. A., Rich, L. M., White, M. P., Shubin, N. J., Chan, C. K., Kang, I., Ziegler, S. F., Piliponsky, A. M., Wight, T. N., & Debley, J. S. (2020). Respiratory Syncytial Virus Infection of Human Lung Fibroblasts Induces a Hyaluronan-Enriched Extracellular Matrix That Binds

- Mast Cells and Enhances Expression of Mast Cell Proteases. *Frontiers in immunology*, 10, 3159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03159>
59. Petrey, A. C., & de la Motte, C. A. (2014). Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Frontiers in immunology*, 5, 101. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00101>
60. Lennon, F. E., & Singleton, P. A. (2011). Hyaluronan regulation of vascular integrity. *American journal of cardiovascular disease*, 1(3), 200–213.
61. Genasetti, A., Vigetti, D., Viola, M., Karousou, E., Moretto, P., Rizzi, M., Bartolini, B., Clerici, M., Pallotti, F., De Luca, G., & Passi, A. (2008). Hyaluronan and human endothelial cell behavior. *Connective tissue research*, 49(3), 120–123. <https://doi.org/10.1080/03008200802148462>
62. Viola, M., Vigetti, D., Karousou, E., D'Angelo, M. L., Caon, I., Moretto, P., De Luca, G., & Passi, A. (2015). Biology and biotechnology of hyaluronan. *Glycoconjugate journal*, 32(3-4), 93–103. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9586-6>
63. Lin, C. Y., Kolliopoulos, C., Huang, C. H., Tenhunen, J., Heldin, C. H., Chen, Y. H., & Heldin, P. (2019). High levels of serum hyaluronan is an early predictor of dengue warning signs and perturbs vascular integrity. *EBioMedicine*, 48, 425–441. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.09.014>
64. Papakonstantinou, E., Bonovolias, I., Roth, M., Tamm, M., Schumann, D., Baty, F., Louis, R., Milenkovic, B., Boersma, W., Stieltjes, B., Kostikas, K., Blasi, F., Aerts, J. G., Rohde, G. G. U., Lacoma, A., Torres, A., Welte, T., & Stolz, D. (2019). Serum levels of hyaluronic acid are associated with COPD severity and predict survival. *The European respiratory journal*, 53(3), 1801183. <https://doi.org/10.1183/13993003.01183-2018>
65. Moretto, P., Karousou, E., Viola, M., Caon, I., D'Angelo, M. L., De Luca, G., Passi, A., & Vigetti, D. (2015). Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes. *Journal of diabetes research*, 2015, 167283. <https://doi.org/10.1155/2015/167283>

66. Zhao, F., Barber, C. J., Sammani, S., Wan, L., Miller, B. W., Furenlid, L. R., Li, Z., Gotur, D. B., Barrios, R., Woolfenden, J. M., Martin, D. R., & Liu, Z. (2022). Use of radiolabeled hyaluronic acid for preclinical assessment of inflammatory injury and acute respiratory distress syndrome. *Nuclear medicine and biology*, 114-115, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2022.10.002>
67. Ontong, P., & Prachayasittikul, V. (2021). Unraveled roles of hyaluronan in severe COVID-19. *EXCLI journal*, 20, 117–125. <https://doi.org/10.17179/excli2020-3215>
68. Queisser, K. A., Mellema, R. A., Middleton, E. A., Portier, I., Manne, B. K., Denorme, F., Beswick, E. J., Rondina, M. T., Campbell, R. A., & Petrey, A. C. (2021). COVID-19 generates hyaluronan fragments that directly induce endothelial barrier dysfunction. *JCI Insight*, 6(17), e147472. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.147472>
69. Chao, H., & Spicer, A. P. (2005). Natural antisense mRNAs to hyaluronan synthase 2 inhibit hyaluronan biosynthesis and cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*, 280(30), 27513–27522. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411544200>
70. Kolliopoulos, C., Lin, C. Y., Heldin, C. H., Moustakas, A., & Heldin, P. (2019). Has2 natural antisense RNA and Hmga2 promote Has2 expression during TGF β -induced EMT in breast cancer. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 80, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.09.002>
71. Vigetti, D., Deleonibus, S., Moretto, P., Bowen, T., Fischer, J. W., Grandoch, M., Oberhuber, A., Love, D. C., Hanover, J. A., Cinquetti, R., Karousou, E., Viola, M., D'Angelo, M. L., Hascall, V. C., De Luca, G., & Passi, A. (2014). Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS2-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation. *The Journal of biological chemistry*, 289(42), 28816–28826. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597401>

72. Caon, I., Bartolini, B., Moretto, P., Parnigoni, A., Caravà, E., Vitale, D. L., Alaniz, L., Viola, M., Karousou, E., De Luca, G., Hascall, V. C., Passi, A., & Vigetti, D. (2020). Sirtuin 1 reduces hyaluronan synthase 2 expression by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B and expression of the long-noncoding RNA HAS2-AS1. *The Journal of biological chemistry*, 295(11), 3485–3496. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011982>
73. Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., Jr, Kubalak, S., Klewer, S. E., & McDonald, J. A. (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *The Journal of clinical investigation*, 106(3), 349–360. <https://doi.org/10.1172/JCI10272>
74. Vitale, D. L., Parnigoni, A., Viola, M., Karousou, E., Sevic, I., Moretto, P., Passi, A., Alaniz, L., & Vigetti, D. (2024). Deciphering Drug Resistance: Investigating the Emerging Role of Hyaluronan Metabolism and Signaling and Tumor Extracellular Matrix in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7607. <https://doi.org/10.3390/ijms25147607>
75. Csoka, A. B., Frost, G. I., & Stern, R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 20(8), 499–508. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(01\)00172-x](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(01)00172-x)
76. Donlan, A.N., Sutherland, T.E., Marie, C., Preissner, S., Bradley, B.T., Carpenter, R.M., Sturek, J.M., Ma, J.Z., Moreau, G.B., Donowitz, J.R., Buck, G.A., Serrano, M.G., Burgess, S.L., Abhyankar, M.M., Mura, C., Bourne, P.E., Preissner, R., Young, M.K., Lyons, G.R., Loomba, J.J., Ratcliffe, S.J., Poulter, M.D., Mathers, A.J., Day, A.J., Mann, B.J., Allen, J.E., Petri, W.A. 2021. IL-13 is a driver of COVID-19 severity. *JCI Insight*, 6(15), e150107.

77. Song, C., Chai, Q., Danielsen, C., Hjorth, P., Nyengaard, J.R., Ledet, T., Yamaguchi, Y., Rasmussen, L., Wogensen, L. 2005. Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis. *Circulation Research*, 96(5), 583-591.
78. Zhao, Z., Liang, T., & Feng, S. (2019). Silencing of HAS2-AS1 mediates PI3K/AKT signaling pathway to inhibit cell proliferation, migration, and invasion in glioma. *Journal of cellular biochemistry*, 120(7), 11510–11516. <https://doi.org/10.1002/jcb.28430>
79. Vigetti, D., Rizzi, M., Viola, M., Karousou, E., Genasetti, A., Clerici, M., Bartolini, B., Hascall, V. C., De Luca, G., & Passi, A. (2009). The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells. *Glycobiology*, 19(5), 537–546. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp022>
80. McKallip, R. J., Ban, H., & Uchakina, O. N. (2015). Treatment with the hyaluronic Acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone suppresses LPS-induced lung inflammation. *Inflammation*, 38(3), 1250–1259. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0092-y>
81. Yang, S., Tong, Y., Chen, L., & Yu, W. (2022). Human Identical Sequences, hyaluronan, and hymecromone — the new mechanism and management of COVID-19. *Molecular biomedicine*, 3(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00077-0>
82. Tian, M., Liu, W., Li, X., Zhao, P., Shereen, M. A., Zhu, C., Huang, S., Liu, S., Yu, X., Yue, M., Pan, P., Wang, W., Li, Y., Chen, X., Wu, K., Luo, Z., Zhang, Q., & Wu, J. (2021). HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 308. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00726-w>
83. Singleton, P. A., & Lennon, F. E. (2011). Acute Lung Injury Regulation by Hyaluronan. *Journal of allergy & therapy*, Suppl 4, 10.4172/2155-6121.S4-003. <https://doi.org/10.4172/2155-6121.S4-003>

84. Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J., & Suttorp, N. (2010). Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 181(12), 1294–1309. <https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1427SO>
85. Sarkar, M., Niranjana, N., & Banyal, P. K. (2017). Mechanisms of hypoxemia. *Lung India : official organ of Indian Chest Society*, 34(1), 47–60. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.197116>
86. Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38(4), 633–643. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>
87. Bartels, K., Grenz, A., & Eltzschig, H. K. (2013). Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46), 18351–18352. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318345110>
88. Wiesener, M. S., Jürgensen, J. S., Rosenberger, C., Scholze, C. K., Hörstrup, J. H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U. A., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Bachmann, S., Maxwell, P. H., & Eckardt, K. U. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(2), 271–273. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0445fje>
89. Bartoszewska, S., Kochan, K., Piotrowski, A., Kamysz, W., Ochocka, R. J., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2015). The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 α expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(4), 1467–1479. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267054>
90. Heikkilä, M., Pasanen, A., Kivirikko, K. I., & Myllyharju, J. (2011). Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia

- response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68(23), 3885–3901.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0679-5>
91. Ren, L., Zhang, W., Han, P., Zhang, J., Zhu, Y., Meng, X., Zhang, J., Hu, Y., Yi, Z., & Wang, R. (2019). Influenza A virus (H1N1) triggers a hypoxic response by stabilizing hypoxia-inducible factor-1 α via inhibition of proteasome. *Virology*, 530, 51–58.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.010>
92. Ripoli, M., D'Aprile, A., Quarato, G., Sarasin-Filipowicz, M., Gouttenoire, J., Scrima, R., Cela, O., Boffoli, D., Heim, M. H., Moradpour, D., Capitanio, N., & Piccoli, C. (2010). Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation. *Journal of virology*, 84(1), 647–660. <https://doi.org/10.1128/JVI.00769-09>
93. Santos, S. A. D., & Andrade, D. R., Júnior (2017). HIF-1alpha and infectious diseases: a new frontier for the development of new therapies. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59, e92.
<https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759092>
94. Kondo, S., Seo, S. Y., Yoshizaki, T., Wakisaka, N., Furukawa, M., Joab, I., Jang, K. L., & Pagano, J. S. (2006). EBV latent membrane protein 1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha through Siah1-mediated down-regulation of prolyl hydroxylases 1 and 3 in nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer research*, 66(20), 9870–9877. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1679>
95. Nizet, V., & Johnson, R. S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 9(9), 609–617.
<https://doi.org/10.1038/nri2607>
96. McGettrick, A. F., & O'Neill, L. A. J. (2020). The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell metabolism*, 32(4), 524–536.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.08.002>

97. Cichon, I., Ortmann, W., & Kolaczowska, E. (2021). Metabolic Pathways Involved in Formation of Spontaneous and Lipopolysaccharide-Induced Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Differ in Obesity and Systemic Inflammation. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7718. <https://doi.org/10.3390/ijms22147718>
98. Keith, B., Johnson, R. S., & Simon, M. C. (2011). HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature reviews. Cancer*, 12(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc3183>
99. Aprelikova, O., Chandramouli, G. V., Wood, M., Vasselli, J. R., Riss, J., Maranchie, J. K., Linehan, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *Journal of cellular biochemistry*, 92(3), 491–501. <https://doi.org/10.1002/jcb.20067>
100. Li, Q. F., Wang, X. R., Yang, Y. W., & Lin, H. (2006). Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 α . *Cell research*, 16(6), 548–558. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310072>
101. Heidbreder, M., Fröhlich, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Qadri, F., & Dominiak, P. (2003). Hypoxia rapidly activates HIF-3 α mRNA expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(11), 1541–1543. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0963fje>
102. Heidbreder, M., Qadri, F., Jöhren, O., Dendorfer, A., Depping, R., Fröhlich, F., Wagner, K. F., & Dominiak, P. (2007). Non-hypoxic induction of HIF-3 α by 2-deoxy-D-glucose and insulin. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(2), 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.027>
103. Ramakrishnan, S. K., & Shah, Y. M. (2017). A central role for hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α in hepatic glucose homeostasis. *Nutrition and healthy aging*, 4(3), 207–216. <https://doi.org/10.3233/NHA-170022>

104. Carroll, V. A., & Ashcroft, M. (2006). Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer research*, 66(12), 6264–6270. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2519>
105. Gao, W., Ferguson, G., Connell, P., Walshe, T., Murphy, R., Birney, Y. A., O'Brien, C., & Cahill, P. A. (2007). High glucose concentrations alter hypoxia-induced control of vascular smooth muscle cell growth via a HIF-1alpha-dependent pathway. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(3), 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.12.006>
106. Rossignol, F., de Laplanche, E., Mounier, R., Bonnefont, J., Cayre, A., Godinot, C., Simonnet, H., & Clottes, E. (2004). Natural antisense transcripts of HIF-1alpha are conserved in rodents. *Gene*, 339, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.06.029>
107. Sutherland R. M. (1998). Tumor hypoxia and gene expression--implications for malignant progression and therapy. *Acta oncologica* (Stockholm, Sweden), 37(6), 567–574. <https://doi.org/10.1080/028418698430278>
108. Wheaton, W. W., & Chandel, N. S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(3), C385–C393. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>
109. Zheng, F., Chen, J., Zhang, X., Wang, Z., Chen, J., Lin, X., Huang, H., Fu, W., Liang, J., Wu, W., Li, B., Yao, H., Hu, H., & Song, E. (2021). The HIF-1 α antisense long non-coding RNA drives a positive feedback loop of HIF-1 α mediated transactivation and glycolysis. *Nature communications*, 12(1), 1341. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21535-3>
110. Thrash-Bingham, C. A., & Tartof, K. D. (1999). aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *Journal*

- of the National Cancer Institute, 91(2), 143–151.
<https://doi.org/10.1093/jnci/91.2.143>
111. Baranello, L., Bertozzi, D., Fogli, M. V., Pommier, Y., & Capranico, G. (2010). DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1 α gene locus. *Nucleic acids research*, 38(1), 159–171. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp817>
112. Bertozzi, D., Iurlaro, R., Sordet, O., Marinello, J., Zaffaroni, N., & Capranico, G. (2011). Characterization of novel antisense HIF-1 α transcripts in human cancers. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 10(18), 3189–3197. <https://doi.org/10.4161/cc.10.18.17183>
113. Chen, D., Wu, L., Liu, L., Gong, Q., Zheng, J., Peng, C., & Deng, J. (2017). Comparison of HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2 in regulating HIF-1 α and the osteogenic differentiation of PDLCs under hypoxia. *International journal of molecular medicine*, 40(5), 1529–1536. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3138>
114. Zhao, Y., Feng, G., Wang, Y., Yue, Y., & Zhao, W. (2014). Regulation of apoptosis by long non-coding RNA HIF1A-AS1 in VSMCs: implications for TAA pathogenesis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(11), 7643–7652
115. Gong, W., Tian, M., Qiu, H., & Yang, Z. (2017). Elevated serum level of lncRNA-HIF1A-AS1 as a novel diagnostic predictor for worse prognosis in colorectal carcinoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 20(4), 417–424. <https://doi.org/10.3233/CBM-170179>
116. Wu, Y., Ding, J., Sun, Q., Zhou, K., Zhang, W., Du, Q., Xu, T., & Xu, W. (2018). Long noncoding RNA hypoxia-inducible factor 1 alpha-antisense RNA 1 promotes tumor necrosis factor- α -induced apoptosis through caspase 3 in Kupffer cells. *Medicine*, 97(4), e9483. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009483>

117. Wang, S., Zhang, X., Yuan, Y., Tan, M., Zhang, L., Xue, X., Yan, Y., Han, L., & Xu, Z. (2015). BRG1 expression is increased in thoracic aortic aneurysms and regulates proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the long non-coding RNA HIF1A-AS1 in vitro. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 47(3), 439–446. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu215>
118. <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000201/criteria#referencePop85>
119. Karampoor, S., Hesamizadeh, K., Maleki, F., Farahmand, M., Zahednasab, H., Mirzaei, R., Banoun, H., Zamani, F., Hajibaba, M., Tabibzadeh, A., Bouzari, B., Bastani, M. N., Laali, A., & Keyvani, H. (2021). A possible pathogenic correlation between neutrophil elastase (NE) enzyme and inflammation in the pathogenesis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *International immunopharmacology*, 100, 108137. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108137>
120. Shrivastava, S., Chelluboina, S., Jedge, P., Doke, P., Palkar, S., Mishra, A. C., & Arankalle, V. A. (2021). Elevated Levels of Neutrophil Activated Proteins, Alpha-Defensins (DEFA1), Calprotectin (S100A8/A9) and Myeloperoxidase (MPO) Are Associated With Disease Severity in COVID-19 Patients. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 751232. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.751232>
121. Li, Y., Cui, X., Zhu, N., Lin, Y., & Li, X. (2024). Elevated hyaluronic acid levels in severe SARS-CoV-2 infection in the post-COVID-19 era. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 14, 1338508. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1338508>
122. Mangalmurti, N., & Hunter, C. A. (2020). Cytokine storms: Understanding COVID-19. *Immunity*, 53(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.017>

123. Couper, K. N., Blount, D. G., & Riley, E. M. (2008). IL-10: The master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*, 180(9), 5771–5777. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771>
124. Ayres, J. S. (2020). The biology of physiological health. *Cell*, 181(2), 250–269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.036>
125. Channappanavar, R., & Perlman, S. (2017). Pathogenic human coronavirus infections: Causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Seminars in Immunopathology*, 39(5), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
126. Arunachalam, P. S., Wimmers, F., Mok, C. K. P., et al. (2020). Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science*, 369(6508), 1210–1220. <https://doi.org/10.1126/science.abc6261>
127. Чоп'як, В., Ліщук-Якимович, Х., & Пукаляк, Р. (2020). IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF COVID-2019: REALITIES AND PROSPECTS. *Immunology and Allergology: Science and Practice*, (3-4), 34-41. <https://doi.org/10.37321/immunology.2020.3-4-04>
128. Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., et al. (2020). Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(6), 842–844. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0901-9>
129. Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., et al. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*, 369(6504), 718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
130. Dunning, J., Blankley, S., Hoang, L. T., et al. (2018). Progression of whole-blood transcriptional signatures from interferon-induced to neutrophil-associated patterns in severe influenza. *Nature Immunology*, 19(6), 625–635. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0111-5>
131. CDC COVID-19 Response Team. Preliminary Estimates of the Prevalence of Selected Underlying Health Conditions Among Patients with Coronavirus Disease 2019 - United States, February 12-March 28, 2020. *MMWR Morb*

- Mortal Wkly Rep. 2020;69(13):382-386. Published 2020 Apr 3.
doi:10.15585/mmwr.mm6913e2
132. Janiuk, K., Jabłońska, E., & Garley, M. (2021). Significance of NETs Formation in COVID-19. *Cells*, 10(1), 151. <https://doi.org/10.3390/cells10010151>
133. Narasaraju, T., Tang, B. M., Herrmann, M., Muller, S., Chow, V. T. K., & Radic, M. (2020). Neutrophilia and NETopathy as Key Pathologic Drivers of Progressive Lung Impairment in Patients With COVID-19. *Frontiers in pharmacology*, 11, 870. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00870>
134. Zhu, Y., Chen, X., & Liu, X. (2022). NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19: Immunothrombosis and Beyond. *Frontiers in immunology*, 13, 838011. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.838011>
135. Ponti, G., et al. (2020). Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 57(6), 389–399. <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1770685>
136. Rettew, A., et al. (2024). COVID-19 Coagulopathy. *Life (Basel, Switzerland)*, 14(8), 953. <https://doi.org/10.3390/life14080953>
137. Chen, Z., et al. (2021). The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 653228. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.653228>
138. Liaw, P. C., et al. (2016). DAMP and DIC: The role of extracellular DNA and DNA-binding proteins in the pathogenesis of DIC. *Blood reviews*, 30(4), 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.12.004>
139. Liu, B. (2020). Free DNA, a reason for severe COVID-19 infection? *Medical hypotheses*, 142, 109812. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109812>
140. Hammad, R., et al. (2021). Circulating cell-free DNA, peripheral lymphocyte subsets alterations and neutrophil lymphocyte ratio in

- assessment of COVID-19 severity. *Innate immunity*, 27(3), 240–250.
<https://doi.org/10.1177/1753425921995577>
141. Ng, H., et al. (2021). Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Traps Are of Prognostic Value in Patients With COVID-19. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 41(2), 988–994.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315267>
142. Andargie, T. E., et al. (2021). Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury. *JCI insight*, 6(7), e147610.
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.147610>
143. Huckriede, J., et al. (2021). Evolution of NETosis markers and DAMPs have prognostic value in critically ill COVID-19 patients. *Scientific reports*, 11(1), 15701. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95209-x>
144. Stawski, R., Nowak, D., & Perdas, E. (2022). Cell-Free DNA: Potential Application in COVID-19 Diagnostics and Management. *Viruses*, 14(2), 321. <https://doi.org/10.3390/v14020321>
145. Pfortmueller, C. A., Spinetti, T., Urman, R. D., Luedi, M. M., & Schefold, J. C. (2021). COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome (CARDS): Current knowledge on pathophysiology and ICU treatment - A narrative review. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*, 35(3), 351–368. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2020.12.011>
146. Yuan, S., Jiang, S. C., Zhang, Z. W., Fu, Y. F., Hu, J., & Li, Z. L. (2021). The Role of Alveolar Edema in COVID-19. *Cells*, 10(8), 1897.
<https://doi.org/10.3390/cells10081897>
147. Cozzi, D., Cavigli, E., Moroni, C., Smorchkova, O., Zantonelli, G., Pradella, S., & Miele, V. (2021). Ground-glass opacity (GGO): a review of the differential diagnosis in the era of COVID-19. *Japanese journal of radiology*, 39(8), 721–732. <https://doi.org/10.1007/s11604-021-01120-w>
148. Nagaoka, K., Kawasuji, H., Takegoshi, Y., Murai, Y., Kaneda, M., Ueno, A., Miyajima, Y., Wakasugi, M., Noguchi, K., Morimoto, S., Morinaga, Y., & Yamamoto, Y. (2023). Association of subpleural ground-glass opacities

- with respiratory failure and RNAemia in COVID-19. *European radiology*, 33(7), 4713–4722. <https://doi.org/10.1007/s00330-023-09427-0>
149. Parekh, M., Donuru, A., Balasubramanya, R., & Kapur, S. (2020). Review of the Chest CT Differential Diagnosis of Ground-Glass Opacities in the COVID Era. *Radiology*, 297(3), E289–E302. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020202504>
150. Niang, I., Fall, M. C., Diouf, J. C. N., Thiam, M., Diallo, I., Faye, I., & Ba, S. (2020). False ground-glass opacity and suspicion of COVID-19, beware of the technique for performing the CT. *The Pan African medical journal*, 35(Suppl 2), 138. <https://doi.org/10.11604/pamj.suppl.2020.35.138.25353>
151. Andonegui-Elguera, S., Taniguchi-Ponciano, K., Gonzalez-Bonilla, C. R., Torres, J., Mayani, H., Herrera, L. A., Peña-Martínez, E., Silva-Román, G., Vela-Patiño, S., Ferreira-Hermosillo, A., Ramirez-Renteria, C., Carvente-Garcia, R., Mata-Lozano, C., Marrero-Rodríguez, D., & Mercado, M. (2020). Molecular Alterations Prompted by SARS-CoV-2 Infection: Induction of Hyaluronan, Glycosaminoglycan and Mucopolysaccharide Metabolism. *Archives of medical research*, 51(7), 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.06.011>
152. Ni, W., Yang, X., Yang, D., Bao, J., Li, R., Xiao, Y., Hou, C., Wang, H., Liu, J., Yang, D., Xu, Y., Cao, Z., & Gao, Z. (2020). Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Critical care (London, England)*, 24(1), 422. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03120-0>
153. Duan, Z., Zhang, J., Chen, X., Liu, M., Zhao, H., Jin, L., Zhang, Z., Luan, N., Meng, P., Wang, J., Tan, Z., Li, Y., Deng, G., & Lai, R. (2022). Role of LL-37 in thrombotic complications in patients with COVID-19. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 79(6), 309. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04309-y>
154. Borrmann M, Brandes F, Kirchner B, Klein M, Billaud JN, Reithmair M, Rehm Schelling G, Pfaffl M, Meidert AS. (2023). Extensive blood transcriptome analysis reveals cellular signaling networks activated by

- circulating glycoalyx components reflecting vascular injury in COVID-19. *Front Immun.* 14, 1129766. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1129766>
155. Ding M, Zhang Q, Li Q, Wu T, Huang Y. (2020). Correlation analysis of the severity and clinical prognosis of 32 cases of patients with COVID-19. *Respir Med.* 167, 105981. <https://doi.org/10.1016%2Fj.rmed.2020.105981>
156. Huang JJ, Wang CW, Liu Y, Zhang YY, Yang NB, Yu YC, Jiang Q, Song QF, Qian GQ. (2023). Role of the extracellular matrix in COVID-19. *World J Clinic Cases.* 11(1), 73. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i1.73>
157. Hellman, U., Rosendal, E., Lehrstrand, J., Henriksson, J., Björsell, T., Wennemo, A., Hahn, M., Österberg, B., Dorofte, L., Nilsson, E., Forsell, M. N. E., Smed-Sörensen, A., Lange, A., Karlsson, M. G., Ahlm, C., Blomberg, A., Cajander, S., Ahlgren, U., Lind, A., Normark, J., ... Lenman, A. (2024). SARS-CoV-2 infection induces hyaluronan production in vitro and hyaluronan levels in COVID-19 patients relate to morbidity and long-term lung impairment: a prospective cohort study. *mBio*, 15(10), e0130324. <https://doi.org/10.1128/mbio.01303-24>
158. Kultti, A., Pasonen-Seppänen, S., Jauhiainen, M., Rilla, K. J., Kärnä, R., Pyöriä, E., Tammi, R. H., & Tammi, M. I. (2009). 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Experimental cell research*, 315(11), 1914–1923. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.002>
159. Rosser, J. I., Nagy, N., Goel, R., Kaber, G., Demirdjian, S., Saxena, J., Bollyky, J. B., Frymoyer, A. R., Pacheco-Navarro, A. E., Burgener, E. B., Rajadas, J., Wang, Z., Arbach, O., Dunn, C. E., Kalinowski, A., Milla, C. E., & Bollyky, P. L. (2022). Oral hymecromone decreases hyaluronan in human study participants. *The Journal of clinical investigation*, 132(9), e157983. <https://doi.org/10.1172/JCI157983>
160. Yang, S., Ling, Y., Zhao, F., Li, W., Song, Z., Wang, L., Li, Q., Liu, M., Tong, Y., Chen, L., Ru, D., Zhang, T., Zhou, K., Zhang, B., Xu, P., Yang, Z., Li, W., Song, Y., Xu, J., Zhu, T., ... Lu, H. (2022). Hymecromone: a

- clinical prescription hyaluronan inhibitor for efficiently blocking COVID-19 progression. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 91. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00952-w>
161. Semenza G. L. (2019). Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 59, 379–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021637>
162. Shakhovska, N., Yakovyna, V., & Chopyak, V. (2022). A new hybrid ensemble machine-learning model for severity risk assessment and post-COVID prediction system. *Mathematical biosciences and engineering : MBE*, 19(6), 6102–6123. <https://doi.org/10.3934/mbe.2022285>
163. Petakh, Pavlo, Loshak, K., & Kamyshnyi, Oleksandr. (2023). Hematological features of patients with type 2 diabetes depending on the variant of SARS-COV-2. *Fiziolohichnyi zhurnal*, 69, 35-42. <https://doi.org/10.15407/fz69.01.035>
164. Semenza, G. L. (2011). Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 76, 347–353. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010678>
165. Simon, L. M., Robin, E. D., Raffin, T., Theodore, J., & Douglas, W. H. (1978). Bioenergetic pattern of isolated type II pneumocytes in air and during hypoxia. *The Journal of Clinical Investigation*, 61(5), 1232–1239. <https://doi.org/10.1172/JCI109039>
166. Ouiddir, A., Planès, C., Fernandes, I., VanHesse, A., & Clerici, C. (1999). Hypoxia upregulates activity and expression of the glucose transporter GLUT1 in alveolar epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 21(6), 710–718. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.21.6.3751>
167. Gualdoni, G. A., Mayer, K. A., Kapsch, A. M., Kreuzberg, K., Puck, A., Kienzl, P., Oberndorfer, F., Frühwirth, K., Winkler, S., Blaas, D., Zlabinger, G. J., & Stöckl, J. (2018). Rhinovirus induces an anabolic reprogramming in host cell metabolism essential for viral replication. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 115(30), E7158–E7165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800525115>
168. Codo, A. C., Davanzo, G. G., Monteiro, L. B., de Souza, G. F., Muraro, S. P., Virgilio-da-Silva, J. V., Prodonoff, J. S., Carregari, V. C., de Biagi Junior, C. A. O., Crunfli, F., Jimenez Restrepo, J. L., Vendramini, P. H., Reis-de-Oliveira, G., Bispo Dos Santos, K., Toledo-Teixeira, D. A., Parise, P. L., Martini, M. C., Marques, R. E., Carmo, H. R., Borin, A., ... Moraes-Vieira, P. M. (2020). Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metabolism*, 32(3), 498–499. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.015>
169. Regazzetti, C., Peraldi, P., Grémeaux, T., et al. (2009). Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*, 58(1), 95–103. <https://doi.org/10.2337/db08-0457>
170. Jiang, C., Qu, A., Matsubara, T., et al. (2011). Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes*, 60(10), 2484–2495. <https://doi.org/10.2337/db11-0174>
171. Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M. E., et al. (2009). Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), 4467–4483. <https://doi.org/10.1128/MCB.00192-09>
172. Gonzalez, F. J., Xie, C., & Jiang, C. (2018). The role of hypoxia-inducible factors in metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(1), 21–32. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0096-z>
173. Yuan, X., Ruan, W., Bobrow, B., Carmeliet, P., & Eltzschig, H. K. (2024). Targeting hypoxia-inducible factors: Therapeutic opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 23(3), 175–200. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00848-6>
174. Kanbay, M., Altintas, A., Yavuz, F., et al. (2023). Responses to Hypoxia: How Fructose Metabolism and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Pathways

- Converge in Health and Disease. *Current Nutrition Reports*, 12(1), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s13668-023-00452-5>
175. Guo, C., Deshpande, M., Niu, Y., et al. (2023). HIF-1 α accumulation in response to transient hypoglycemia may worsen diabetic eye disease. *Cell Reports*, 42(1), 111976. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111976>
176. Rahtu-Korpela, L., Karsikas, S., Hörkkö, S., et al. (2014). HIF prolyl 4-hydroxylase-2 inhibition improves glucose and lipid metabolism and protects against obesity and metabolic dysfunction. *Diabetes*, 63(10), 3324–3333. <https://doi.org/10.2337/db14-0472>
177. Catrina, S. B., & Zheng, X. (2021). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia*, 64(4), 709–716. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05380-z>
178. Serebrovska, T. V., Portnychenko, A. G., Drevytska, T. I., Portnichenko, V. I., Xi, L., Egorov, E., Gavalko, A. V., Naskalova, S., Chizhova, V., & Shatylo, V. B. (2017). Intermittent hypoxia training in prediabetes patients: Beneficial effects on glucose homeostasis, hypoxia tolerance, and gene expression. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 242(15), 1542–1552. <https://doi.org/10.1177/1535370217723578>
179. Stanigut, A. M., Pana, C., Enciu, M., Deacu, M., Cimpineanu, B., & Tuta, L. A. (2022). Hypoxia-Inducible Factors and Diabetic Kidney Disease-How Deep Can We Go? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10413. <https://doi.org/10.3390/ijms231810413>
180. Singh, A. K., Kolligundla, L. P., Francis, J., & Pasupulati, A. K. (2021). Detrimental effects of hypoxia on glomerular podocytes. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 77, 193–203. <https://doi.org/10.1007/s13105-021-00761-9>
181. Dallatu, M. K., Choi, M., & Oyekan, A. O. (2013). Inhibition of prolyl hydroxylase domain-containing protein on hypertension/renal injury induced by high salt diet and nitric oxide withdrawal. *Journal of*

Hypertension, 31, 2043–2049.
<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328364dbce>

182. Liu, J., Wei, Q., Guo, C., Dong, G., Liu, Y., Tang, C., & Dong, Z. (2017). Hypoxia, HIF, and associated signaling networks in chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 950. <https://doi.org/10.3390/ijms18050950>
183. Gilkes, D. M., Bajpai, S., Chaturvedi, P., Wirtz, D., & Semenza, G. L. (2013). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10819–10829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442939>
184. Bento, C. F., & Pereira, P. (2011). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia*, 54(8), 1946–1956. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2191-8>
185. Gunton, J. E. (2020). Hypoxia-inducible factors and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 130(10), 5063–5073. <https://doi.org/10.1172/JCI137556>
186. Brunt, J. J., Shi, S. Y., Schroer, S. A., Sivasubramaniyam, T., Cai, E. P., & Woo, M. (2014). Overexpression of HIF-2 α in pancreatic β cells does not alter glucose homeostasis. *Islets*, 6(5-6), e1006075. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1006075>
187. Liu, P., Fang, X., Song, Y., Jiang, J. X., He, Q. J., & Liu, X. J. (2016). Expression of hypoxia-inducible factor 3 α in hepatocellular carcinoma and its association with other hypoxia-inducible factors. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(6), 2470–2476. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3193>
188. Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W. J., Tanaka, H., & Poellinger, L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *Journal of*

- Biological Chemistry, 277(36), 32405–32408.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C200328200>
189. Huang, Y., Kempen, M. B., Munck, A. B., Post, M., Flohé, S. B., & Dunn, A. C. (2015). Hypoxia-inducible factor 3 α plays a critical role in alveolarization and distal epithelial cell differentiation during mouse lung development. *PLOS ONE*, 10(3), e0119359.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119359>
190. Huang, Y., Kempen, M. B., Munck, A. B., Flohé, S. B., & Post, M. (2012). Hypoxia-inducible factor 2 α plays a critical role in the formation of alveoli and surfactant. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(2), 224–232. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0024OC>
191. Drevytska, T., Gavenauskas, B., Drozdovska, S., Nosar, V., Dosenko, V., & Mankovska, I. (2012). HIF-3 α mRNA expression changes in different tissues and their role in adaptation to intermittent hypoxia and physical exercise. *Pathophysiology*, 19(3), 205–214.
<https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2012.06.002>
192. Drevytska, T., Gonchar, E., Okhai, I., Lynnyk, O., Mankovska, I., Klionsky, D., & Dosenko, V. (2018). The protective effect of Hif3a RNA interference and HIF-prolyl hydroxylase inhibition on cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Life Sciences*, 202, 131–139.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.021>
193. McInturff, A. M., Cody, M. J., Elliott, E. A., Glenn, J. W., Rowley, J. W., Rondina, M. T., ... & Yost, C. C. (2012). Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 α . *Blood*, 120(15), 3118–3125.
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405993>
194. Branitzki-Heinemann, K., Möllerherm, H., Völlger, L., Husein, D. M., de Buhr, N., Blodkamp, S., & von Köckritz-Blickwede, M. (2016). Formation of Neutrophil Extracellular Traps under Low Oxygen Level. *Frontiers in Immunology*, 7, 518. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00518>

195. Rossi, A. G., Sawatzky, D. A., Walker, A., Ward, C., Sheldrake, T. A., Rossi, F., ... & Dransfield, I. (2006). Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nature Medicine*, 12(9), 1056–1064. <https://doi.org/10.1038/nm1468>
196. Mecklenburgh, K. I., Walmsley, S. R., Cowburn, A. S., Wiesener, M., Reed, B. J., Upton, P. D., Deighton, J., Greening, A. P., & Chilvers, E. R. (2002). Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood*, 100(8), 3008–3016. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0454>
197. Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., & Giaccia, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*, 379(6560), 88–91. <https://doi.org/10.1038/379088a0>
198. Walmsley, S. R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A. M., Cowburn, A. S., Johnson, N., & Chilvers, E. R. (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *The Journal of experimental medicine*, 201(1), 105–115. <https://doi.org/10.1084/jem.20040624>
199. Thompson, A. A., Elks, P. M., Marriott, H. M., Eamsamarn, S., Higgins, K. R., Lewis, A., Williams, L., Parmar, S., Shaw, G., McGrath, E. E., Formenti, F., Van Eeden, F. J., Kinnula, V. L., Pugh, C. W., Sabroe, I., Dockrell, D. H., Chilvers, E. R., Robbins, P. A., Percy, M. J., Simon, M. C., Walmsley, S. R. (2014). Hypoxia-inducible factor 2 α regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish. *Blood*, 123(3), 366–376. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-500207>
200. Serebrovska, Z. O., Chong, E. Y., Serebrovska, T. V., Tumanovska, L. V., & Xi, L. (2020). Hypoxia, HIF-1 α , and COVID-19: From pathogenic factors to potential therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(12), 1539–1546. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-00554-8>

201. Yucel, K., & Fuat Gurbuz, A. (2022). Hypoxia-inducible factor-1 α and ischemia-modified albumin levels in intensive care COVID-19 patients. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 43(4), 415–420. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2022-0024>
202. Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 721–732. <https://doi.org/10.1038/nrc1187>
203. Wing, P. A. C., Keeley, T. P., Zhuang, X., Lee, J. Y., Prange-Barczynska, M., Tsukuda, S., ... & McKeating, J. A. (2021). Hypoxic and pharmacological activation of HIF inhibits SARS-CoV-2 infection of lung epithelial cells. *Cell Reports*, 35(3), 109020. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109020>.

ДОДАТОК 1

Лабораторні показники пацієнтів із коморбідними станами при COVID-19

Таб. 1. Гематологічні показники пацієнтів із майбутнім різним ступенем тяжкості COVID-19 на етапі поступлення в стаціонар

		Лабораторні показники										
		Вік (роки)	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, т/л	Лейкоцити, г/л	Тромбоцити, г/л	Сегмен.-ядерні нейтрофіли, %	Палич.-ядерні нейтрофіли, %	Лімфоцити, %	Моноцити, %	Еозинофіли, %	ШОЕ, мм/год
Ступінь тяжкості	Легкий (n=14)	65,5± 3,14	128,6 ± 4,13	4,4 ± 0,06	7,22 ± 1,8	203,8 ± 26,6	71,2 ± 4,37	7 ± 1,5	14,2 ± 2,31	7 ± 1,09	0,6 ± 0,24	25 ± 3,57
	Середній (n=42)	60,4 ± 2,46	131,5 ± 4,91	4,3 ± 0,15	7,1 ± 0,78	227,9 ± 16,2	71,8 ± 2,19	8,5 ± 0,97	12,1 ± 2,01	5,8 ± 0,72	0,8 ± 0,1	29,9 ± 4,33
	Важкий (n=37)	66,4 ± 1,78	136,1 ± 6,92	5,2 ± 0,46	26,7 ± 18,9	200,5 ± 25,19	68,05 ± 4,35	11,05 ± 2,26	10,2 ± 1,74	4,7 ± 1,01	0,5 ± 0,12	27,7 ± 3,61

Таб. 2. Біохімічні показники пацієнтів із майбутнім різним ступенем тяжкості COVID-19 на етапі поступлення в стаціонар

		Лабораторні показники								
		Вік (роки)	Глюкоза, ммоль/л	АЛТ, од/л	АСТ, од/л	Креатинін, мкмоль/л	Сечовина, ммоль/л	ПТТ, %	Фібриноген, г/л	Д-димер, нгФЕО/мл
Ступінь тяжкості	Легкий (n=14)	65,5 ± 3,12	9,7±3,07	66,7 ± 12,27	59 ± 7,2	123,5 ± 8,16	7,22 ± 1,2	94,4 ± 6,4	4,45 ± 0,76	204 ± 110,22
	Середній (n=42)	60,4 ± 2,46	7,08 ± 0,63	45,17 ± 6,34	53 ± 7,8	112,4 ± 19,06	6,65 ± 0,84	92,8 ± 1,91	3,8 ± 0,55	603,7 ± 123,21
	Важкий (n=37)	66,4 ± 1,78	8,01 ± 0,8	48,7 ± 4,7	54,5 ± 11,62	105,7 ± 9,88	8,2 ± 0,85	93,3 ± 2,13	4,23 ± 0,48	625,87 ± 130,02

Таб.3. Лабораторні показники у ЧОЛОВІКІВ із майбутнім різним ступенем тяжкості COVID-19 на етапі поступлення в стаціонар

		Рівень лабораторних показників у ЧОЛОВІКІВ із різним ступенем тяжкості COVID-19											
		Вік	глюкоза	Гемоглобін	Еритроцити	Лейкоцити	Тромбоцити	Палич.-ядерні нейтрофіли	лімфоцити	моноцити	АЛТ	сечовина	ПТТ
Ступінь тяжкості	Легкий (n=9)	61,0 ± 6,2	6,8 ± 0,3	126,0 ± 4,2	4,5 ± 0,02	5,8 ± 0,03	220,5 ± 23,4	6,0 ± 0,1	22,5 ± 0,7	6,0 ± 0,3	45,2 ± 7,4	5,6 ± 0,13	97,0 ± 0,9
	Середній (n=24)	56,3 ± 3,03	8,4 ± 1,0	134,8 ± 4,3	4,3 ± 0,17	7,7 ± 0,94	205,4 ± 16,6	9,3 ± 1,01	12,3 ± 2,04	6,4 ± 0,8	53,0 ± 7,9	7,3 ± 0,99	94,3 ± 1,9
	Важкий (n=18)	66,9 ± 3,4	9,35 ± 1,5	139,8 ± 13,8	6,1 ± 0,9	8,5 ± 2,2	169,98 ± 39,4	11,3 ± 2,8	10,1 ± 3,2	4,3 ± 1,07	41,6 ± 3,03	7,5 ± 1,04	91,4 ± 2,2

Таб. 4. Лабораторні показники у ЖІНОК із майбутнім різним ступенем тяжкості COVID-19 на етапі поступлення в стаціонар

Рівень лабораторних показників у ЖІНОК із різним ступенем тяжкості COVID-19													
		Вік	глюкоза	Гемоглобін	Еритроцити	Лейкоцити	Тромбоцити	Палич. ядерні нейтрофіли	лімфоцити	моноцити	АЛТ	сечовина	ПТТ
Ступінь тяжкості	Легкий (n=5)	70,2 ± 7,04	5,80 ± 0,4	124,50 ± 4,59	4,30 ± 0,07	5,65 ± 0,38	168,50 ± 22,27	7,50 ± 1,76	12,00 ± 0,7	8,0 ± 0,2	52,0 ± 0,01	9,15 ± 2,08	86,0 ± 11,3
	Середній (n=18)	61,6 ± 4,99	6,28 ± 0,38	120,5 ± 9,77	3,84 ± 0,32	6,18 ± 0,7	210,50 ± 16,57	8,17 ± 1,7	11,67 ± 3,39	4,7 ± 1,03	35,8 ± 1,38	5,97 ± 0,38	92,7 ± 2,03
	Важкий (n=19)	68,1 ± 4,17	6,81 ± 0,32	131,1 ± 5,07	4,51 ± 0,17	7,57 ± 0,61	224,09 ± 34,35	10,64 ± 3,05	10,40 ± 1,99	5,4 ± 0,27	49,9 ± 6,7	8,06 ± 1,44	94,3 ± 1,57

ДОДАТОК 2



Рис. 4.1. Схематичне зображення ролі гіалуронової кислоти в патогенезі розвитку інтерстиційного набряку легень на тлі важкого перебігу COVID-19 у пацієнтів з коморбідними станами

ДОДАТОК 3

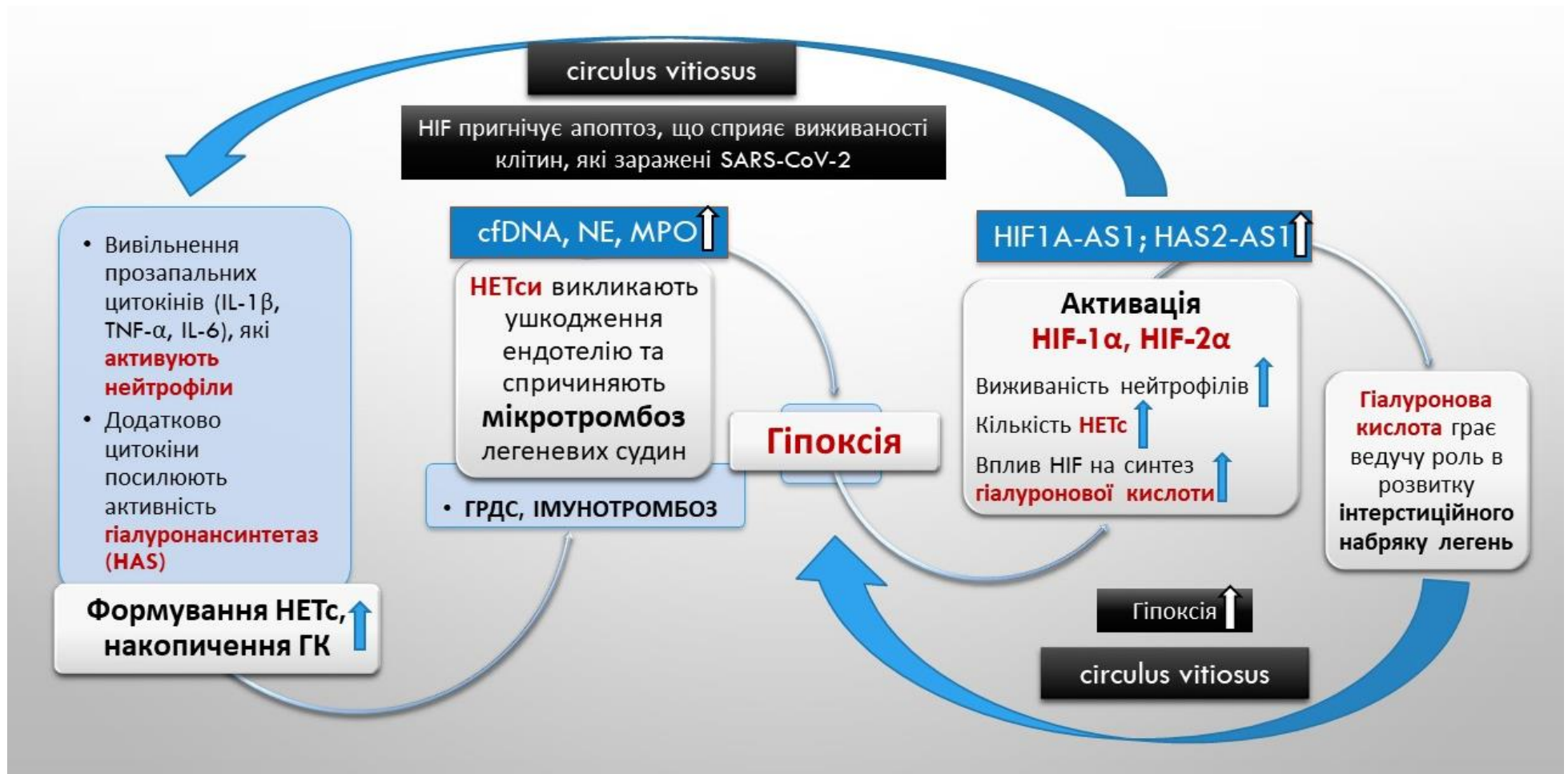


Рис. 4.2. Узагальнююча схема патогенетичних механізмів важкого перебігу COVID-19