

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Оцінка ступеню цитотоксичної дії прозапальних молекул  
DAMP в клітинному дебрисі**

Кваліфікаційна робота

студентки кафедри

молекулярної біології та біотехнології

Логінової Дар'ї Валеріївни

Оцінка «\_\_\_\_\_»

Науковий керівник:

професор, доктор біологічних наук

Завідувач кафедри \_\_\_\_\_ А.І. Божков

Клімова Олена Михайлівна

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

Харків 2023

## АНОТАЦІЯ

Існує проблема пошуку індивідуальних патогенетичних маркерів постковідного синдрому для визначення терапевтичних мішеней розробки та створення біотехнологічних продуктів. Біотехнологічні продукти необхідно розробляти з урахуванням їхньої інгібуючої або активуючої дії.

Оскільки на фоні інфікування різними штамами SARS-CoV-2 та вакцинації у населення планети сформувався так званий популяційний імунітет і ця хвороба перейшла в когорту респіраторних захворювань. Як результат, пандемію COVID-19 було скасовано, але тим не менш подолання її наслідків все ще залишається актуальним завданням. Тому наукова спільнота зараз жваво вивчає і обговорює так званий постковідний синдром. Він розвивається в пацієнтів, які зазнали впливу SARS-CoV-2 і характеризується ураженням різних органів, залежно від експресії внутрішньоклітинних рецепторів, зокрема рецепторів TLR на поверхні клітин.

Порушення в імунокомпетентних клітинах, зокрема в мітохондріях, грають важливу роль у розвитку цього синдрому. Внаслідок цього виникають системні порушення, такі як захворювання підшлункової залози та серцево-судинної системи. Тому для біотехнологів виникає необхідність розглядати можливість пошуку інгібіторів та активаторів для лікування постковідного синдрому. Але така робота неможлива без повного розуміння механізмів розвитку цього стану та універсальних молекул або систем, на які має бути спрямована терапія.

Дана робота надає важливі вказівки для подальших досліджень та потенційної розробки нових терапевтичних стратегій для лікування постковідного синдрому. В ній було оцінено ступінь цитотоксичної дії

прозапальних молекул DAMP, які утворюються в організмі пацієнтів на COVID-19, чий стан характеризується як патологічний, на експериментальній моделі.

Через 2 місяці після SARS-CoV-2 інфекції у пацієнтів з постковідним синдромом було визначено рівень цитотоксичних фракцій DAMP, наявність специфічних аутоантитіл, ступінь утворення активних форм кисню та молекул пізньої активації лімфоцитів CD3+HLA-DR+.

Сироватками крові пацієнтів було п'ятикратно імунізовано експериментальних тварин. В них було оцінено фактори кисень-незалежного фагоцитозу нейтрофілів, ступінь лімфоцитарної цитотоксичності та визначено концентрацію циркулюючих імунних комплексів.

Показано, що сироватки крові пацієнтів характеризуються гетерогенним змістом фракцій молекул DAMP, що дозволило розподілити пацієнтів на групи, де група А мала підвищений вміст олігопептидних DAMP, група В – нуклеотидних DAMP, а група С – одночасне збільшення олігопептидної та нуклеотидної фракцій. Показники пацієнтів групи С характеризувалися підвищеним утворенням активних форм кисню, а також значним стрибком значення маркера пізньої активації лімфоцитів CD3+HLA-DR+ порівняно з іншими групами. Показники експериментальних тварин, для імунізації яких було використано сироватку крові пацієнтів цієї групи, характеризувалися таким же контрастом значень серед всієї вибірки.

Отримані результати свідчать про високу синергічну імунну активність олігопептидної та нуклеотидної фракції DAMP як у пацієнтів з постковідним синдромом, так і у експериментальних щурів. Вона може бути пов'язана з високою імуногенністю мітохондріальної ДНК та N-форміл пептидів, які вивільнились в позаклітинний простір зі зруйнованих лімфоцитів внаслідок мітохондріальної дисфункції.

Робота включає 55 сторінки, містить 17 рисунків та 1 таблицю. Список використаної літератури містить 58 джерела, з них 56 – іноземні.

Ключові слова: DAMP, постковідний синдром, запалення, цитотоксичність, фагоцитоз.

## ANNOTATION

There is a problem of finding individual pathogenetic markers of post-COVID syndrome to determine therapeutic targets for the development and creation of biotechnological products. Biotechnological products must be developed taking into account their inhibitory or activating action.

Since the so-called population immunity was formed in the global population against the background of infection with various strains of SARS-CoV-2 and vaccination, this disease moved into the cohort of respiratory diseases. As a result, the COVID-19 pandemic has been canceled, but nevertheless, overcoming its consequences is still an urgent task. Therefore, the scientific community is now actively studying and discussing the so-called post-COVID syndrome. It develops in patients exposed to SARS-CoV-2 and is characterized by damage to various organs, depending on the expression of intracellular receptors, in particular TLR receptors on the surface of cells.

Disorders in immunocompetent cells, particularly in mitochondria, play an important role in the development of this syndrome. As a result, systemic disorders occur, such as diseases of the pancreas and the cardiovascular system. Therefore, it is necessary for biotechnologists to consider the possibility of finding inhibitors and activators for the treatment of post-COVID syndrome. But such work is impossible without a full understanding of the mechanisms of development of this condition and the universal molecules or systems to which therapy should be directed.

This work provides important directions for further research and the potential development of new therapeutic strategies for the treatment of post-COVID syndrome. It assessed the degree of cytotoxic effect of pro-inflammatory DAMP molecules, which are formed in the body of patients with COVID-19, whose condition is characterized as pathological, on an experimental model.

2 months after SARS-CoV-2 infection, the level of cytotoxic DAMP fractions, the presence of specific autoantibodies, the degree of formation of reactive oxygen species and late activation molecules of CD3+HLA-DR+ lymphocytes were determined in patients with post-COVID syndrome.

Experimental animals were immunized five times with patients' blood sera. They evaluated the factors of oxygen-independent phagocytosis of neutrophils, the degree of lymphocytic cytotoxicity, and determined the concentration of circulating immune complexes.

It was shown that patients' blood sera are characterized by a heterogeneous content of DAMP molecule fractions, which made it possible to divide patients into groups where group A had an increased content of oligopeptide DAMPs, group B – nucleotide DAMPs, and group C – a simultaneous increase in oligopeptide and nucleotide fractions. The indicators of patients of group C were characterized by increased formation of reactive oxygen species, as well as a significant jump in the value of the late activation marker of CD3+HLA-DR+ lymphocytes compared to other groups. The indicators of the experimental animals, for the immunization of which the blood serum of the patients of this group was used, were characterized by the same contrast of values among the entire sample.

The obtained results indicate a high synergistic immune activity of the oligopeptide and nucleotide fraction of DAMP both in patients with post-covid syndrome and in experimental rats. It may be associated with the high immunogenicity of mitochondrial DNA and N-formyl peptides, which were released into the extracellular space from destroyed lymphocytes as a result of mitochondrial dysfunction.

The work includes 55 pages, contains 17 figures and 1 table. The list of used literature contains 58 sources, of which 56 are foreign.

Key words: DAMP, post-COVID syndrome, inflammation, cytotoxicity, phagocytosis.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	9
ВСТУП .....	11
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	14
1.1. Характеристика запальних процесів.....	14
1.2. Фагоцитоз .....	19
1.2.1. Розчинні циркулюючі імунні комплекси .....	21
1.3. Характеристика молекул DAMP .....	22
1.3.1. DAMP нуклеотидної природи .....	23
1.3.2. DAMP пептидної природи .....	26
1.3.3. DAMP олігопептидної природи .....	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	28
2.1. Визначення концентрації різних фракцій DAMP .....	30
2.2. Оцінка ступеню утворення активних форм кисню .....	30
2.3. Визначення специфічних аутоантитіл за допомогою імунофлуоресцентного методу .....	31
2.4. Визначення показників кисень-незалежного фагоцитозу нейтрофілів експериментальних тварин з використанням світлової мікроскопії .....	31
2.5. Визначення концентрації розчинних циркулюючих імунних комплексів сироватки крові експериментальних тварин.....	32
2.6. Визначення лімфоцитотоксичності методом Терасакі .....	32
2.7. Визначення кластерів диференціювання на лімфоцитах методом протоочної цитофлуориметрії .....	34

2.8. Методи обробки даних .....	34
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....</b>	<b>35</b>
<b>I етап досліджень .....</b>	<b>35</b>
3.1. Рівень цитотоксичних фракцій DAMP у пацієнтів з ПКС .....	35
3.2. Ступінь утворення активних форм кисню .....	37
3.3. Визначення рівня молекул маркера пізньої активації лімфоцитів CD3+HLA-DR+ .....	39
3.4. Визначення специфічних аутоантитіл імунофлуоресцентним методом	40
<b>II етап досліджень .....</b>	<b>40</b>
3.5. Дослідження ступеня цитотоксичності сироватки крові за допомогою тесту Терасакі .....	41
3.6. Показники кисень-незалежного фагоцитозу нейтрофілів експериментальних тварин з використанням світлової мікроскопії .....	42
3.7. Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів .....	45
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>47</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>49</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

SARS-CoV-2 – тяжкий гострий респіраторний синдром коронавірусу 2

COVID-19 – коронавірусна хвороба 2019

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

PAMP – патоген-асоційовані молекулярні патерни

PRR – рецептор розпізнавання патерну

DAMP – молекулярні патерни, асоційовані з пошкодженням

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ПКС – постковідний синдром

CD3 – кластер диференціювання 3

HLA-DR – головний комплекс гістосумісності 2

TLR – Toll-подібний рецептор

НАДФН-оксидаза

АФК – активні форми кисню

Fc-частина – частина антитіла, здатна до кристалізації

РНК – рибонуклеїнова кислота

ІЛ – інтерлейкін

Од.Е – оптична густина

Об/хв – обертів за хвилину

$\lambda$  – довжина хвилі

Нм – нанометр

Мл – мілілітр

МтДНК – мітохондріальна ДНК

MyD88 – первинна відповідь місцевої диференціації 88

pH – водневий показник

Мкл – мікролітр

Кл/мл – клітин на мілілітр

CpG – послідовності 5'-CG-3'

мМ – міліМоль

In vivo – в живому організмі

АТФ – аденозинтрифосфат

A $\beta$  – бета амілоїд

EDN – нейротоксин еозинофілів

RAGE – мультилігандний рецептор із сім'ї імуноглобулінів

## ВСТУП

Вірус SARS-CoV-2 трансформував всі сфери людської діяльності, спричинивши пандемію COVID-19. Проте найбільш значний вплив це мало на область медицини, яка щоденно розробляла протоколи для лікування тисяч пацієнтів з різними ступенями тяжкості. Завдяки їм, найбільш критичний стан було подолано і нещодавно ВООЗ скасувала статус пандемії COVID-19. Проте було з'ясовано, що дія SARS-CoV-2 на організм не обмежується лише гострою фазою, але й може мати симптоми, які зберігаються протягом місяців або й років. Серед них можуть бути біль в грудях, задишка, кашель, м'язовий та головний біль, когнітивні і сердечні порушення, розлади шлунково-кишкового тракту, висипання та ряд інших. Стан, який характеризується наявністю деяких з цих симптомів, було названо постковідним синдромом.

Він може виникнути в будь-якої людини, яка зазнала впливу вірусу SARS-CoV-2, спричиняючи незворотні зміни в її стані. Деякі люди менше або більше схильні до формування цього синдрому, як, наприклад, з тяжким перебігом гострої фази COVID-19. Повні механізми формування постковідного синдрому ще до кінця не вивчені, тому протоколи, які були розроблені для його лікування, часто є досить обмеженими. На даний момент не існує універсальних мішеней для терапевтичного лікування пацієнтів з ПКС. Тому пошуки ефективного подолання цього стану все ще залишаються завданнями світової спільноти [58,13].

Поглиблення знань про особливості процесів, які відбуваються в результаті дії інфекційного фактору протягом тривалого часу, відкриває більше можливостей для виявлення нових терапевтичних мішеней. Цей підхід дозволить спеціалістам з біотехнології розробляти таргетовані засоби для пригнічення або активації каскаду імунних процесів, що відбуваються в ПКС.

Окрім того, це має великий потенціал в розробці нових діагностичних систем біотехнологічного походження. Тому вивчення патогенезу постковідного синдрому є актуальною сферою, як з практичного, так і фундаментального боку.

Вже відомо, що SARS-CoV-2, як і будь-які інші фактори інфекційної природи, відомі як PAMP, взаємодіють з факторами імунітету і можуть викликати запальну реакцію через активацію закодованих зародковими лініями рецепторів розпізнавання патернів, експресованих як в імунних, так і в неімунних клітинах [8].

Проте деякі PRR також розпізнають різні ендогенні сигнали, які активуються під час пошкодження тканини або клітини внаслідок ураження SARS-CoV-2. Вони відомі як пов'язані з пошкодженням молекулярні патерни або ж DAMP [21, 51, 29]. Виходячи з хімічної структури [41,37,42], їх можна розділити на чотири фракції: олігопептидну, нуклеотидну, пептидну та ароматичні амінокислоти.

Вони зазвичай знаходяться всередині клітини і відіграють важливі ролі в гомеостазі під час нормального функціонування організму. З найбільш примітних прикладів таких молекул можна назвати, як ядерну, так і мітохондріальну ДНК. Але коли клітини піддаються стресу і їх мембрани руйнуються, DAMP вивільняються в позаклітинний простір [45].

Вважається, що тоді ці молекули набувають цитотоксичної дії і запускають хронічну запальну реакцію, яка може мати пролонгований ефект в виді формування ПКС [29,51].

До кінця не відомо біологічний внесок кожної фракції DAMP у розвиток та підтримку симптомів постковідного синдрому [51]. Тому метою цієї

роботи було визначити рівень цитотоксичності та патогенності молекул фракцій DAMP на експериментальній моделі.

Завдання роботи:

- 1) Вивчення показників пацієнтів з постковідним синдромом
  - Визначення рівня цитотоксичних фракцій DAMP у пацієнтів з постковідним синдромом
  - Оцінка ступеню утворення активних форм кисню, які приймають участь у формуванні постковідного синдрому
  - Визначення стадії хронізації запалення за наявністю молекул пізньої активації лімфоцитів CD3+HLA-DR+
  - Оцінка утворення специфічних аутоантитіл у пацієнтів з постковідним синдромом
- 2) Вивчення дії сироватки пацієнтів з постковідним синдромом на експериментальних моделях
  - Оцінка ступеню лімфоцитарної цитотоксичності сироватки крові імунізованих тварин
  - Визначення факторів кисень-незалежного фагоцитозу нейтрофілів імунізованих тварин
  - Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові імунізованих тварин

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Характеристика запальних процесів

Запальна реакція – це скоординована активація сигнальних шляхів, які регулюють рівень медіаторів запалення в клітинах резидентної тканини та клітинах запалення, рекрутованих із крові [28]. Вона може мати гостру чи хронічну природу [30].

Гостре запалення ініціюється резидентними вродженими імунними клітинами – макрофагами, дендритними клітинами та тучними клітинами, які розпізнають PAMP та DAMP. Останні індукують локальну вазодилатацію та рекрутують гранулоцити та білки комплементу, щоб швидко знищити мікроби, які могли подолати епітеліальні бар'єри. У цей момент запальне середовище характеризується значною присутністю прозапальних цитокінів і ейкозаноїдів арахідонової кислоти, які швидко вивільняються лейкоцитами для посилення запальних сигналів і рекрутування більшої кількості імунних клітин [6].

Гостра запальна реакція зазвичай припиняється після усунення тригерного інсульту, усунення інфекції та відновлення пошкодженої тканини [48]. Якщо тригер запалення не усувається гострою запальною реакцією або зберігається з будь-якої іншої причини, фаза розв'язання може бути не індукована належним чином і виникає хронічне запалення [54].

Хронічне запалення спричиняється DAMP за відсутності гострого інфекційного ураження або активації PAMP [10].

Ця фаза характеризується збереженням лейкоцитарного інфільтрату в ушкоджених тканинах. Їй притаманна стійкість, яка призводить до аномального ремоделювання тканин, незворотного пошкодження та, зрештою, до симптомів захворювання [5, 20].

Також в цей період відбувається виражена диференціація адаптивного імунітету, головним чином у Т-лімфоцитах. Ці високодиференційовані клітини сприяють продовженню процесу, виробляючи підвищені рівні прозапальних цитокінів [24].

Прозапальні цитокіни динамічно контролюють експресію HLA-DR. Цей рецептор переважно експресується на макрофагах, моноцитах, дендритних або В-клітинах. Він допомагає презентувати пептидні антигени імунній системі з метою виклику Т-хелперів, які стимулюють вироблення проти них антитіл [35, 27].

Проте рецептор CD3, який відповідає за зв'язування HLA-DR і Т-хелперних клітин так само може зв'язувати цитотоксичні Т-клітини з HLA-DR. Такий підхід особливо практичний в контексті високого імунного навантаження і порушення функціонування інших механізмів імунного захисту, адже завдяки вивільненню токсичних сполук дозволяє безпосередньо знищувати патогени. Відповідно, чим більш хронізованим є процес, тим більшою є потреба активувати саме такі клітини замість Т-хелперів. Тож оцінюючи кількісно чи якісно цей показник, або ж так звану лімфоцитоксичність, ми можемо судити про тяжкість запальної реакції [52].

Так само високі рівні HLA-DR пов'язані з потребою підвищити антигенпрезентуючу здатність, що свідчить про пізню активацію лімфоцитів. В той же час, як низькі рівні дають нам зрозуміти, що всі процеси відбуваються в нормальному темпі і додаткової стимуляції не потрібно [35, 27].

Реакція запалення складається з чотирьох компонентів: збудники запалення, рецептори, які їх виявляють, медіатори запалення, індуковані рецепторами, і тканини-мішені, на які впливають медіатори запалення. Кожен компонент має кілька форм, і їх комбінації функціонують у різних шляхах

запалення. Індивідуальні шляхи активації імунітету залежать від природи тригерних факторів та предикторів [30].

Але, незважаючи на специфіку індивідуальних шляхів активації імунної системи, можна виділити декілька основних етапів перебігу запальної реакції:

- 1) інфільтрація;
- 2) первинна альтерація;
- 3) вторинна альтерація;
- 4) ексудація;
- 5) проліферація.

Нейтрофіли є першою лінією імунної відповіді проти інфекційних агентів або травм. Ці клітини швидко екстравазують з кровообігу в місця інфікування або ушкодження стерильних тканин. Вони відіграють центральну роль у відповіді гострого запалення. Інфільтровані нейтрофіли усувають патогени, а також ініціюють запальні каскади [44, 38, 1].

Одним із таких шляхів є утворення та поширення нейтрофільних позаклітинних пасток. Це комплекси, утворені ДНК та гістонами і іншими білками, які володіють здатністю до захоплення патогенних частинок. Проте якщо вони починають утворюватися і поширюватися неконтрольовано, це може загострити запалення та бути причиною пошкодження тканин. Було показано, що рівень позаклітинних нейтрофільних пасток відповідає тяжкості захворювання COVID-19 [55,56].

Потім розпочинається первинна альтерація, яка проявляється через пошкодження різних тканинних фрагментів, що змінюють функції та структуру тканин. Вона пролонгує дію причини, яка викликала запалення, проте контакт етіологічного чинника вже припинився.

Цьому етапу також притаманна мітохондріальна дисфункція, яка характеризується набряканням мітохондрій, деорганізацією крист, зменшенням кількості рибосом, зміною мембрани ендоплазматичної сітки та появою різних включень в цитоплазмі [1]. Показано, що руйнування мітохондрій перешкоджає ефективній імунній відповіді, посилює запалення та тяжкість сепсису, пов'язаного з COVID-19 [49].

Далі настає стадія вторинної альтерації, під час якої пошкоджується цитолема клітини і мембрана лізосом. Їй притаманні зміни в обмінних процесах. До таких входять посилений розпад вуглеводів, жирів, білків, підвищення анаеробного гліколізу і тканинного дихання, порушення біологічного окиснення та зниження активності анаболічних процесів.

Після цього електроліти, клітини та білки виходять з крові в судинах до тканин і настає стадія ексудації. Це відбувається внаслідок збільшення проникності бар'єру стінок судин. Кровообіг сповільнюється і артеріоли та прекапіляри починаються рефлекторно спазмувати. Далі на зміну приходить гіперемія артерій, сполучна тканина навколо судин руйнується і починається накопичення запальних медіаторів. Через мікротромби лімфатичних судин та вен, стиснення ззовні стінки судин ексудатом та ряд інших факторів, гіперемія так само настає і у вен.

Внаслідок такого каскаду процесів на цій стадії, кровообіг зупиняється і утворюється бар'єр, який територіально та функціонально обмежує вогнище запалення.

Паралельно цим процесами, лейкоцити розміщуються вздовж внутрішньої оболонки дрібних судин з їх наступним прикріпленням до ендотелію та міграцією. Завдяки клітинам, що мігрували, відбувається фагоцитоз, функцією якого є захоплення і перетравлення частинок, що

розпізнаються як чужорідні. Під час цього процесу утворюється фагоцитарна чашка, де утворюються токсичні для патогенів активні форми кисню.

Останнім етапом запальної реакції є проліферація, який характеризується настанням відновних процесів. Клітини починають розмножуватись аби компенсувати пошкодження наскільки це можливо, що дозволяє відмежувати вогнище запалення і дозволити запаленню затихнути [1].

Проте через ряд факторів запалення може не затихнути і стати не гострим, а хронічним. Лейкоцити продовжать рекрутуватись, а тканини пошкоджуватись. На відміну від гострих запальних реакцій, хронічне запалення може тривати тижнями, місяцями або навіть усе життя. Воно характеризується накопиченням моноцитарних макрофагів і лімфоцитів, проліферацією фібробластів і дрібних кровоносних судин [19].

На сьогоднішній день хронічне запалення пов'язане з більшістю основних патологіях людини, таких як рак, аутоімунні, метаболічні, серцево-судинні та нейродегенеративні розлади [5, 20], де він опосередковує перехід, у якому передача сигналів біоактивних ліпідів діє або як основний збудник, або як побічний елемент, який посилює запальний сплеск [6].

У багатьох із цих випадків хронічні запальні симптоми, такі як підвищення запальних цитокінів і аутоантитіл у сироватці крові, можуть служити апрогностичним індикатором пізніх проявів захворювання та загальної захворюваності та смертності. Однак, оскільки хронічне запалення зазвичай не викликає явних клінічних симптомів, а скринінг маркерів запалення не проводиться під час звичайних медичних оглядів, потенційна прогностична сила хронічного запального стану в даний час не використовується. Частково це пояснюється тим фактом, що підвищені

фактори запалення в сироватці крові не є маркерами, специфічними для хронічного запалення, і тому їх діагностична цінність наразі обмежена. Тому дослідження механізмів та пошук методів своєчасної оцінки хронічного запалення залишаються актуальними [4].

## 1.2. Фагоцитоз

Одним із етапів запального процесу є фагоцитоз – сприйняття і захоплення чужорідних частинок спеціалізованими клітинами фагоцитами.

Фагоцитоз є ключовим клітинним механізмом, що сприяє регенерації тканин і забезпечує гомеостаз [53]. Він був вперше описаний Іллею Мечниковим, якого вважають батьком клітинного імунітету. Між 1879 і 1882 роками він створив лабораторію морської біології та порівняльної ембріології в Мессіні, Італія, де він спостерігав і описував цей процес. Його опис «фагоцитозу» (еволюційно збереженого клітинного процесу, який розпізнає та поглинає частинки розміром понад 0,5 мікрона всередині везикули, що походить від плазматичної мембрани), призвів до присудження йому Нобелівської премії в 1908 році разом з Полом Ерліхом [25].

Фагоцитоз може бути завершеним і незавершеним [2]. Процес завершеного фагоцитозу включає декілька фаз:

1. Виявлення частинки для проковтування
2. Активація процесу інтерналізації
3. Утворення фагосоми
4. Дозрівання фагосоми.

Виявлення цільової частинки опосередковано рецепторами PRR, які, як вже згадувалось вище, зв'язуються з молекулами PAMP або DAMP. Деякі з цих

рецепторів безпосередньо індукують фагоцитоз (опсонічні). Це можуть бути антитіла, циркулюючі імунні комплекси, компоненти комплементу та лектини.

Проте є й інші рецептори такі як TLR, які зв'язуються з PAMP чи DAMP і готують клітину до фагоцитозу, але не індукують його [53].

Після виявлення частинки рецепторами фагоцитів активується процес інтерналізації. На цьому етапі мембрани та актиновий цитоскелет змінюються, формуючи псевдоподії аби покрити частинку. Внаслідок цього утворюється мембранне поглиблення, так звана фагоцитарна чашка. Протягом кількох хвилин вона закривається на дистальному кінці, утворюючи окрему везикулу – фагосому.

Далі новоутворена структура починає процес дозрівання. На цьому етапі фагосома поступово взаємодіє та зливається спершу з ранніми, а потім пізніми ендосомами та, врешті-решт, лізосомами. Через це вона перетворюється на фаголізосому, яка може утримувати дуже кисле та деградаційне середовище. Як наслідок, це дозволяє зруйнувати поглинену частинку.

Знищення починається шляхом, незалежним від кисню. Це включає знищення збудника за допомогою лізосомальних ферментів (протеаз, фосфоліпаз, нуклеаз та лізоцимів) [47].

В випадку високого навантаження фагоцитоз не завершується: переварювання всередині фагоцитів не відбувається, патогенні частинки виживають і можуть довго залишатись у вторинних лізосомах [2].

Тоді активується шлях, залежний від кисню або ж окислювальний вибух. Він включає утворення активних форм кисню, таких як супероксидні радикали, які утворюються за допомогою ферменту НАДФН-оксидази. Ці високоактивні молекули реагують з білками, ліпідами та іншими біомолекулами аби знищити патоген [47]. Вони також відомі своїми впливом

на суїцидальне утворення нейтрофільних позаклітинних пасток. Це значить, що таке утворення пасток на відміну від життєвого утворення, яке згадувалось вище, спричиняє деконденсацію хроматину який змішується з цитоплазматичними білками і, руйнуючи мембрану, виходить в позаклітинний простір [57].

Високі концентрації АФК можуть також спричинити окислювальний стрес і пошкодження тканин та сприяти, наприклад, нейродегенерації. Серед причин такого явища можна виділити дисфункцію електронного транспорту у дихальному ланцюгу мітохондрій [34].

Тому вивчення фагоцитозу є актуальним в імунологічних дослідженнях. Серед результатів найбільш інформативними показниками є фагоцитарне число та відсоток фагоцитозу [2].

#### 1.2.1. Розчинні циркулюючі імунні комплекси

Імуноглобулін G є частиною специфічної адаптивної відповіді. Коли його антитіла зв'язуються з відповідним антигеном, утворюються імунні комплекси [17]. Такі комплекси можуть тимчасово відкладатись в тканинах або бути розчинними і залишатись в кровообігу людини. Вони зазвичай швидко очищаються фагоцитами, які з цією метою експресують специфічні рецептори, що розпізнають Fc-частину молекули імуноглобуліну G.

Але в деяких випадках ці комплекси не очищаються і продовжують циркулювати. Їх називають розчинними циркулюючими імунними комплексами, спричиняючи серйозне системне запалення [23].

Вони пов'язуються з певними аутоімунними, вірусними, інфекційними та хронічними захворюваннями [11]. Наприклад, показано, що реактивність циркулюючих імунних комплексів значною мірою корелює з тяжкістю захворювання COVID-19. Природно, така системна подія також може бути

поясненням загального системного збільшення прозапальних цитокінів під час COVID-19 [23].

### 1.3. Характеристика молекул DAMP

Молекули DAMP – це потужні активатори імунної системи ендogenous походження. Ними можуть бути нуклеотиди та нуклеозиди, ДНК та РНК, білки температурного шоку, тощо [45].

Внутрішньоклітинні DAMP вивільняються в результаті розпаду некротичних і апоптичних клітин або клітин, які піддаються аутофагії [16]. Аутофагією називають процес руйнування лізосоною цитоплазматичних компонентів, включаючи розчинні макромолекули (нуклеїнові кислоти, білки, вуглеводи та ліпіди) та органели (наприклад, мітохондрії, пероксисоми та ендоплазматичний ретикулум) [40]. Причиною цього можуть бути різні хімічні, фізичні, інфекційні та метаболічні фактори [45].

Клітина може вивільнювати різні молекули DAMP. Навіть описано декілька підходів до класифікації цих молекул. Один із них за походженням.

В рамках цієї класифікації виділяють:

- ядерні (гістони, геномна ДНК, HMGB1, HMGN1, IL-1 $\alpha$ , IL-33, ДНК, РНК, SAP130, профілін-1)
- мітохондріальні (мітохондріальна ДНК, мітохондріальний транскрипційний фактор А, N-форміл пептид, АФК, сукцинат, кардіоліпін, АТФ) [46],
- цитозольні (АТФ, F-актин, циклофілін А, білки теплового шоку, кристали уринової кислоти, феритин, S100 білки, А $\beta$ ),
- ендоплазматичного ретикулуму (калретікулін),
- гранул (дефензини, LL37, EDN, гранулізин),

- плазматичної мембрани (синдекани, гліпікани),
- екстрацелюлярні (біглікан, декорин, версикан, низькомолекулярний гіалуронан, гепарин сульфат, фібронектин (EDA домен), фібриноген, тенасцин С) [41].

Не дивлячись на наявність великого різноманіття походження цих молекул, багато даних свідчить про те, що мітохондрії є основними джерелом DAMP [36]. DAMP, отримані з мітохондрій, включають не тільки білки, але також ДНК, ліпіди та АФК [46]. DAMP, що вивільняються з мітохондрій, ініціюють імунні відповіді в цитозолі. Це посилює запальні реакції та сприйнятливність до окислювального стресу *in vivo*, тому роль мітохондріальних DAMP у субклітинному відділі є критичною в патогенезі захворювань людини [36].

### 1.3.1. DAMP нуклеотидної природи

Після клітинного стресу або травматичного ушкодження тканини нуклеїнові кислоти в ядрі і мітохондріях вивільняються в цитоплазму та кров, викликаючи вроджену імунну відповідь. Виявленими лігандами нуклеїнової кислоти є TLR9, TLR7 і TLR3 [14,15].

TLR9 є членом сімейства TLR і експресується в різних типах клітин, особливо в імунних клітинах. TLR9 локалізований у середині внутрішньоклітинного ендосомального компартменту та розпізнає неметильовані послідовності CpG у молекулах мтДНК. Такі послідовності притаманні не лише мтДНК, але й прокаріотичним геномам, тому TLR9 може впізнавати не тільки DAMP, але й PAMP. Після розпізнавання TLR9 ініціює імунну відповідь, включаючи виробництво прозапальних цитокінів,

хемотаксис і фагоцитоз, через шляхи, залежні від гена первинної відповіді 88 мієлоїдної диференціації [36, 26].

Зв'язок між рівнями мітохондріальних DAMP і тяжкістю захворювань людини часто є відповідним або подібним до спостережуваних досліджень *in vivo*. Рівень циркулюючої мтДНК підвищується у пацієнтів із такими захворюваннями, як сепсис, інсульт, гостра печінкова недостатність, масивна легенева емболія або рак, а також пов'язані з тяжкістю або прогнозом захворювань.

Подібним чином рівні циркулюючої безклітинної мтДНК підвищені у пацієнтів з травмою або сепсисом, а також спостерігаються на тваринних моделях травми/геморагічного шоку або бактеріального сепсису [36]. Дослідження на людях показують, що рівні мтДНК у плазмі крові підвищуються після травматичного ушкодження та залежно від дози корелюють зі смертністю [15].

Також було продемонстровано зв'язок підвищених рівнів позаклітинної мтДНК у плазмі з підвищенням смертності від COVID-19.

Причиною цього вважається те, що під час інфекції SARS-CoV-2 гіпоксія викликає перемикання на аеробне гліколітичне дихання, яке змінює функцію мітохондрій, викликаючи стан гіперглікемії, підвищене виробництво АТФ і підвищене споживання кисню. Ці змінені метаболічні шляхи призводять до збільшення цитоплазматичних і мітохондріальних АФК.

Нездатність пошкоджених і старіючих мітохондрій очистити АФК може пошкодити мітохондріальну структуру, одиниці біогенезу та ліпідні мембрани, і, нарешті, це може призвести до змінених рівнів мтДНК. Крім того, оскільки вірус використовує мітохондріальний механізм для реплікації, цілісність

мітохондріальної мембрани втрачається, вивільняючи мтДНК у цитозоль і кровообіг.

В умовах масивного пошкодження клітин при COVID-19, захисні мітохондріальні механізми, а також процеси мітофагії, під час яких пошкоджені мітохондрії фагоцитуються, можуть не працювати або можуть бути перевантажені, викликаючи вивільнення мітохондріальних DAMP у цитозоль і циркуляцію в величезні суми. Ці дії можуть викликати небажану прозапальну відповідь. Тому мтДНК може бути прогностичним біомаркером смертності та тяжкості захворювання пацієнтів з COVID-19 [51, 49, 32].

Також показано, що наявність позаклітинної мтДНК може супроводжуватися утворенням аутоантитіл до мітохондрій [31]. Позитивний результат на мітохондріальні антитіла може бути сигналом спричинених SARS-CoV-2 тяжких ускладнень для печінки [12].

Іншим типом нуклеотидних DAMP є АТФ. Як відомо, АТФ синтезується головним чином у мітохондріях АТФ-синтазою і є джерелом енергії у всіх живих організмів. Проте АТФ виділяється також різними типами клітин в умовах стресу. Наприклад, бактеріальні, гіпотонічні та механічні пошкодження епітеліальних клітин призводять до збільшення секреції АТФ. Високі рівні позаклітинного АТФ сприймаються лейкоцитами та сприяють релаксації, вазодилатації, нейротрансмісії, агрегації тромбоцитів, регуляції транспорту іонів, росту клітин та імунній відповіді. Зокрема, нейтрофіли активують хемотаксис, вивільняють ІЛ-8 та еластазу, підвищують адгезійну здатність до ендотеліальних клітин, викликають дегрануляцію та виробляють АФК та АТФ для подальшого посилення вродженої імунної відповіді. У моноцитах і макрофагах позаклітинний АТФ сприяє виробленню прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-18 [46].

### 1.3.2. DAMP пептидної природи

Одним із найбільш вивчених білкових DAMP є ядерний білок HMGB1 [15]. Вивільняючись з ядра, він поєднується з RAGE, TLR2 і TLR4 та, як наслідок, індукує шлях запальної відповіді NF-κB. Рівень HMGB1 може свідчити про тяжкість запалення та пошкодження тканин. Завдяки своїй фізіологічній функції, він може пов'язувати між собою білкову та нуклеотидну фракції DAMP, а також опосередковувати утворення нейтрофільних пасток [15,14,22,55].

Білки теплового шоку теж можуть вивільнятися у позаклітинний компартмент і сприяти активації імунних процесів. Переважно це так само відбувається після взаємодії з TLR завдяки активації запального шляху NF-κB, який посилює експресію прозапальних цитокінів [14].

Ще відомо, що при пошкодженні тканин може вивільнятися профілін-1, викликаючи фенотип запалення через механізм рецептора TLR11 [15].

### 1.3.3. DAMP олігопептидної природи

Вивільняючись в позаклітинний простір, гістони можуть активувати каскад імунних процесів. Взаємодіючи з TLR, комплементом і фосфоліпідами клітинної мембрани, вони викликають ендотеліальну і епітеліальну цитотоксичність та вивільнення прозапальних цитокінів/хемокінів через MyD88, NF-κB і NLRP3 інфламмасомозалежні шляхи [14].

В процесі руйнування мітохондрій в позаклітинний простір можуть вивільнюватися N-форміл пептиди. Мітохондріальні N-формілпептиди – це DAMP, які мають схожість з бактеріальними N-формілпептидами. Хоча ці пептиди відіграють вирішальну роль у синтезі білка бактерій і мітохондрій,

вони не використовуються в синтезі цитозольного білка еукаріот. Таким чином, мітохондріальні та бактеріальні N-форміл-пептиди розпізнаються вродженою імунною системою як патогени та відіграють роль у ініціації запалення шляхом активації рецептора форміл-пептиду [46, 33].

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дане дослідження включає декілька етапів:

В першому етапі дослідження було використано дані лабораторії ДУ «Зайцев В.В. Т. Інститут загальної та невідкладної хірургії НАМН України». Вони включають імунологічні показники зразків пацієнтів з COVID-19-асоційованою хірургічною абдомінальною патологією (панкреатит, панкреонекроз, холангіт, гостра шлунково-кишкова кровотеча), які проходили лікування в вищезгаданому інституті.

У пробах цих пацієнтів ( $n = 184$ ) протягом тривалого періоду після вірусної інфекції (через два місяці) визначали такі клітинні та сироваткові характеристики імунної системи такі як вміст DAMP, утворення АФК, аутоантитіл, та кластерів диференціювання CD3+HLA-DR+. За референсні або стандартні значення було взято середні значення досліджуваних показників, отриманих у цій лабораторії протягом тривалого часу (не менше року) у здорових осіб ( $n = 97$ ).

Другий етап пов'язаний з використанням даних результатів дослідження на експериментальних тваринах в НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

Щури лінії Vistar були п'ятикратно імунізовані зливою сироваткою крові пацієнтів груп А та С протягом 7 днів. Дизайн експерименту (Рис. 2.1) було заснований на розподілі щурів на групи імунізованих сироватками крові пацієнтів з ПКС, які мають підвищений вміст фракцій DAMP (238 нм) та (238+260 нм).

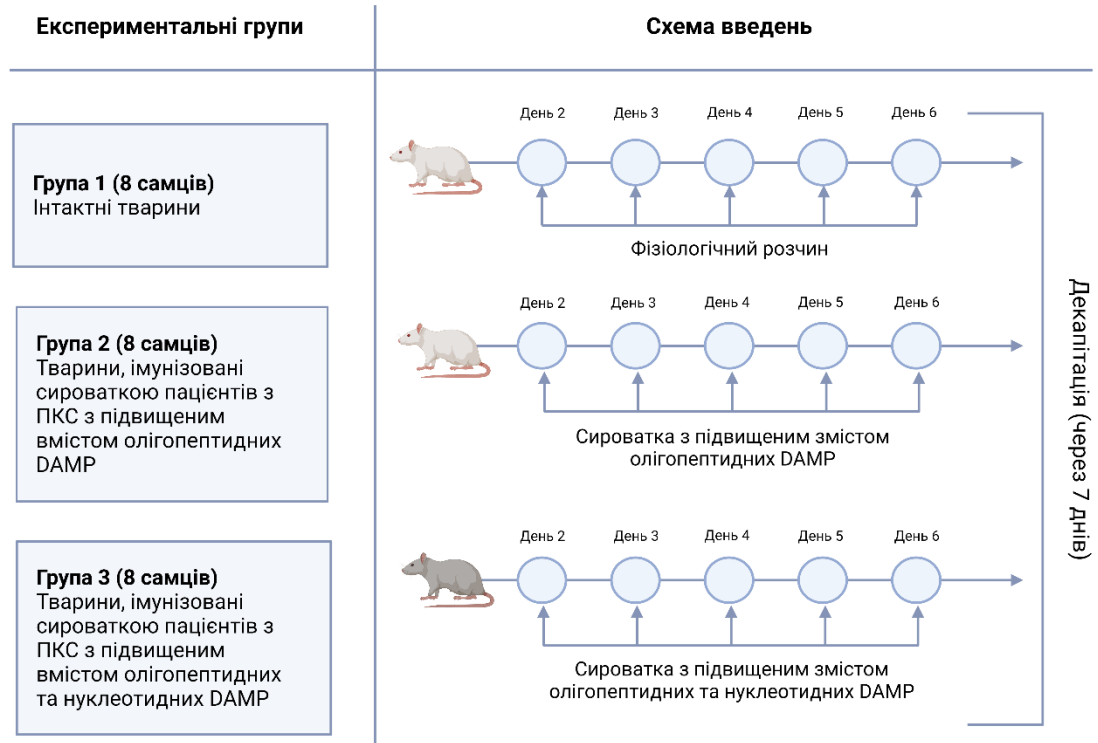


Рис. 2.1. Схематичне зображення дизайну експерименту. Перша група тварин (контроль), яка залишалась інтактною протягом усього експерименту. Друга група – це тварини, які були імунізовані сироваткою пацієнтів з ПКС, яка має підвищений вміст олігопептидних DAMP. Третя група – це тварини, які були імунізовані сироваткою пацієнтів з ПКС, яка має підвищений вміст олігопептидних та нуклеотидних DAMP. Концентрацію різних фракцій визначали спектрофотометрично.

У кожній дослідній групі було по 8 самців віком 4 місяці. Вони утримувались у стандартних умовах віварію та мали вільний доступ до їжі та води. Ці тварини були декапітовані за погодженням з біоетичним комітетом В.Н. Каразіна (протокол біоетичної комісії Харківського університету № 3 від 05.09.2021), а кров було забрано для досліджень.

## 2.1. Визначення концентрації різних фракцій DAMP

Щоб визначити різні фракції DAMP, було використано метод спектрофотометрії (СФ-46). Для підготовки проб 500 мкл 10%-го розчину трихлороцтової кислоти додавали до 1 мл сироватки крові і центрифугували отриману суміш при 3000 об/хв протягом 30 хвилин. Потім з кожної проби було відібрано і перенесено в окремі пробірки по 500 мкл супернатанту. До кожного зразку додавали 4.5 мл дистильованої води та визначали оптичну густину за різних довжин хвиль. Щоб ідентифікувати олігопептидну фракцію було використано 238 нм, пептидну – 254 нм, нуклеотидну – 260 нм, а фракцію ароматичних амінокислот – 280 нм. Дані подано в одиницях оптичної густини (од. Е).

## 2.2. Оцінка ступеню утворення активних форм кисню

Щоб оцінити результати НАДФН-оксидазної реакції у мітохондріях фагоцитів було досліджено утворення активних форм кисню методом конфокальної мікроскопії [43].

5 мкл розчину для визначення вільних форм кисню (набор Cellular Reaction Oxy, ab186028) змішали з 100 мкл клітинної суспензії (концентрація  $1.0 \times 10^6$  кл/мл у розчині) і інкубували 10 хвилин у темноті при кімнатній температурі. Після цього в отриману суміш додали 1 мкл 5мМ розчину барвника DRAQ5 і знову інкубували зразки при кімнатній температурі 5 хвилин. Клітинну суспензію внесли в лунки скляного слайду і накрили покривним склом. Потім поміщали ці зразки під лазерний скануючий конфокальний мікроскоп Olympus FV10i-LIV (Olympus, Японія) і через весь об'єм клітин проводили зйомку ряду горизонтальних оптичних зрізів з кроком 1,0 мкм.

### 2.3. Визначення специфічних аутоантитіл за допомогою імуофлуоресцентного методу

Метод непрямого імуофлуоресцентного аналізу з використанням моноклональних антитіл мічених барвником FITC (Набір реактивів EUROIMMUN, Німеччина) використовували для виявлення молекулярної мішені специфічних сироваткових антиядерних антитіл [7].

### 2.4. Визначення показників кисень-незалежного фагоцитозу нейтрофілів експериментальних тварин з використанням світлової мікроскопії

Для підготовки проб додаванням 2 г сухих дріжджів до 100 мл фізіологічного розчину було утворено суспензію дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [39]. Цю суспензію було змішано з цільною кров'ю дослідних тварин та інкубовано 1 годину за температури 37 °C. Після цього вміст інкубованих проб наносили на предметні скельця. Отримані мазки було пофарбовано та досліджено під імерсією за допомогою світлового мікроскопу (Olympus BX53).

Під час вивчення препаратів було визначено такі показники (Рис. 2.2):

Фагоцитарний індекс	Кількість клітин, що поглинули принаймні одну дріжджову клітину
Фагоцитарне число	Кількість поглинутих дріжджових клітин
Індекс завершеності фагоцитозу	Співвідношення фагоцитарних чисел через 30 хв і 120 хв

## Рис. 2.2. Показники, які визначались в процесі дослідження

### 2.5. Визначення концентрації розчинних циркулюючих імунних комплексів сироватки крові експериментальних тварин

Щоб визначати розчинні циркулюючі імунні комплекси, з кожного зразку сироватки досліджуваних тварин відбирали по дві проби. В одну з відповідних проб додавали 100 мкл сироватки крові, 200 мкл боратного буфера (рН 8,4) та 2,7 мл розчину поліетиленгліколю. Розчин поліетиленгліколю був утворений розчиненням 5 г поліетиленгліколю в 120 мл боратного буфера. В іншу пробу, контрольну, вносили лише 100 мкл сироватки крові та 2,7 мл розчину боратного буфера (рН 8,4). Обидві проби інкубували протягом 60 хвилин за кімнатної температури і досліджували їх оптичну густина за допомогою спектрофотометра СФ-46. Для визначення використовувалась довжина хвилі 450 нм.

Потім за формулою визначали концентрацію розчинних циркулюючих імунних комплексів:  $C_{CIC} = D_{450}^{\text{дослід.}} - D_{450}^{\text{контр.}}$

де  $C_{CIC}$  – концентрація розчинних циркулюючих імунних комплексів,

$D_{450}^{\text{дослід.}}$  та  $D_{450}^{\text{контр.}}$  – оптична густина за довжини хвилі 450 нм дослідної та контрольної проб.

Результати оцінювали в од. Е [3].

### 2.6. Визначення лімфоцитотоксичності методом Терасакі

В сироватці крові імунізованих тварин було визначено рівень лімфоцитотоксичності методом Терасакі. Цей метод припускає ідентифікацію

лімфоцитів з пошкодженою мембраною, які утворились через взаємодію аутоантитіл та комплекменту [50]

Така методика визначення вимагає декілька етапів:

1. Виділення лімфоцитів з цільної крові.

Для цього було використано гепаринізовану кров піддослідних щурів. Її розводили фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1. Цю суспензію було нашаровано на 2 мл фікол/верографін градієнтного розчину (у 20 мл 76% верографіну розчиняли 9,7 г фіколу). Після цього отримані зразки центрифугували 25 хвилин за 1500 обертів за хвилину. В результаті цього процесу були отримані лімфоцити, які було перенесено в окрему пробірку. Лімфоцити ресуспендували в 6 мл фізіологічного розчину і знову центрифугували 10 хвилин при 1500 обертах за хвилину. Після цього надосадову рідину видалили і повторили процедуру.

2. Приготування препаратів для дослідження.

Суспензію, отриману в минулому етапі, інкубували 30 хвилин при 37 °C разом із сироватками крові відповідних дослідних щурів. До кожної інкубованої проби додали по 1 краплі розчину комплекменту *Cavia porcellus* і знову інкубували їх при 37 °C протягом 2 годин.

Для оцінки результатів, було здійснено процедуру фарбування лімфоцитів двома барвниками. Спочатку до зразків було додано 1 краплю еозину і здійснено 10-хвилинну інкубацію при 37 °C. Потім до проб було додано 2 краплі метиленового синього і здійснено повторну інкубацію протягом 60 хвилин при 37 °C.

3. Отримання результатів дослідження

За допомогою камери Горяєва методом світлової мікроскопії (Olympus BX53) обрахували фарбовані та нефарбовані лімфоцити досліджуваних зразків. Щоб визначити рівень лімфоцитотоксичності, визначили відсоткове відношення кількості лімфоцитів з пошкодженою мембраною до загальної кількості лімфоцитів.

2.7. Визначення кластерів диференціювання на лімфоцитах методом проточної цитофлуориметрії

Щоб оцінити пізню активацію лімфоцитів, методами імунофлюоресцентного фарбування та проточної цитофлуориметрії було визначено кластери диференціювання CD3+HLA-DR+, оскільки експресія цього маркера найкраще відображає активаційний стан клітин [18, 9].

Для цього було використано барвники FITC, PE, PC5, PC7 та відповідні моноклональні антитіла. Одиницею вимірювання проточного цитометра був відсоток HLA-DR позитивних моноцитів (%).

2.8. Методи обробки даних

Дані представлені середніми значеннями та помилками середнього. Обчислення проводилися за допомогою математичного процесора Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США).

Візуалізація числових даних проводились мовою програмування R в середовищі RStudio (RStudio, США), а нечислових – програмою BioRender (Biorender, Канада).

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

## I етап досліджень

## 3.1. Визначення рівню цитотоксичних фракцій DAMP

За допомогою різних довжин хвиль було визначено цитотоксичні фракції DAMP (при  $\lambda = 238$  нм було ідентифіковано олігопептидну фракцію, при  $\lambda = 254$  нм – пептидну, при  $\lambda = 260$  нм – нуклеотидну та при  $\lambda = 280$  нм – фракцію ароматичних амінокислот) у пацієнтів з постковідним синдромом. Виходячи з цих даних (рис. 3.1), пацієнтів було розподілено на три групи (рис. 3.2).

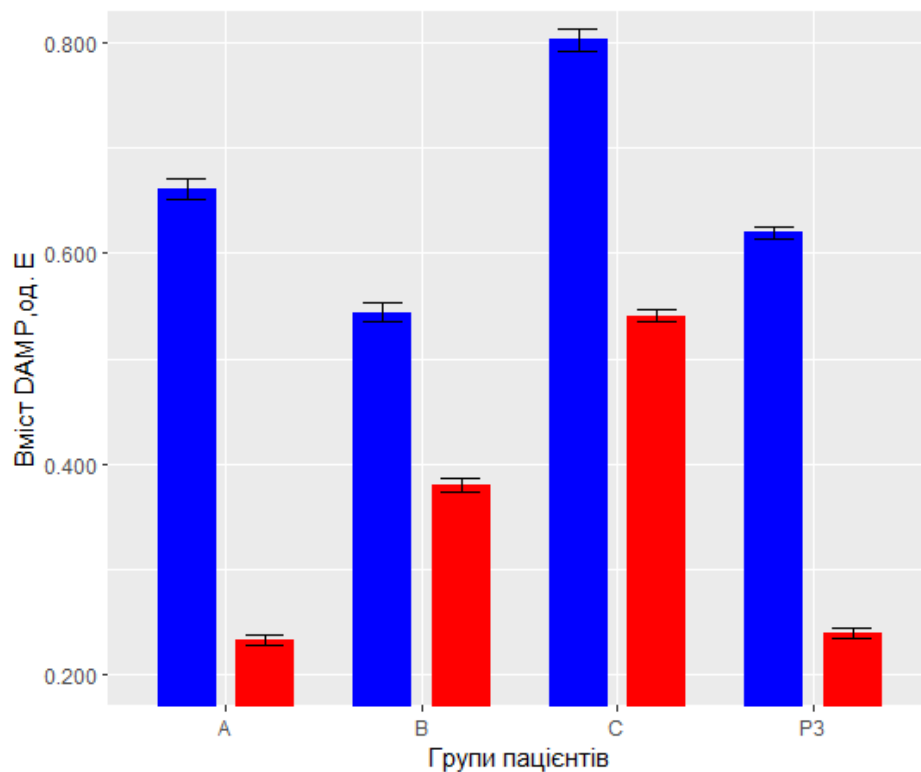


Рис. 3.1. Вміст цитотоксичних фракцій DAMP у пацієнтів під час постковідного синдрому (синім позначено вміст DAMP при 238 нм, червоним – при 260 нм)

Група А включає пацієнтів, в чиїх зразках виявлено підвищені значення олігопептидної фракції DAMP. Пацієнти, які були розподілені в групу В, мають підвищену нуклеотидну фракцію. До третьої групи (групи С) було віднесено тих пацієнтів, чиї зразки мають як підвищену нуклеотидну фракцію, так і олігопептидну (Рис. 3.1, рис. 3.2).

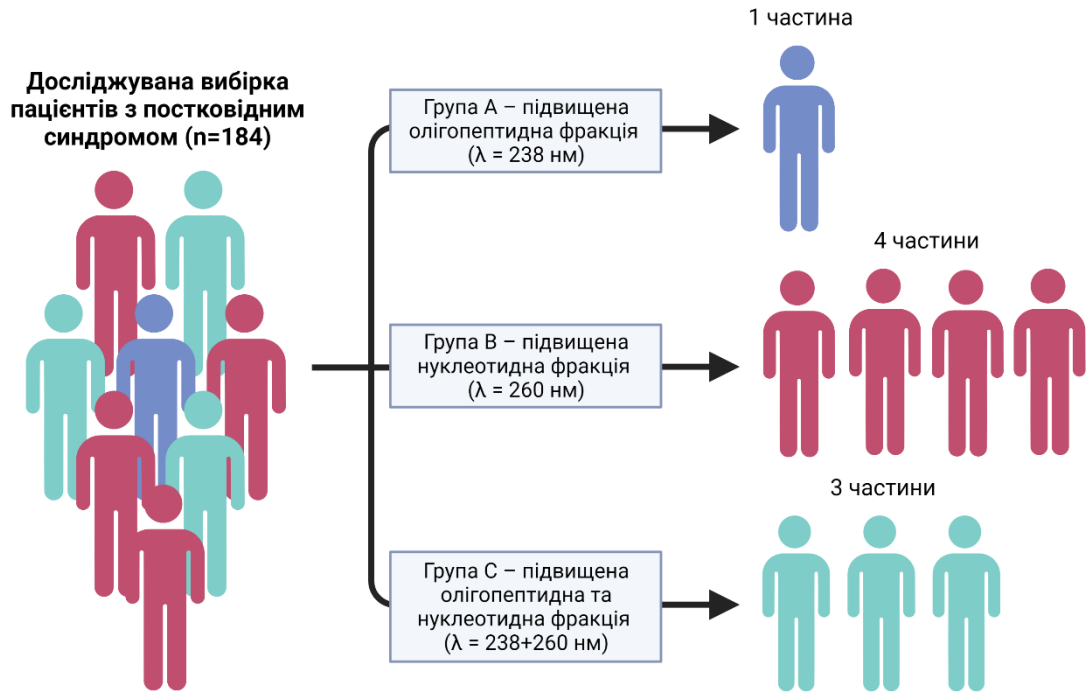


Рис. 3.2. Розподіл пацієнтів з ПКС на групи за вмістом DAMP в їхніх зразках. Розподіл виглядає наступним чином: зі 184 пацієнтів 1 частина була віднесена до групи А, чиї показники мали підвищену олігопептидну фракцію DAMP, 4 частини було віднесено до групи В, які мали підвищену лише нуклеотидну фракцію DAMP та 3 частини – до групи С, які мали підвищену як олігопептидну, так нуклеотидну фракції.

### 3.2. Оцінка ступеню утворення активних форм кисню

Зразки вищезгаданих трьох груп пацієнтів було проаналізовано на утворення активних форм кисню для оцінки ендоцитозу DAMP і PAMP під час кисень-залежного фагоцитозу.

Було з'ясовано, що пацієнти групи С, які мають збільшену кількість олігопептидних та нуклеотидних DAMP, мають найбільшу концентрацію АФК відносно інших груп (Рис. 3.5). Для порівняння наведено мікрофотографії утворення АФК для пацієнтів групи А та групи В (Рис. 3.3, 3.4).

Через вивільнення АФК відбувається апонекроз лімфоцитів, в результаті якого розпадаються як лімфоцитарні мембрани, так і ДНК. Це спричиняє апоптоз нейтрофілів та сенсibilізацію клітин у пацієнтів з ПКС, які мають підвищену олігопептидну та нуклеотидну фракції DAMP порівняно з іншими групами. Для порівняння наведено мікрофотографію групи А (Рис. 3.6, 3.7).

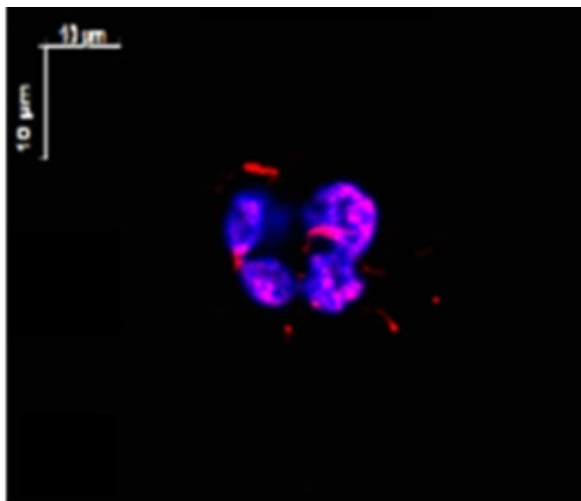


Рис. 3.3. Локалізація АФК в нейтрофілах пацієнта групи А (конфокальна мікроскопія).

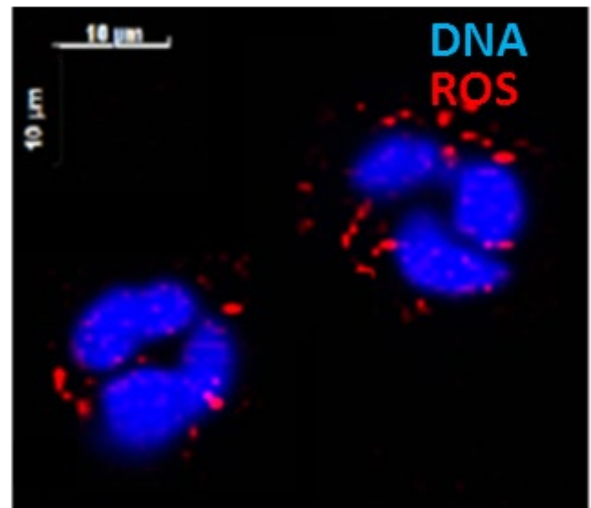


Рис. 3.4. Локалізація АФК в нейтрофілах пацієнта групи В (конфокальна мікроскопія).

Синій колір показує флуоресценцію ядер через зв'язування барвника DRAQ5 з ДНК. Червоним кольором відображено флуоресценцію АФК на мембранах клітинних структур нейтрофілів.

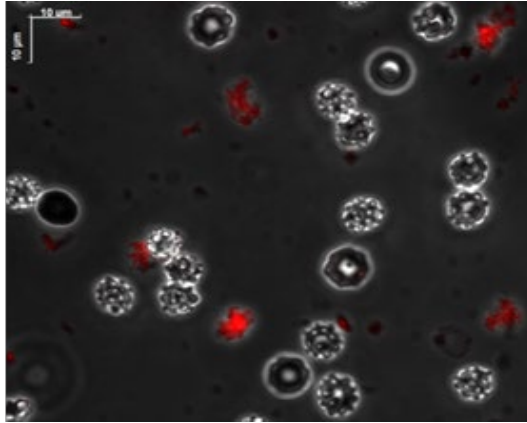


Рис. 3.5. Концентрація АФК у пацієнтів групи С (конфокальна мікроскопія). Червоне забарвлення показує флуоресценцію клітин атакованих АФК, що призвело до їх руйнування.

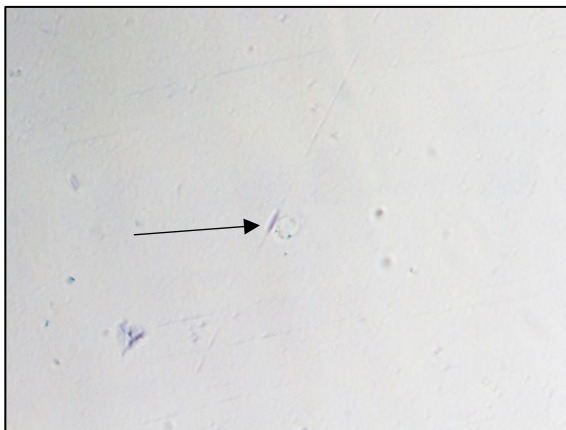


Рис. 3.6. Нативний лімфоцит пацієнта групи А. Мембрана не пошкоджена, забарвлення відбувається. (Світлова мікроскопія, збільшення x40).

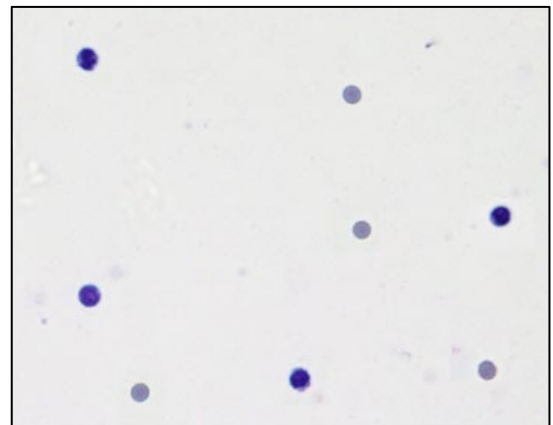


Рис. 3.7. Лімфоцити з різним ступенем деградації мембрани у пацієнта групи С (проникнення барвника). (Світлова мікроскопія, збільшення x40).

### 3.3. Визначення рівня молекул маркера пізньої активації лімфоцитів CD3+HLA-DR+

Група пацієнтів С, чиїм зразкам притаманне одночасне збільшення олігопептидних та нуклеотидних DAMP, має підвищений рівень маркера пізньої активації лімфоцитів CD3+HLA-DR+ на 55% (Рис. 3.9) порівняно з іншими групами пацієнтів. Для порівняння наведено показник групи А (Рис. 3.8).

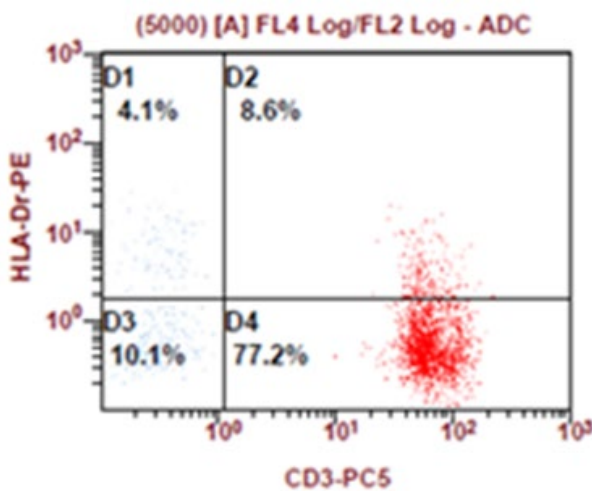


Рис. 3.8. Відносний рівень маркера пізньої активації лімфоцитів (CD3+HLA-DR+) у пацієнта групи А

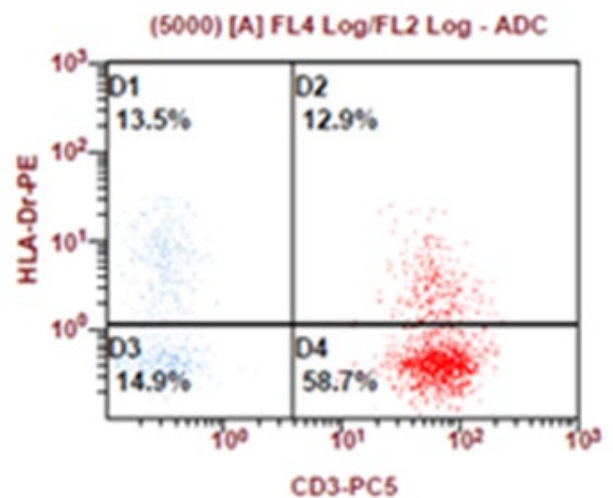


Рис. 3.9. Відносний рівень маркера пізньої активації лімфоцитів (CD3+HLA-DR+) у пацієнта групи С

Виходячи з цих даних, можна сказати про те, що група пацієнтів з підвищеним вмістом олігопептидних та нуклеотидних DAMP має пізню активацію запальної реакції. Це дає можливість говорити про хронізацію запалення та незворотність процесів в їх організмах.

### 3.4. Визначення специфічних аутоантитіл імунофлуоресцентним методом

На відміну від інших груп, у зразках пацієнтів групи С, які мають одночасно підвищений вміст нуклеотидної та олігопептидної фракцій DAMP, було виявлено аутоантитіла до мітохондрій (Рис. 3.10).

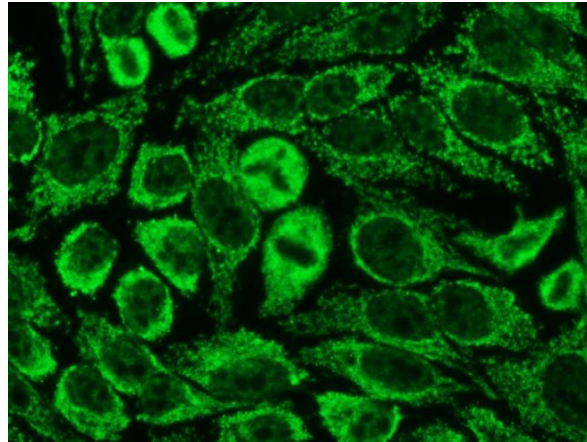


Рис. 3.10. Аутоантитіла до мітохондрій (флуоресцентна мікроскопія)

Це може бути пов'язано з порушенням функцій мітохондрій, їх руйнуванням та вивільненням з них олігопептидних DAMP. Вони еволюційно є наближеними до бактеріальних білків і спричиняють розпізнавання мітохондрій як патогенних частинок.

### **II етап досліджень**

У тварин 2 та 3 груп (де перша була імунізована сироваткою групи пацієнтів з підвищеним вмістом олігопептидних DAMP, а друга – сироваткою з одночасно збільшеними показниками олігопептидних та нуклеотидних DAMP) спостерігалися нерівномірні перепади ваги тіла (таблиця 3.2). Такі фізіологічні зміни можна пов'язати з перебігом потужних імунологічних процесів, які відбуваються під час імунізації експериментальних тварин сироваткою пацієнтів з ПКС.

Таблиця 3.2.

Вага тіла експериментальних тварин упродовж експерименту

Групи тварин	Номер тварин	Номер зважування (г)			
		1	2	3	4
Група 1 Інтактні тварини	5.1	116	134	132	170
	5.2	124	133	133	167
	5.3	110	109	104	138
Група 2 ( $\lambda=238$ нм)	2.4	116	127	119	150
	2.5	144	147	148	174
	2.6	116	121	119	151
Група 3 ( $\lambda=238+260$ нм)	4.10	146	160	158	188
	4.11	112	111	106	131
	4.12	148	161	157	199

3.5. Дослідження ступеню цитотоксичності сироватки крові за допомогою тесту Терасакі

Ступінь лімфоцитотоксичності тварин, які були імунізовані патологічними цитотоксичними сироватками пацієнтів з постковідним синдромом, був значно підвищений (Рис. 3.11) порівняно з референтним значенням ( $22,2 \pm 1,4$  %).

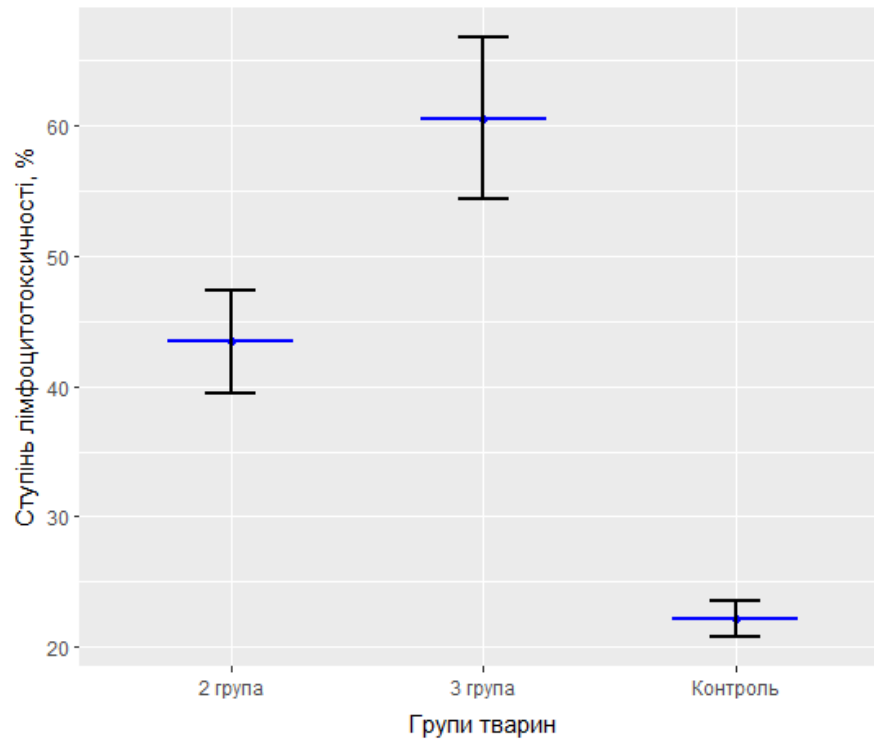


Рис. 3.11. Оцінка ступеню лімфоцитотоксичності сироватки крові імунізованих тварин за допомогою тесту Терасакі

Проте, порівнюючи цитотоксичність другої та третьої груп, можна помітити, що група, яка була імунізована сироваткою з підвищеним змістом олігопептидних та нуклеотидних DAMP, має майже вдвічі вищий рівень цитотоксичності ( $60,5 \pm 6,2$  %) ніж просто олігопептидною ( $43,4 \pm 3,9$  %). Це пов'язано з тим, що молекули DAMP, чинячи токсичний вплив на організм, не мають видоспецифічної дії і так само спричиняють хронічні запальні процеси в організмах щурів.

### 3.6. Показники кисень-незалежного фагоцитозу нейтрофілів експериментальних тварин з використанням світлової мікроскопії

Говорячи про зміни кисень-незалежного фагоцитозу, можна відмітити що група 2, яка була імунізована сироваткою з підвищеним вмістом олігопептидних DAMP, не мала значної різниці (Рис. 3.12) показнику

завершеності фагоцитозу ( $1.15 \pm 0,24$ ) порівняно з контролем ( $1.27 \pm 0,21$ ). В той же час як група 3, імунізована сироваткою з підвищеним змістом олігопептидних та нуклеотидних DAMP, мала це число нижчим майже в 1.5 рази порівняно з референтним значенням ( $0,85 \pm 0,08$ ).

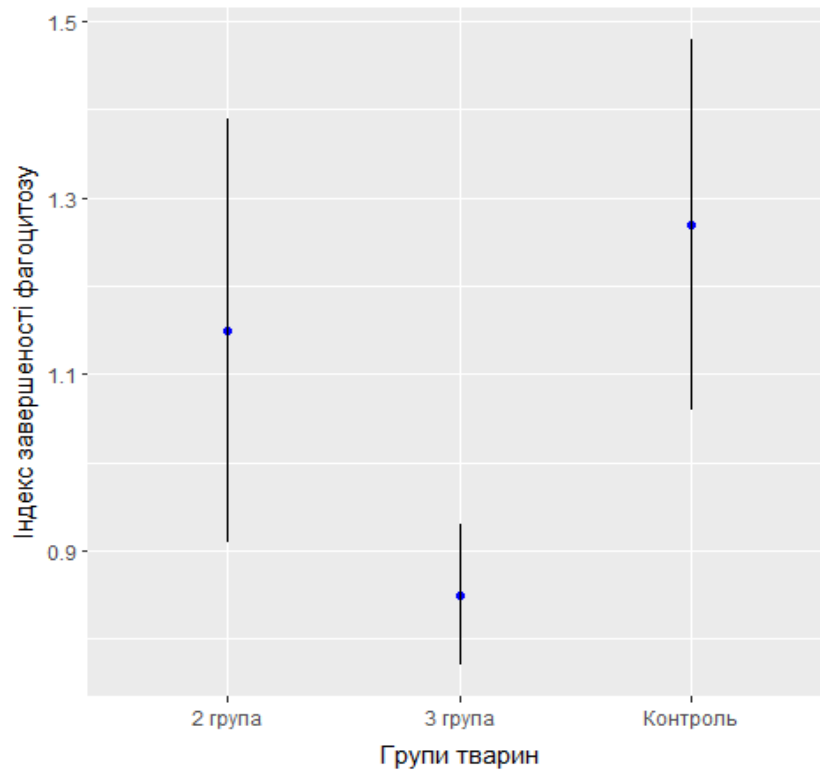


Рис. 3.12. Індекс завершеності (інтенсивність) фагоцитозу імунізованих тварин

Такі дані свідчать про зниження перетравлюючої функції лізосомальних ферментів нейтрофілів.

Фагоцитарне число тварин групи 2 ( $2.93 \pm 0,94$ ), імунізованої сироваткою з підвищеним вмістом олігопептидних DAMP, було нижчим порівняно з референтним значенням ( $4.49 \pm 1,12$ ). Проте група 3, імунізована сироваткою з підвищеним змістом олігопептидних та нуклеотидних DAMP, має значно вище фагоцитарне число ( $5.27 \pm 1,24$ ), що свідчить про велике імунне навантаження групи 3 (Рис 3.13).

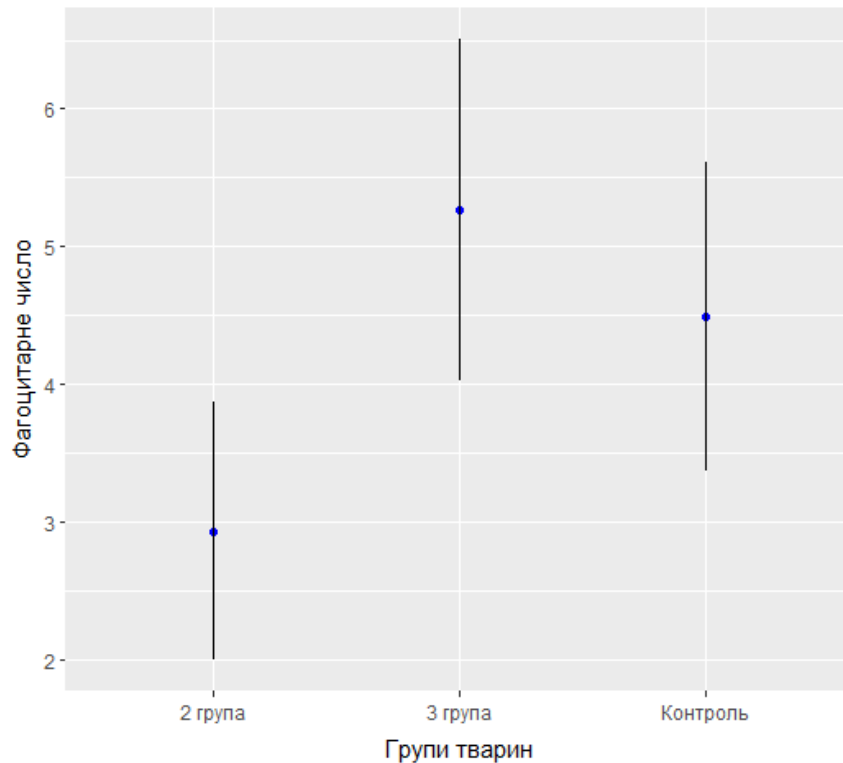


Рис. 3.13. Фагоцитарне число імунізованих тварин

Причиною цього може бути вивільнення мітохондріальних DAMP внаслідок їх дисфункції, які еволюційно подібні бактеріальним. Тому вони можуть упізнаватись імунною системою не лише як DAMP, але й PAMP, і саме тому викликати більш інтенсивні імунні відповіді.

Групи 2 та 3 (Рис. 3.14), які були імунізовані сироваткою з підвищеними олігопептидною, олігопептидною та нуклеотидною фракціями DAMP, мають знижений фагоцитарний індекс ( $66,0 \pm 3,6$  та  $63,5 \pm 3,9$  відповідно) порівняно з контролем ( $79,6 \pm 6,2$ ).

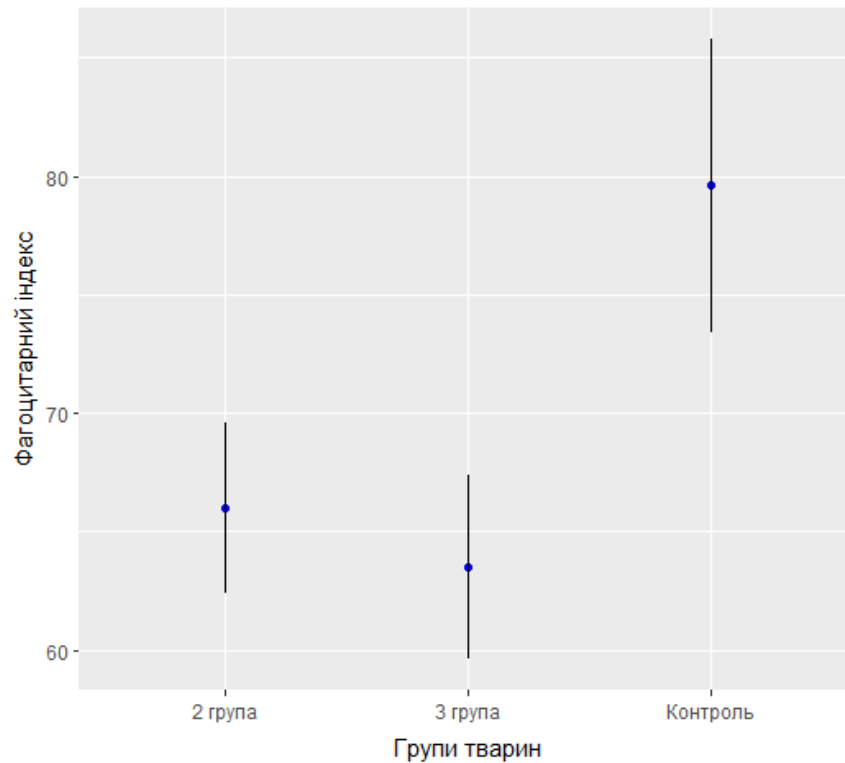


Рис. 3.14. Фагоцитарний індекс імунованих тварин

Такі результати можуть сигналізувати про пригнічення хемотаксичних процесів та адгезії.

### 3.7. Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів

Група піддослідних тварин 2, імунована сироваткою з підвищеним вмістом олігопептидних DAMP, не має значних змін концентрації циркулюючих імунних комплексів ( $78,4 \pm 4,9$  од.Е) порівняно з контрольною групою. Але група 3, імунована сироваткою з підвищеним вмістом олігопептидних та нуклеотидних DAMP, має підвищену концентрацію (Рис. 3.15) циркулюючих імунних комплексів приблизно в 1.5 рази ( $122,1 \pm 8,1$  од.Е).

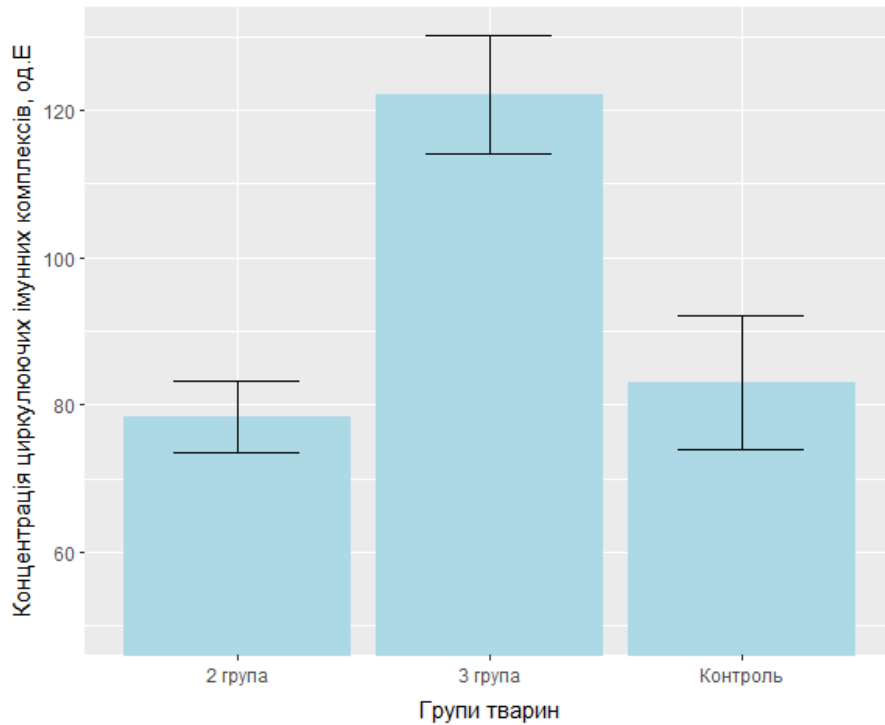


Рис. 3.15. Концентрація циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові імунізованих тварин

Така тенденція для групи 3 є наслідком того, що імунні комплекси, які утворюються, не виводяться з кровообігу. Така зміна концентрації циркулюючих імунних комплексів може поглиблювати ступінь запальної реакції і свідчити про неефективність механізмів фагоцитозу.

## ВИСНОВКИ

1) Виявлено, що зразки сироватки крові пацієнтів після двомісячного перебігу інфекції SARS-CoV-2, чий стан ідентифіковано як патологічний, характеризуються гетерогенним змістом фракцій цитотоксичних молекул DAMP. Основним патогенетичним фактором постковідного синдрому є нуклеотидна фракція DAMP, яка володіє вираженою цитотоксичною дією.

2) Підвищення вмісту олігопептидної та нуклеотидної фракцій DAMP у пацієнтів з ПКС характеризується збільшенням ступеню утворення активних форм кисню порівняно з іншими групами. З огляду на збільшення значення маркера пізньої активації лімфоцитів CD3+HLA-DR+, причиною такого рівня АФК може хронічність запальної реакції пацієнтів, що призвела до дисфункції мітохондрій, які регулюють цей процес. Надмірна кількість АФК спричиняє пошкодження та руйнування лімфоцитів, що дозволяє внутрішньоклітинному вмісту виходити в позаклітинний простір і, таким чином, вивільняти DAMP.

3) Враховуючи наявність мітохондріальних аутоантитіл, можна припустити що серед вивільненого пулу молекул та органел мітохондрії мають найбільшу імуногенність. Тому можна припустити, що джерелом олігопептидних та нуклеотидних фракцій DAMP, які спричиняють такі каскади імунних реакцій, є фрагменти мітохондріальної ДНК та N-форміл-пептиди, які вивільнились внаслідок дисфункції мітохондрій та руйнування лімфоцитів.

4) Проводячи дослідження на експериментальних тваринах, було виявлено, що фізіологічні параметри імунізованих тварин корелювали зі змінами досліджуваних показників. Тварини, які були імунізовані сироваткою з підвищеним вмістом олігопептидної та нуклеотидної фракцій DAMP пацієнтів з ПКС, характеризуються збільшенням концентрації циркулюючих імунних комплексів та цитотоксичності сироватки крові порівняно з іншими

групами. Це пов'язано зі зниженням фагоцитарної активності та підвищенням навантаження на їхню імунну систему, що свідчить про хронізацію процесу, як це було і у відповідної групи пацієнтів.

5) Отримані результати показують високу синергійну імунну активність олігопептидної та нуклеотидної фракції DAMP як у пацієнтів з постковідним синдромом, так і у експериментальних тварин і свідчать про неспецифічну дію цих молекул. Отже, дія цих молекул є неспецифічною і знання цих механізмів може бути використане не лише в розрізі людських патогенезів, але й інших організмів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Запалення – типовий патологічний процес / М. Регада та ін. 2-ге вид. Львів, 2013. 148 с.
2. Кузнецова Л., Бабаджан В., Харченко Н. Імунологія : підручник. Вінниця : ТОВ «Меркьюрі Поділля», 2013. 230 с.
3. [43] Isolation of soluble immune complexes from human serum: Combined use of polyethylene glycol precipitation, gel filtration, and affinity chromatography on protein A-sepharose / G. Virella et al. *Methods in enzymology*. 1981. P. 644–663. URL: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)74045-x](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)74045-x)
4. Alexander M., O'Connell R. M. Noncoding RNAs and chronic inflammation: micro-managing the fire within. *BioEssays*. 2015. Vol. 37, no. 9. P. 1005–1015. URL: <https://doi.org/10.1002/bies.201500054>
5. Aoki T., Narumiya S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends in pharmacological sciences*. 2012. Vol. 33, no. 6. P. 304–311. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.004>
6. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases / A. Leuti et al. *Advanced drug delivery review*. 2020. No. 159. P. 133–169.
7. Biochemistry, antinuclear antibodies (ANA) - statpearls - NCBI bookshelf. *National Center for Biotechnology Information*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537071/>
8. Brusselle G., Bracke K. Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of the american thoracic society*. 2014. Vol. 11, Supplement 5. P. S322–S328. URL: <https://doi.org/10.1513/annalsats.201403-118aw>
9. Can CD3+/HLA-DR+ activated T cells predict the prognosis of non-Hodgkin's lymphoma patients? / L. Váróczy et al. *Immunology letters*. 2005. Vol. 97, no. 1. P. 155–157. URL: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.10.005>

10. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span / D. Furman et al. *Nature medicine*. 2019. Vol. 25, no. 12. P. 1822–1832. URL: <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
11. Circulating multimeric immune complexes contribute to immunopathology in COVID-19 / J. Ankerhold et al. *Nature communications*. 2022. Vol. 13, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32867-z>
12. Colapietro F., Lleo A., Generali E. Antimitochondrial antibodies: from bench to bedside. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2021. URL: <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08904-y>
13. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. *World Health Organization (WHO)*. <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>
14. Damage-Associated molecular patterns and their signaling pathways in primary blast lung injury: new research progress and future directions / N. Li et al. *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21, no. 17. P. 6303. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21176303>
15. Damage-Associated molecular patterns and the systemic immune consequences of severe thermal injury / P. B. Comish et al. *The journal of immunology*. 2020. Vol. 205, no. 5. P. 1189–1197. URL: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000439>
16. Danger-Associated molecular patterns derived from the extracellular matrix provide temporal control of innate immunity / C. W. Frevert et al. *Journal of histochemistry & cytochemistry*. 2018. Vol. 66, no. 4. P. 213–227. URL: <https://doi.org/10.1369/0022155417740880>
17. Detection and functional resolution of soluble immune complexes by an FcγR reporter cell panel / H. Chen та ін. *EMBO molecular medicine*. 2021. T. 14, № 1. URL: <https://doi.org/10.15252/emmm.202114182>

18. Detection of cytoplasmic CD antigens within normal human peripheral blood leucocytes / G. P. Sandilands et al. *Immunology*. 2003. Vol. 108, no. 3. P. 329–337. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01591.x>
19. Fleit H. B. Chronic inflammation. *Pathobiology of human disease*. 2014. P. 300–314. URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386456-7.01808-6>
20. Fullerton J. N., Gilroy D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews drug discovery*. 2016. Vol. 15, no. 8. P. 551–567. URL: <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.39>
21. High mobility group box 1 (HMGB1): a pivotal regulator of hematopoietic malignancies / S. Yuan et al. *Journal of hematology & oncology*. 2020. Vol. 13, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00920-3>
22. Immune complexes as culprits of immunopathology in severe COVID-19 / P. Kolb et al. *Medical microbiology and immunology*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00743-8>
23. Influence of inflammation in the process of T lymphocyte differentiation: proliferative, metabolic, and oxidative changes / M. A. Moro-García et al. *Frontiers in immunology*. 2018. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00339>
24. I Rivas Ortiz C., Isabel Castillo Rodal A. Macrophage: from recognition of foreign agents to late phagocytosis. *Phagocytosis - main key of immune system*. 2023. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.110508>
25. Jensen S. B., Paludan S. R. Sensing the hybrid--a novel PAMP for TLR9. *The EMBO Journal*. 2014. Vol. 33, no. 6. P. 529–530. URL: <https://doi.org/10.1002/emboj.201487747>
26. Joshi I., Carney W. P., Rock E. P. Utility of monocyte HLA-DR and rationale for therapeutic GM-CSF in sepsis immunoparalysis. *Frontiers in immunology*. 2023. Vol. 14. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1130214>

27. Lawrence T. The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold spring harbor perspectives in biology*. 2009. T. 1, № 6.
28. Low molecular weight cytotoxic components (DAMPs) form the post-COVID-19 syndrome / E. M. Klimova et al. *Immunobiology*. 2023. Vol. 228, no. 1. P. 152316. URL: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152316>
29. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010. Vol. 140, no. 6. P. 771–776. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
30. Mitochondrial DNA and anti-mitochondrial antibodies in serum of autistic children / B. Zhang et al. *Journal of neuroinflammation*. 2010. Vol. 7, no. 1. P. 80. URL: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-80>
31. Mitochondrial DNA and COVID-19. *Encyclopedia MDPI | Scholarly Community*. URL: <https://encyclopedia.pub/entry/14197>
32. Mitochondrial N-formyl peptides cause airway contraction and lung neutrophil infiltration via formyl peptide receptor activation / C. F. Wenceslau et al. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2016. Vol. 37. P. 49–56. URL: <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2016.02.005>
33. Moghadam Z. M., Henneke P., Kolter J. From flies to men: ROS and the NADPH oxidase in phagocytes. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021. Vol. 9. URL: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628991>
34. Monocytic HLA-DR expression in immune responses of acute pancreatitis and COVID-19 / S. Liu et al. *International journal of molecular sciences*. 2023. Vol. 24, no. 4. P. 3246. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24043246>
35. Nakahira K., Hisata S., Choi A. M. K. The roles of mitochondrial damage-associated molecular patterns in diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2015. Vol. 23, no. 17. P. 1329–1350. URL: <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6407>
36. National center for biotechnology information. *National Center for Biotechnology Information*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

37. Neutrophils and macrophages as targets for development of nanotherapeutics in inflammatory diseases / Y. Su et al. *Pharmaceutics*. 2020. Vol. 12, no. 12. P. 1222. URL: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121222>
38. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes / M. I. Muniz-Junqueira et al. *Clinical diagnostic laboratory immunology*. 2003. Vol. 10, no. 6. P. 1096–1102. URL: <https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.1096-1102.2003>
39. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity / D. Tang et al. *Immunological reviews*. 2012. Vol. 249, no. 1. P. 158–175. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2012.01146.x>
40. Patel S. Danger-Associated molecular patterns (damps): the derivatives and triggers of inflammation. *Current allergy and asthma reports*. 2018. Vol. 18, no. 11. URL: <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0817-3>
41. PubChem. *PubChem*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
42. Reduced levels of reactive oxygen species correlate with inhibition of apoptosis, rise in thioredoxin expression and increased bovine leukemia virus proviral loads / A. Bouzar et al. *Retrovirology*. 2009. Vol. 6, no. 1. P. 102. URL: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-102>
43. Regulation of tissue infiltration by neutrophils / P. Subramanian et al. *Current opinion in hematology*. 2016. Vol. 23, no. 1. P. 36–43. URL: <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000198>
44. Release mechanisms of major DAMPs / A. Murao et al. *Apoptosis*. 2021. Vol. 26, no. 3-4. P. 152–162. URL: <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>
45. Rodríguez-Nuevo A., Zorzano A. The sensing of mitochondrial DAMPs by non-immune cells. *Cell stress*. 2019. Vol. 3, no. 6. P. 195–207. URL: <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.190>

46. Rosales C., Uribe-Querol E. Phagocytosis: a fundamental process in immunity. *BioMed research international*. 2017. Vol. 2017. P. 1–18. URL: <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
47. Serhan C. N., Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*. 2005. Vol. 6, no. 12. P. 1191–1197. URL: <https://doi.org/10.1038/ni1276>
48. Shenoy S. Coronavirus (Covid-19) sepsis: revisiting mitochondrial dysfunction in pathogenesis, aging, inflammation, and mortality. *Inflammation research*. 2020. Vol. 69, no. 11. P. 1077–1085. URL: <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01389-z>
49. TERASAKI P. I., McCLELLAND J. D. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature*. 1964. Vol. 204, no. 4962. P. 998–1000. URL: <https://doi.org/10.1038/204998b0>
50. The impact of DAMP-mediated inflammation in severe COVID-19 and related disorders / U. Parthasarathy et al. *Biochemical pharmacology*. 2022. Vol. 195. P. 114847. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114847>
51. Townamchai N., Safa K., Chandraker A. Immunologic monitoring in kidney transplant recipients. *Kidney research and clinical practice*. 2013. Vol. 32, no. 2. P. 52–61. URL: <https://doi.org/10.1016/j.krcp.2013.04.002>
52. Uribe-Querol E., Rosales C. Phagocytosis: our current understanding of a universal biological process. *Frontiers in immunology*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
53. Zhou Y., Hong Y., Huang H. Triptolide attenuates inflammatory response in membranous glomerulo-nephritis rat via downregulation of nf-kb signaling pathway. *Kidney and blood pressure research*. 2016. Vol. 41, no. 6. P. 901–910. URL: <https://doi.org/10.1159/000452591>

54. Jo A., Kim D. W. Neutrophil Extracellular Traps in Airway Diseases: Pathological Roles and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, no. 5. P. 5034. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24055034>
55. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology / A. Hidalgo et al. *Cardiovascular Research*. 2021. URL: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab329>
56. Tan C., Aziz M., Wang P. The vitals of NETs. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1002/jlb.3ru0620-375r>
57. Prevalence and predictors of Post-Acute COVID-19 Syndrome (PACS) after hospital discharge: A cohort study with 4 months median follow-up / I. M. Tleyjeh et al. *PLOS ONE*. 2021. Vol. 16, no. 12. P. e0260568. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260568>