

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БЕЗНОЩЕНКО

Ольга Сергеевна

**ОСОБЕННОСТИ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У
ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 В ПЕРИОД ЗАБОЛЕВАНИЯ И
РЕКОНВАЛЕСЦЕНЦИИ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук Иванец Т.Ю.

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ВЛИЯНИЕ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ SARS-COV-2, НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА	15
1.1. Новая коронавирусная инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, и факторы риска, предрасполагающие к развитию COVID-19 тяжёлой степени.....	15
1.1.1. Цитокиновый шторм и система гемостаза	18
1.1.2. Коагулопатия, ассоциированная с COVID-19.....	19
1.1.3. Эндотелиальная дисфункция при COVID-19.....	22
1.1.4. Фибринолитическая система при COVID-19	25
1.2. Тромботические осложнения при COVID-19.....	27
1.3. Состояние системы гемостаза после перенесённого COVID-19.....	29
1.4. Современные методы исследования системы гемостаза	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1. Дизайн и общий объем исследования	42
2.2. Материалы исследования	45
2.3. Лабораторные методы исследования	46
2.3.1. Коагулометрические методы	48
2.3.2. Ротационная тромбоэластометрия ТЭМ.....	53
2.3.3. Тест генерации тромбина	55
2.3.4. Определение антигена и активности ADAMTS-13	56
2.4. Проведение контроля качества лабораторных исследований	57
2.5. Статистический анализ	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	59
3.1. Характеристика групп пациентов с COVID-19.....	59
3.2. Особенности состояния системы гемостаза у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции.....	61
3.2.1. Параметры плазменного гемостаза у пациентов с COVID-19 различной	

степени тяжести.....	61
3.2.2. Параметры тромбоэластометрии ТЭМ у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести.....	67
3.2.3. Параметры теста генерации тромбина у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания.....	73
3.3. Оценка эндотелиальной дисфункции у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции.....	78
3.3.1. Определение антигена и активности ADAMTS-13	78
3.3.2. Определение волчаночного антикоагулянта у пациентов с COVID-19	81
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	84
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
Схема лабораторного исследования параметров системы гемостаза у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции...	93
ВЫВОДЫ	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

АФА – антифосфолипидные антитела

АФС – антифосфолипидный синдром

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

БТП – бедная тромбоцитами плазма

ВА – волчаночный антикоагулянт

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВТЭ – венозная тромбоэмболия

ВЭТ – вязкоэластичный тест

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДВС – синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови

ДИ – доверительный интервал

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИМТ – индекс массы тела

КТ – компьютерная томография

МНО – международное нормализованное отношение

НМГ – низкомолекулярный гепарин

НФГ – нефракционированный гепарин

ОАК – общеклинический анализ крови

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ПВ – протромбиновое время

ПДФ – продукты деградации фибрина

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПС – протеин С

PS – протеин S

РИ – референсный интервал

РТФ – рекомбинантный тканевой фактор человека
СРБ – С-реактивный белок
ТВ – тромбиновое время
ТД – тест тромбодинамика
ТМ – тромбомодулин
ТТП – тромботическая тромбоцитопеническая пурпура
ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии
ТО – тромботические осложнения
ТЭО – тромбоэмболические осложнения
ТФ – тканевой фактор
ТЭМ –тромбоэластомерия
ФНО- α – фактор некроза опухоли α
ЭКМО – экстракорпоральная мембранная оксигенация
ЭК – эндотелиальные клетки
ЦЭК - циркулирующие эндотелиальные клетки
цАМФ - циклический аденозинмонофосфат
АСЕ₂ – ангиотензинпревращающий фермент
ADAMTS-13 – дезинтегрин-подобная металлопротеиназа с мотивом
тромбоспондина 1, 13
AUC – Area Under the Curve (площадь под кривой)
CAC – COVID19-ассоциированная коагулопатия
COVID-19 – COrona VIRus Disease 2019 (острая респираторная инфекция,
вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2)
ISTH – международное общество по тромбозу и гемостазу
ICAM-1 – растворимая молекула межклеточной адгезии-1
IFN-I (IFN- α/β) – интерферон I типа
IL-1 β – интерлейкин-1 β
IL-6 – интерлейкин-IL-6
IL-18 – интерлейкин-18
IL-1ra-антагонист рецептора IL-1

MASP-2 – комплемент-связывающий фермент

NETs – внеклеточные ловушки нейтрофилов (сетки)

PAI – ингибитор активатора плазминогена

ROTEM – ротационная тромбоэластометрия

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SIC – сепсис-индуцированная коагулопатия (sepsis-induced coagulopathy)

Se – чувствительность

Sp – специфичность

TFPI – ингибитор пути тканевого фактора

TMPRSS₂ – мембраносвязанная сериновая протеаза

vWF – фактор Виллебранда

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень её разработанности

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 представляет глобальную проблему человечества на современном этапе развития. Пандемия, вызванная широким распространением нового РНК-содержащего Бетакоронавируса SARS-CoV-2, охватила более 700 млн человек, а число зарегистрированных летальных исходов достигло практически 7 млн [1]. Инфекция SARS-CoV-2 может запускать в организме человека такие иммунопатологические механизмы, как воспаление, апоптоз, эндотелиальную дисфункцию, цитокиновый шторм, гиперактивацию комплемента и свертывания крови [2]. К настоящему времени известно, что COVID-19 протекает в различных формах, а именно от бессимптомных до тяжёлых форм, сопровождающихся развитием двусторонней пневмонии, полиорганной недостаточности и сепсиса [3]. Активно изучаются факторы, предрасполагающие к развитию тяжёлой степени COVID-19 [4, 5, 6]. Мишенью вируса SARS-CoV-2 являются клетки, экспрессирующие ангиотензинпревращающий фермент (ACE₂), в том числе эпителиоциты лёгких [7, 8, 9, 10].

COVID-19 представляет собой системную инфекцию со значительным влиянием на систему гемостаза, особенно при тяжёлой форме COVID-19. Нарушения гемостаза при COVID-19 обусловлены сложным патологическим процессом, включающем тромбоциты, эндотелиальные клетки, факторы свёртывания крови, естественные антикоагулянты и фибринолитическую систему, в результате которого система свёртывания приобретает прокоагулянтный фенотип [11, 12]. При COVID-19 уровень маркеров эндотелиального повреждения повышается как в лёгочной ткани, так и в периферической крови, что свидетельствует о локальной и системной коагулопатии [13]. У пациентов с COVID-19 патологическое тромбообразование происходит как в крупных сосудах, так и в микроциркуляторном русле [14]. Нарушения свёртываемости крови лежат в основе наиболее серьёзных последствий инфекции SARS-CoV-2, таких как острое повреждение лёгких и полиорганная дисфункция [15]. SARS-CoV-2 в первую

очередь поражает эндотелий легких, вызывая пневмонию и ОРДС, но в дальнейшем вирус оказывает генерализованное воздействие, проникая непосредственно в эндотелиальные клетки или опосредованно при развитии цитокинового шторма, провоцируя дисфункцию сосудов эндотелия и полиорганное повреждение [16, 17]. Поэтому внелегочные осложнения определяют степень тяжести и исход COVID-19 [18]. Сосудистая дисфункция при COVID-19 определяет множественное поражение органов [19].

По последним данным, тромботические осложнения (ТО), такие как венозная тромбоэмболия (ВТЭ), тромбоэмболия лёгочной артерии (ТЭЛА), ишемический инсульт, инфаркт миокарда относятся к ведущим причинам заболеваемости и смертности у пациентов с COVID-19 [20]. При чем, ВТЭ и артериальный тромбоз при COVID-19–ассоциированной коагулопатии (САС) наблюдаются, чаще чем при сепсис-индуцированной (SIC) и ДВС [21]. Помимо ВТЭ, в качестве причин летальных исходов у пациентов с COVID-19 рассматривается развитие тромботических микроангиопатий [22]. Стоит отметить, что риск ТО высок не только у пациентов, поступающих в тяжёлом и крайне тяжёлом состоянии в отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), но и у пациентов средней степени тяжести [23], несмотря на применение антикоагулянтной терапии у всех госпитализированных пациентов с COVID-19 [24]. Стандартные подходы к профилактике ТО при данной патологии требуют коррекции, особенно это касается пациентов, находящихся в критическом состоянии [25].

COVID-19–ассоциированная коагулопатия сопровождается изменениями лабораторных показателей системы гемостаза, которые отличаются от изменений, наблюдаемых при SIC и ДВС. При САС обычно повышен уровень D-димера и фибриногена, но отклонения от нормы протромбинового времени (ПВ) и количества тромбоцитов минимальны [21, 27, 28]. Лабораторный мониторинг этих показателей гемостаза, несомненно, помогает клиницистам лучше стратифицировать пациентов с COVID-19 по степени тяжести и риску ТО, однако не позволяют персонализировать терапию в зависимости от протромбогенного потенциала пациента. Активно изучается клиническая значимость параметров

интегральных методов исследования гемостаза, таких как тромбоэластометрия и тест генерации тромбина в контексте патофизиологии тромбообразования и мониторинга терапии антикоагулянтами при COVID-19 [29].

Каждый десятый случай острой инфекции COVID-19 сопровождается развитием «лонг-COVID» [30]. После выписки из стационара у пациентов, перенёвших COVID-19, наблюдаются устойчивые протромботические изменения (повышение генерации тромбина, фактора VIII) [31], вероятно, в результате активации эндотелия, подтверждением чего является повышенный уровень vWF в плазме после COVID-19 [32]. Гиперкоагуляция, эндотелиальная дисфункция и воспаление обнаруживаются у некоторых лиц через 1 год после выздоровления от COVID-19 независимо от степени тяжести перенесённой инфекции. Эндотелиопатия может определять степень выраженности последствий перенесенного заболевания, которые сохраняются в течение месяцев «лонг-COVID-19» [30].

Имеющиеся данные определяют необходимость более детально охарактеризовать COVID-19–ассоциированную коагулопатию, определить прогностически значимые лабораторные параметры для разработки схемы обследования пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции, направленной на профилактику тромботических осложнений.

Цель исследования

Изучить состояние системы гемостаза при COVID-19 различной степени тяжести во время заболевания и в периоде реконвалесценции с использованием стандартных и интегральных методов оценки коагуляции.

Задачи исследования

1. Оценить параметры плазменного гемостаза у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести во время заболевания и в период реконвалесценции с помощью коагулометрических методов.
2. Охарактеризовать состояние системы свёртывания крови у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести во время заболевания и в период реконвалесценции с использованием метода тромбоэластометрии.
3. Определить эндогенный потенциал тромбина у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести, с учётом условий наблюдения (амбулаторно или стационарно) во время заболевания с помощью теста генерации тромбина.
4. Изучить маркёры эндотелиальной дисфункции у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести во время заболевания и в период реконвалесценции.
5. На основании полученных данных усовершенствовать схему лабораторного исследования параметров системы гемостаза у пациентов с COVID-19 в период заболевания и реконвалесценции с целью выявления пациентов с высоким риском тромботических осложнений.

Научная новизна

На основании анализа параметров системы гемостаза, полученных коагулометрическими и интегральными методами, а также маркеров сосудистой дисфункции, проведена комплексная оценка состояния системы свёртывания крови у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и выявлены особенности коагулопатии, ассоциированной с COVID-19. Впервые охарактеризованы параметры системы свёртывания и эндотелиальная функция у реконвалесцентов, перенёсших COVID-19 разной степени тяжести, и установлено, что состояние системы гемостаза зависит от степени тяжести перенесённого инфекционного процесса.

Практическая значимость

На основании результатов исследования системы гемостаза у пациентов с COVID-19 определены лабораторные параметры, характеризующие особенности COVID-19-ассоциированной коагулопатии в зависимости от степени тяжести инфекционного процесса. Концентрация фибриногена, vWF и D-димера, а также ПВ, МНО, протромбин по Квику и соотношение vWF:RCo/ADAMTS-13:Act значимо различаются у больных COVID-19 разной степени тяжести.

Установлено, что в период реконвалесценции параметрами, отражающими сохраняющуюся активацию внутрисосудистого свёртывания и эндотелиальную дисфункцию, которая зависела от степени тяжести перенесённой кароновирусной инфекции, являются D-димер, угол $\alpha_{\text{EXTEM, INTEM}}$, $\text{TPI}_{\text{EXTEM, INTEM}}$, $\text{CFT}_{\text{INTEM}}$, $A_{10\text{FIBTEM, INTEM}}$, $A_{20\text{FIBTEM, INTEM}}$, $\text{MCF}_{\text{INTEM}}$, vWF:RCo/ADAMTS-13:Act.

С учётом полученных данных усовершенствована схема лабораторного исследования параметров системы гемостаза у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции, с целью выявления пациентов с высоким риском тромботических осложнений.

Возможные области применения и формы внедрения

Полученные результаты могут быть использованы в области клинической лабораторной диагностики, реанимации и интенсивной терапии пациентов с COVID-19. Схема комплексного лабораторного исследования показателей системы гемостаза у пациентов с COVID-19 в период заболевания и реконвалесценции внедрена в учебный процесс на кафедре анестезиологии и реаниматологии Института профессионального образования ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Методология и методы исследования

Для достижения цели исследования, реализации поставленных задач и обоснования сформулированных положений, был проведён глубокий анализ научной литературы в области клинической лабораторной диагностики, особое внимание уделялось интегральным методам исследования гемостаза. В работе применялись как рутинные, так и новые методы клинической лабораторной диагностики; рациональные подходы к статистической обработке полученных данных. Дизайн работы – когортное проспективное исследование.

Положения, выносимые на защиту

1. COVID-19 – ассоциированная коагулопатия характеризуется гиперкоагуляцией, активацией внутрисосудистого свёртывания и фибринолиза, истощением факторов протромбинового комплекса, образованием сгустков высокой плотности за счёт повышения функциональной активности фибриногена и тромбоцитов. В период заболевания выраженность нарушений гемостаза зависит от степени тяжести COVID-19. В периоде реконвалесценции нарушения гемостаза сохраняются у пациентов, перенёсших COVID-19 в тяжёлой форме.

2. Эндогенный потенциал тромбина в период заболевания зависит от степени тяжести COVID-19 и значения антиХа-активности. У амбулаторных пациентов высокий эндогенный потенциал тромбина обусловлен отсутствием антикоагулянтной терапии, у стационарных пациентов – неполным ингибированием избытка тромбина.

3. В период заболевания у пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени наблюдается эндотелиопатия, которая характеризуется дисбалансом между vWF и ADAMTS-13. В периоде реконвалесценции у пациентов, перенёсших тяжёлую форму COVID-19, дисфункция эндотелия прогрессирует.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных в исследовательской работе заключений и выводов обеспечена репрезентативным объёмом выборки пациентов, включённых в исследование; соблюдением всех требований к выполнению преаналитического, аналитического и постаналитического этапов лабораторных исследований; выбором методов статистической обработки данных.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на Форуме антитромботической терапии с международным участием «FACT bridge» (Москва, 2021), междисциплинарной конференции " International Conference on Pathology and Laboratory Medicine" (Берлин, 2022), IV Национальном конгрессе с международным участием «Лабораторные Технологии в Репродуктивной Медицине и Неонатологии» (Москва, 2022), XV Всероссийском образовательном конгрессе «Анестезия и реанимация в акушерстве и неонатологии» (Москва, 2022); 9-ом Международном конгрессе по патофизиологии (9th International Congress of Pathophysiology) и 5-ом Конгрессе физиологических наук Сербии с международным участием (5th Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation) (Белград, Сербия, 2023).

Апробация диссертационной работы состоялась на межотделенческой конференции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России 30 августа 2023 года. Диссертация рекомендована к защите.

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в выборе направления и методов диссертационного исследования. Основной объем лабораторных исследований, обработка биоматериала, составление электронных баз данных, статистическая обработка результатов, анализ и обобщение материала выполнены автором лично.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре анестезиологии и реаниматологии Института профессионального образования ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, включая 6 статей в научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований, 1 статья в международном журнале, 1 патент, 2 тезисов на международных конференциях.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 122 страницах, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 210 источников. Работа содержит 19 таблиц и 15 рисунков.

ГЛАВА 1. ВЛИЯНИЕ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2, НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА

1.1. Новая коронавирусная инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, и факторы риска, предрасполагающие к развитию COVID-19 тяжёлой степени

В прошлом веке наблюдались эпидемии, вызванные вирусом гриппа А (IAV), коронавирусом тяжёлого острого респираторного синдрома SARS-CoV, ближневосточным коронавирусом респираторного синдрома MERS-CoV. В конце 2019 г. в КНР произошла вспышка ранее неизвестного заболевания. 11 февраля 2020 г. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) присвоила ему официальное название COVID-19 («Coronavirus disease 2019»), а международный комитет по таксономии вирусов – официальное название возбудителю инфекции Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2). Пандемия, вызванная широким распространением нового РНК-содержащего SARS-CoV-2, охватила более 700 млн человек, а число зарегистрированных летальных исходов достигло практически 7 млн [1]. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 представляет глобальную проблему человечества на современном этапе развития.

SARS-CoV-2 представляет собой оболочечный несегментированный одноцепочечный РНК-вирус, принадлежащий к роду *Betacoronavirus* [33]. Геном SARS-CoV-2 имеет сходство с геномом двух коронавирусов летучей мыши bat-SL-CoVZC45 и bat-SL-CoVZXC21 (89-96,3%) и с геномом SARS-CoV человека ($\approx 80\%$). В составе вириона SARS-CoV-2 присутствуют четыре основных структурных белка: поверхностный S (Spike) гликопротеин шиповидных отростков, оболочечный белок E (Envelope), мембранный белок M и нуклеокапсидный белок N [4, 32]. Известно, что через S-протеин происходит связывание коронавирусов с рецепторами клеток организма человека. Как и другие коронавирусы, SARS-CoV-2 использует рецептор ангиотензина-2 (ACE₂), но с более высокой эффективностью, и проникает в клетки-мишени по всему организму [35, 36, 37], вызывая множественную (лёгкие, сердце, печень, нервная система, кишечник, почки,

кровеносные сосуды и мышцы) дисфункцию органов [9, 38]. По некоторым данным экспрессия ACE₂ коррелирует с тропизмом SARS-CoV-2 к разным тканям, можно предположить, что степень поражения органа связана с количеством рецепторов ACE₂ [18, 19]. Поэтому, высокая степень поражения лёгких объясняется выраженной экспрессией ACE₂ на клетках эпителия и альвеолярных моноцитах [41]. Однако существуют данные о несоответствии между тропизмом и распределением ACE₂, возможно, набор используемых вирусом SARS-CoV-2 рецепторов зависит от типа ткани. Например, эндотелиальные клетки экспрессируют рецепторы (TMPRSS₂, рецептор сиаловой кислоты, индуктор металлопротеиназы внеклеточного матрикса (CD147)), которые вирус может использовать для инфицирования клетки [2].

Мужчины болеют чаще, вероятно, ввиду более высокого уровня экспрессии ACE₂ в альвеолярных эпителиоцитах, чем у женщин [42]. Также было отмечено, что у пациентов с А (II) группой крови повышен риск развития тяжёлых форм COVID-19, тогда как О (I) группа имеет протективную роль [43]. Существует несколько гипотез, объясняющих эти различия: анти-А и/или анти-В антитела (присутствующие у лиц группы О (I)) могут связываться с соответствующими антигенами на вирусной оболочке и способствовать нейтрализации вируса или блокировать взаимодействие между вирусом и ACE₂, тем самым предотвращая инфицирование клеток-мишеней; низкая активность фактора фон Виллебранда (vWF) и фактора VIII у лиц с О (I) группой крови по сравнению с остальными группами определяет менее выраженную степень гиперкоагуляции и более хорошие исходы [44]. Также известно, что старший возраст и высокий индекс массы тела (ИМТ), соматическая отягощённость (сахарный диабет, артериальная гипертензия) являются неблагоприятными факторами влияющими на степень тяжести заболевания [4, 45].

Источником инфекции является больной человек, в том числе в инкубационном периоде заболевания, и бессимптомный носитель SARS-CoV-2. Передача инфекции осуществляется воздушно-капельным, воздушно-пылевым, контактным путями и фекально-оральным [46]. Заболевание, вызванное SARS-

CoV-2, протекает в различных формах, от бессимптомного течения до тяжёлых форм, сопровождающихся развитием двусторонней пневмонии, полиорганной недостаточности и сепсиса [15, 21]. При этом активно изучаются факторы, предрасполагающие к развитию различных форм COVID-19 [43, 48, 49]. Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и гипоксическая дыхательная недостаточность являются основной причиной смерти пациентов с COVID-19 [50, 51].

Прогрессирование COVID-19 можно разделить на три фазы, представленные на рисунке 1.1.

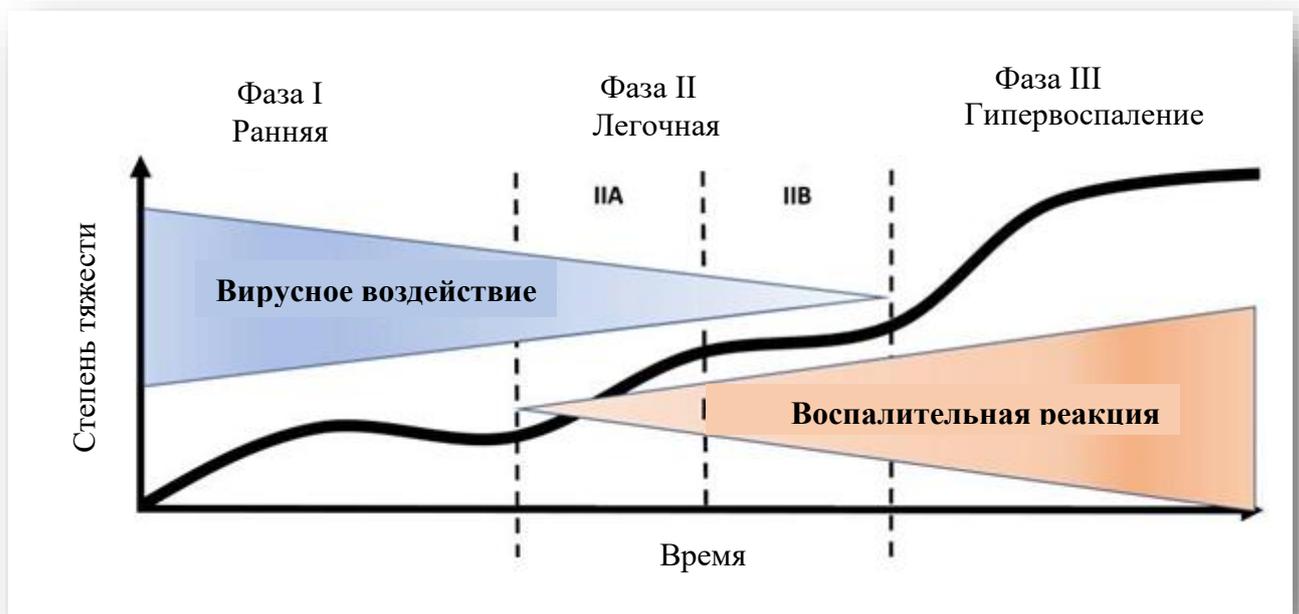


Рисунок 1.1 Фазы прогрессирования COVID-19: адаптировано из [52]

I-фаза (*ранняя*) – соответствует раннему периоду заболевания, проявляющемуся лёгкими конституциональными симптомами (недомогание, лихорадка и сухой кашель) и лимфопенией. В течение этого периода вирус SARS-CoV-2 размножается и внедряется в клетки хозяина, в первую очередь в дыхательной системе. Во II-фазу (*лёгочная*) происходит локализованное воспаление в лёгких, развивается вирусная пневмония с кашлем и лихорадкой. Возможно развитие гипоксии ($P_{aO_2}/F_{iO_2} < 300$ мм рт. ст.), поэтому выделяют II А-фазу (без гипоксии) и II В-фазу (с гипоксией). III-фаза – внелёгочное системное

гипервоспаление, вызванное дыхательной недостаточностью и полиорганной дисфункцией, характеризующееся повышением маркеров воспаления. Вирус SARS-CoV-2 приводит к снижению количества хелперов, супрессоров и регуляторных Т-клеток. Повышаются воспалительные цитокины (IL-2, IL-6, IL-7, GCSF, макрофагальный воспалительный белок 1- α (MIP1 α), фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) и другие биомаркеры (С-реактивный белок, ферритин, D-димер), тропонин и N-концевой натрийуретический пептид также могут быть повышены. III – фазу Алексева Е.И. и соавт. называет «COVID-19-индуцированный «цитокиновый шторм», который протекает с признаками гипервоспаления и полиорганного поражения, развивающимися в результате массивного высвобождения цитокинов вследствие неконтролируемой активации макрофагов и цитотоксических клеток и, как следствие, нерегулируемым фагоцитозом клеток крови и их предшественников [53].

1.1.1. Цитокиновый шторм и система гемостаза

Цитокиновый шторм – это состояние системного гипервоспаления, часто наблюдаемое у пациентов с инфекциями [54], для него характерно резкое повышение экспрессии провоспалительных цитокинов (ФНО- α , IL-6 и IL-1 β) в результате массивной активации макрофагов [55]. Воспаление нарушает баланс между процессами свёртывания и фибринолиза. Повышение экспрессии тканевого фактора на эндотелиальных клетках, макрофагах и нейтрофилах под действием провоспалительных цитокинов активирует коагуляцию и провоцирует повышенное тромбообразование [56]. В свою очередь, IL-1 и IL-6 увеличивают продукцию ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), что снижает фибринолитическую активность [57, 58] и система гемостаза приобретает прокоагулянтный фенотип.

Коагуляционная, фибринолитическая, антикоагулянтная и комплементарная системы находятся в тонком равновесии с эндотелием стенки сосуда, обеспечивая

соответствующий гемостаз. Коагулопатия при коронавирусной болезни 2019 (COVID-19) нарушает баланс между прокоагулянтными системами и регуляторными механизмами и представляет собой не простое нарушение одного звена гемостаза, а сложный процесс, затрагивающий всю систему гемостаза: тромбоциты, эндотелиальные клетки, факторы свёртывания крови, фибринолитическую систему, систему антикоагулянтных белков [11].

Увеличение концентрации IL-6 наблюдается у всех пациентов с COVID-19, причём при тяжёлой форме COVID-19 уровень в 2,9 раза выше, чем при средней степени тяжести. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов оказывает воздействие на окружающие клетки и ткани, в том числе на эндотелий. IL-6, например, активирует эндотелиальные клетки (ЭК) в I-фазе (Рисунок 1.1), при этом ЭК увеличивают экспрессию молекул адгезии, привлекая лимфоциты и трансформируясь в активное состояние [82]. В свою очередь, активированные ЭК продуцируют IL-6 без дополнительных стимулов, усиливая воспаление и, как следствие, повреждение эндотелия [83]. Следовательно, IL-6 участвует в петле положительной обратной связи, способствующей избыточному иммунному ответу и эндотелиальной дисфункции при COVID-19. Кроме того, продуцируемый активированными альвеолярными макрофагами и эпителиальными клетками лёгких IL-1 β способствует высвобождению молекул клеточной адгезии ЭК, подавляя регуляцию VE-кадгерина и ингибируя генерацию циклоаденозинмонофосфата (цАМФ), нарушая целостность эндотелиального барьера [38]. Таким образом, массивная активация макрофагов, индуцированная вирусом SARS-CoV-2, способствует гиперкоагуляции и снижению активности системы фибринолиза, структурному повреждению и дисфункции эндотелия.

1.1.2. Коагулопатия, ассоциированная с COVID-19

У пациентов с инфекцией SARS-CoV-2 наблюдаются нарушения системы гемостаза. Toshiaki Iba и соавт. предложили ввести термин COVID-

ассоциированная коагулопатия (САС от англ. COVID – associated coagulopathy) для определения состояния коагуляции у таких пациентов [14]. САС имеет общие черты с диссеминированным внутрисосудистым свёртыванием (ДВС) крови и коагулопатией, вызванной бактериальным сепсисом (SIC от англ. sepsis-induced coagulopathy), но фенотип САС уникален. В литературе описано сочетание САС с сепсисом, антифосфолипидным синдромом, гемофагоцитарным синдромом, тромботической микроангиопатией, гепарин-индуцированной тромбоцитопенией [59]. Патогенез САС сложен и обусловлен тесной взаимосвязью иммунного ответа и системы свёртывания крови, явлениями иммунотромбоза и тромбовоспаления. В реализации САС задействованы воспалительные цитокины, нейтрофилы, системы комплемента и фибринолиза, но ключевую роль в патогенезе САС играет эндотелиальная дисфункция [60, 61, 62].

Выделяют экстраваскулярную (внесосудистое отложение фибрина, локализованное в альвеолярном компартменте, после повреждения альвеолярных клеток и нарушения альвеолярно-капиллярного барьера) и внутрисосудистую коагулопатию (сосудистые тромбы, вторичные по отношению к локальному воспалению, неэмболического происхождения) [63, 64]. В отличие от SIC и ДВС, при САС обычно наблюдается повышенный уровень D-димера и фибриногена, но отклонения от нормы протромбинового времени и количества тромбоцитов минимальные [29]. Естественные антикоагулянты, такие как антитромбин (АТ) и протеин С (ПС), ингибируя избыток прокоагулянтов (гиперкоагуляционное состояние), потребляются, а их снижение (скрытый ДВС) предшествует явному ДВС-синдрому. Поэтому можно предположить, что инфекция SARS-Cov-2 вызывает образование большого количества микротромбов с потреблением естественных антикоагулянтов [65].

Венозная тромбоэмболия и артериальный тромбоз встречаются при САС чаще чем при SIC / ДВС [66]. В основе коагулопатии при COVID-19 предположительно лежит системная гиперкоагуляция, развивающаяся одновременно с прогрессированием воспалительного ответа [67]. По последним данным САС обусловлена взаимодействием между эндотелием, иммунной и свёртывающей

системой, что приводит к гипервоспалительному и протромботическому состоянию, который определяет исход заболевания [11, 62]. Воспаление и коагуляция – эволюционные механизмы защиты хозяина от инфекционных агентов, поэтому реакции организма усиливаются пропорционально тяжести заболевания, а в некоторых случаях могут выйти из-под контроля и нанести вред. Так избыток провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 β , фактор некроза опухоли- α (TNF α)), активация белков системы комплемента и нейтрофилов, выбрасывающих внеклеточные ловушки (NETs), вызывают повреждение эндотелия (структурную дисфункцию) [66]. В результате этого, в кровь высвобождается избыточное количество тканевого фактора (ТФ) и фактора Виллебранда (vWF), что, в свою очередь, повышает адгезию тромбоцитов к коллагеновой подложке в местах повреждения эндотелия и приводит к аутоактивации тромбоцитов и как следствие активации плазменного гемостаза. Поэтому оценка циркулирующих мультимеров vWF у пациентов с COVID-19 может быть информативной с точки зрения прогноза течения заболевания. Высвобождающийся из эндотелиальных клеток и гранул тромбоцитов vWF также способствует снижению уровня металлопротеазы ADAMTS-13, необходимой для расщепления сверхкрупных мультимеров vWF, обладающих высокой тромбогенностью [68]. Структурная дисфункция эндотелиальных клеток сосудов, провоспалительные цитокины, в частности IL-6, обеспечивающий экспрессию ТФ и увеличение продукции фибриногена, приводят к избыточному образованию тромбина и подавлению фибринолиза [12, 69, 70].

Нарушения системы гемостаза в начале заболевания характеризуются гиперкоагуляционным фенотипом, а на поздних стадиях заболевания – ДВС с гипокоагуляцией за счёт потребления факторов свёртывания и тромбоцитов. Триггерами гиперкоагуляции при COVID-19 являются провоспалительные цитокины, которые способствуют повышению содержания в крови vWF, фактора VIII, нейтрофильных внеклеточных ловушек и активации тромбоцитов [59]. Лабораторными показателями, характеризующими коагулопатию при COVID-19 являются повышение концентрации D-димера и фибриногена в плазме крови, увеличение протромбинового времени, уменьшение уровня естественных

антикоагулянтов и количества тромбоцитов [71].

1.1.3. Эндотелиальная дисфункция при COVID-19

Эндотелий сосудов – монослой ЭК, выстилающих внутреннюю стенку кровеносных и лимфатических сосудов, он поддерживает гомеостаз совместно с гладкомышечными клетками и перицитами (клетки базальной мембраны) [72]. В норме эндотелиальные клетки регулируют вазомоторный тонус сосудов, способствуют антитромботическому состоянию и регулируют иммунный ответ. Эндотелиальная дисфункция приводит к нарушению вазомоторной функции (вазоконстрикции, повышенной проницаемости сосудов) и тромборезистентности сосудистой стенки, а также дисрегуляции противовирусного иммунного ответа и гипервоспалению [73, 74].

Вирус SARS-CoV-2 инфицирует эндотелиальные клетки, способствуя развитию эндотелиита [75]. В перицитах микрососудов экспрессируется ACE₂, а нарушение герметичности эндотелиального слоя позволяет вирионам SARS-CoV-2 туда проникать, вызывая отслоение и дисфункцию этих клеток [8]. В работе Varga и соавт. доказана гибель (апоптоз) эндотелиальных клеток, что является причиной системного нарушения структуры эндотелия и объясняет нарушение микроциркуляции в различных органах [76]. Апоптоз эндотелия активирует систему свёртывания за счёт перераспределения фосфолипидов на поверхности повреждённых клеток, что повышает активность теназного комплекса (ф.IXa, ф.VIII, ф.X) на 20-60%, снижает активность системы ПС (ПС, PS, тромбомодулин (TM)), гепарансульфатов и ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) [77]. В результате поражённый эндотелий становится прокоагулянтным и антифибринолитическим, что указывает на снижение тромборезистентности стенки сосудов, ассоциированной с окклюзией микрососудов [78, 79].

Эндотелиальная дисфункция характеризуется биомаркерами повреждения ЭК: vWF, циркулирующими эндотелиальными клетками (ЦЭК), TM, эндотелиальными

везикулами, провоспалительными цитокинами и молекулами клеточной адгезии. Повышение уровня этих биомаркёров ассоциировано со степенью тяжести и смертностью от COVID-19, что позволяет предположить участие системы гемостаза в патогенезе заболевания [80]. Например, концентрация vWF, который хранится в тельцах Вейбеля-Паладе, коррелировала со степенью тяжести и развитием ОРДС [81]. Следует отметить, что даже у выздоравливающих пациентов с COVID-19 наблюдалось значительное увеличение количества ЦЭК по сравнению с группой контроля, что свидетельствует о стойкой структурной сосудистой дисфункции после выздоровления от COVID-19 [82]. У пациентов с ОРДС повышались Р- и Е-селектин, ангиопоэтин-2, растворимая молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), экспрессирующаяся активированными эндотелиальными клетками [83]. Дополнительным прокоагулянтным эффектом, опосредованным через клетки-мишени, обладают эндотелиальные везикулы, которые высвобождаются при активации эндотелия [84], а повреждённые ЭК, экспрессирующие ТФ, активируют внешний путь коагуляции [62]. Все эти изменения отражают характер повреждения и дисфункцию эндотелия у пациентов с COVID-19, которая соответствует степени тяжести заболевания [21, 63].

В местах повреждения эндотелия за счёт повышенного уровня vWF через тромбоцитарный рецептор GP1b активно происходит адгезия тромбоцитов к коллагеновой подложке. Затем происходит экзоцитоз плотных гранул тромбоцитов, содержащих низкомолекулярные соединения (АДФ, АТФ, серотонин, ионы кальция и магния, ГДФ, ГТФ) и альфа-гранул, содержащих (vWF, фибриноген, фибронектин, тромбоспондин, плазминоген, ПС, провоспалительные цитокины и хемокины (тромбоцитарный фактор 4, β -тромбоглобулин)). Все это приводит к аутоактивации тромбоцитов и изменению их профиля экспрессии поверхностных рецепторов [85]. Циркулирующие тромбоциты у пациентов с COVID-19 имеют более высокую экспрессию Р-селектина по сравнению со здоровыми людьми и обладают прокоагулянтным фенотипом, ускоряя ф.ХII-зависимую коагуляцию [86]. По данным Martyanov A.A. и соавт., процент прокоагулянтных тромбоцитов не зависел от степени тяжести COVID-19; при индукции агонистами наблюдалась

рефрактерность (экспрессия GPIb, P-селектина была ниже, чем в группе контроля) и снижение агрегации, при этом дисфункция тромбоцитов сохранялась, несмотря на уменьшение маркеров воспаления. У всех пациентов с COVID-19 дисфункция тромбоцитов коррелировала со степенью нетоза, который был умеренно повышен. Частота обнаружения РНК SARS-CoV-2 в тромбоцитах составила 8% и не коррелировала с их количеством и их функцией [87].

Предотвращение образования высокотромбогенных мультимеров vWF осуществляет металлопротеиназа ADAMTS-13, синтезируемая в пресинусоидальных липидосодержащих звездчатых клетках печени. В результате воспаления, активации эндотелия и тромбоцитов, в кровь высвобождается большое количество мультимеров vWF, на расщепление которых расходуется циркулирующая ADAMTS-13. Это приводит к снижению активности ADAMTS-13 и, как следствие, неполному расщеплению сверхбольших мультимеров vWF, что повышает спонтанную агрегацию тромбоцитов в микроциркуляторном русле [68]. Затем следует образование микротромбов, микроангиопатическая гемолитическая анемия с тромбоцитопенией (обычно тяжелой) и мультисистемное повреждение органов-мишеней (почки, мозг, сердце) [88]. Связь между сниженным уровнем активности ADAMTS-13 и смертностью пациентов с COVID-19 доказана в ряде исследований [89, 90]. Согласно данным Tiscia G.L. и соавт., уровень ADAMTS-13 при поступлении в стационар определяет риск летального исхода у пациентов с COVID-19 [91]. Что касается пациентов с сепсисом, низкие уровни ADAMTS-13 обратно коррелируют с уровнем фактора Виллебранда и неблагоприятным прогнозом [92]. Tiscia G.L. и соавт. была определена прогностическая значимость соотношения vWF:RCo/ADAMTS-13:Act у пациентов с COVID-19: значение $\geq 5,7$ (на момент госпитализации) ассоциировано с поступлением в ОПИТ, значение $\geq 6,5$ ассоциировано с наступлением летального исхода [93]. Таким образом, анализ соотношения активности фактора Виллебранда (vWF:RCo) к активности ADAMTS-13 (ADAMTS-13:Act) позволяет прогнозировать течение COVID-19 у госпитализированных пациентов. Вопрос о штаммовзависимом влиянии SARS-

CoV-2 на воспаление, активацию и дисфункцию эндотелия требует дальнейших исследований.

1.1.4. Фибринолитическая система при COVID-19

Фибринолитическая система выполняет множество функций: обеспечивает своевременный лизис фибринового сгустка, а также деградацию коллагена; ангиогенез, сопряжена с процессом апоптоза, способствует воспалению посредством индукции цитокинов и активации комплемента [77]. Основная функция фибринолитической системы – удаление избытка фибрина (продукта каскада коагуляции), образовавшегося под влиянием тромбина. Плазмин, основной фермент этой системы, образуется из плазминогена, секретируемого печенью. Активаторы плазминогена, а именно сериновые протеазы t-PA (тканевой активатор) и u-PA (урокиназный активатор), секретируемые эндотелиальными клетками, моноцитами и макрофагами, запускают каскад протеолиза фибрина (фибринолиз). В свою очередь, плазмин, расщепляя t-PA и u-PA до двухцепочечных протеаз, усиливает их протеолитическую активность, что обеспечивает положительную обратную связь фибринолиза. Отрицательная обратная связь обеспечивается ингибиторами фибринолиза: ингибиторами активаторов плазминогена (PAI-1, PAI-2, PAI-3), подавляющими активность t-PA и u-PA; α 2-антиплазмином (α 2-AP), образующим с плазмином комплекс (плазмин- α 2-антиплазмин), неспособный расщеплять фибрин [94]; α 2-макроглобулином, синтезируемым печенью, который является ингибитором как коагуляции (тромбина), так и фибринолиза (подавляет действие плазмينا и калликреина); активированным тромбином ингибитором фибринолиза (TAFI) – карбоксипептидазой-B, синтезируемой печенью, макрофагами, мегакариоцитами, содержащейся в гранулах тромбоцитов, которая разрушает каталитическую поверхность фибрина и ограничивает связывание плазминогена с ней [95]. Таким образом, образование тромбина способствует ослаблению фибринолиза. В результате фибринолиза образуются продукты

деградации фибрина (ПДФ), наименьшим по молекулярной массе является D-димер, повышение которого является лабораторным маркёром активации фибринолиза и указывает на повышенное образование тромбина [96].

Отличительная особенность COVID-19 – глубокое протромботическое состояние, которое характеризуется высокой частотой остановки фибринолиза [97]. Лабораторными критериями остановки является полное отсутствие лизиса сгустка, регистрируемое методом тромбоэластографии (через 30 минут) или тромбоэластометрии (через 60 минут), что является прогностическим фактором тромбозных осложнений [98, 99]. Ранее было показано ослабление фибринолиза при различных патологических состояниях, включая травмы и сепсис [93, 94]. Снижение фибринолитической активности при COVID-19 обусловлено: сверхэкспрессией PAI-1 эндотелиальными клетками и активированными тромбоцитами; увеличением циркуляции TAFI, который подавляет активность t-PA и моделирует поверхность фибрина [10]; ингибированием плазминогена активными компонентами системы комплемента [102]. Кроме того, баланс между прокоагулянтной и фибринолитической активностью нарушается за счёт избытка циркулирующего и экспрессирующегося на клетках тромбина, что обусловлено реакцией острой фазы и высоким уровнем IL-6 [11, 103].

Вирус SARS-CoV-2 является триггером повреждения клеток. Образование антифосфолипидных антител, включая ВА, спровоцировано нарушением целостности мембраны клеток и, как следствие, экстернализацией фосфолипидов на внешней поверхности клеток, которая зависит от степени выраженности воспалительного процесса [104]. Антифосфолипидные антитела (АФА) способствуют изменению морфологии фибрина, в результате чего он хуже поддаётся фибринолизу, что было предложено в качестве нового протромботического механизма при антифосфолипидном синдроме (АФС) [105]. Блокирование аннексина-2 антителами ослабляет фибринолиз и усиливает протромботическое состояние при COVID-19, так как аннексин-2 представляет собой рецептор плазминогена, локализованный на многих типах клеток. Он действует как корецептор, ускоряя образование плазмينا более чем в 60 раз [106].

Повышенные уровни PAI-1 и TAFI, АФА против аннексина-2 и β 2-гликопротеина-I, t-РА, плазминогена и плазмина подавляют фибринолитическую активность [96].

1.2. Тромботические осложнения при COVID-19

Тромботические осложнения признаны ведущими причинами заболеваемости и смертности при COVID-19. К ним относятся ВТЭ, ишемический инсульт, инфаркт миокарда, острая ишемия конечностей и другие макро- и микротромботические осложнения [107]. У пациентов, госпитализированных с COVID-19 в отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) частота тромботических осложнений составляла 30–80 %. Наиболее распространенным тромботическим осложнением у этих пациентов являлась ВТЭ в 15-85% случаев [108]. По данным литературы, большая разница в частоте ТО обусловлена, в первую очередь, различиями диагностических подходов в определении частоты ТО, а также разными подходами к тромбопрофилактике [109, 110]. Основными факторами риска развития ВТЭ у пациентов с COVID-19 являются возраст, госпитализация в ОРИТ, лейкоцитоз, лимфопения и повышение D-димера [111], кроме того, ожирение, стационарное наблюдение и неподвижность [112]. Стоит отметить, что риск ВТЭ высок не только у пациентов, поступающих в тяжёлом и крайне тяжёлом состоянии в ОРИТ, но и у пациентов средней тяжести [23], несмотря на применение антикоагулянтов у всех госпитализированных пациентов с COVID-19 [24]. Помимо ВТЭ у пациентов с COVID-19, получавших заместительную почечную терапию, экстракорпоральную мембранную оксигенацию (ЭКМО), зарегистрированы тромбозы центробежных помп и контуров, фильтров нижней полой вены [109]. При аутопсии лёгких обнаруживаются микротромбы в 72 %, а макроскопические тромбы в 34 % случаев. Исследование сосудов лёгких у пациентов с COVID-19 тяжёлой формы продемонстрировало обширное повреждение эндотелия, тромбоз сосудов с микроангиопатией, окклюзию альвеолярных капилляров и признаки

неоангиогенеза. Таким образом, анализ данных, опубликованных на сегодняшний день, предполагает связь между COVID-19 и развитием ТО, несмотря на проведение антикоагулянтной терапии [62]. Это указывает на необходимость дальнейшего изучения патогенеза COVID-19 и изменения подхода к профилактике ТО [109].

Наличие ВТЭ у пациентов с COVID-19 достоверно ассоциировано с повышенной летальностью [67]. Кроме того, в качестве причины летальных исходов у пациентов с COVID-19 также рассматривается развитие тромботических микроангиопатий [113]. Несмотря на наличие высоких баллов по шкале оценки синдрома ДВС у умерших пациентов [114], «классическая» клиническая картина ДВС согласно определению Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) практически не развивается у пациентов с COVID-19 [27], при этом наблюдается клинически совершенно новое множественное нарушение внутрисосудистого свёртывания со склонностью к тромбозам, а не к кровотечению [108]. Данные свидетельствуют о гиперплазии мелких сосудов с утолщением их стенок, гиалиновом тромбозе сосудов и очаговых кровотечениях, возможно, из-за венозного застоя [115, 116]. Вероятно, микротромбозы усугубляют ОРДС (лёгочная тромботическая микроангиопатия рассматривается как потенциальная причина смерти) и внелёгочные осложнения (желудочно-кишечные, сердечно-сосудистые, почечную дисфункцию и неврологические расстройства) у пациентов с COVID-19 [32].

По мнению авторов, значительную роль в патогенезе ТЭО при COVID-19 имеет приобретённая тромбофилия. Ferrari и соавт. описали высокую распространённость дефицита протеина S (20 %) и АФА (72%), в основном волчаночного антикоагулянта (ВА), однако приобретённая тромбофилия напрямую не коррелировала с возникновением тромботических событий, а являлась неотъемлемой частью воспалительной реакции [117]. Следует учитывать использование антикоагулянтов во время лечения пациентов с COVID-19, что может привести к ложноположительным результатам ВА [118], как и повышенный уровень белков острой фазы, в частности С-реактивного белка [119]. Известно, что

критериальные АФА (антитела классов IgG и IgM к кардиолипину и β 2-гликопротеину-1) повышают риск тромботических осложнений [120], однако при COVID-19 преобладали АФА, не относящиеся к лабораторным критериям диагностики АФС, принятым в Саппоро [121, 122]. Другое исследование показало, что наличие АФА, повышенный уровень D-димеров, продуктов деградации фибрина (ПДФ), фибриногена и ф.VIII, а также более низкая активность естественных антикоагулянтов способствуют развитию церебрального тромбоза [65]. Однако исследования клинических исходов у пациентов с COVID-19 на фоне персистенции АФА или без них дали противоречивые результаты [121].

1.3. Состояние системы гемостаза после перенесённого COVID-19

Под периодом реконвалесценции надо понимать период клинического выздоровления, когда нет явных признаков заболевания, но и нет полного восстановления прежнего состояния организма [123]. В понятии «лонг-COVID» различают *“продолжающийся COVID-19”* (симптомы сохраняются от 4 до 12 недель после острого COVID-19) и *“синдром пост-COVID-19”*, при котором симптомы сохраняются через 12 недель после начала заболевания. В октябре 2021 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предложила консенсусное определение *“состояния после COVID-19”*: наличие симптомов, длящихся не менее 2 месяцев, у лиц с вероятной или подтверждённой инфекцией SARS-CoV-2 в анамнезе, которые не могут быть обусловлены другим диагнозом [124]. Каждый десятый случай острой инфекции COVID-19 сопровождается развитием «лонг-COVID». В основе, которого лежат различные патофизиологические процессы: вирусные факторы (персистенция, реактивация и бактериофагическое действие SARS CoV-2); индивидуальные особенности организма (хроническое воспаление, метаболическая и эндокринная дисрегуляция, иммунная дисрегуляция и аутоиммунитет); степень воздействия SARS CoV-2 (повреждение тканей в

результате первичной инфекции, тканевая гипоксия, дисбиоз и дисфункция вегетативной нервной системы) [30].

У **реконвалесцентов** после COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми, обнаруживался повышенный уровень циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК), которые являются биомаркерами сосудистого повреждения. У больных COVID-19 с соматическими заболеваниями, например, гипертонией и диабетом, признаки активации эндотелия были более выражены, чем у пациентов с аналогичными заболеваниями без COVID-19 в анамнезе. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов, сохранялось до выздоровления и положительно коррелировало с показателями ЦЭК, указывая на ассоциированную с воспалением эндотелиальную дисфункцию [82].

У большинства людей с **пост-COVID-19 синдромом**, как госпитализированных, так и негоспитализированных, сохранялась одышка и усталость, депрессия, нарушения внимания, концентрации, памяти и сна [125, 126]. Предположительно, последствия COVID-19 могут включать устойчивую внутрилёгочную активацию свёртывания, вызванную повреждением микрососудов лёгких, с продолжающимся микротромбозом лёгких. По данным Fien A. и соавт., через 4 месяца после выписки из больницы у пациентов, перенёсших COVID-19, наблюдаются устойчивые протромботические изменения, о чем свидетельствует повышение генерации тромбина, фактора VIII и снижение фибринолитического потенциала плазмы за счёт повышения PAI-1, однако протромботические изменения не были связаны с усиленной активацией свёртывания крови *in vivo* (о чем свидетельствуют нормальные уровни D-димера и тромбин-антитромбинового комплекса (ТАТ)) [31]. Вероятно, причиной высокого ф.VIII и PAI-1 может быть активация эндотелия [32], подтверждением чего является повышенный уровень vWF в плазме людей после COVID-19 при последующем наблюдении. Повышенная генерация тромбина и снижение фибринолитической активности плазмы ассоциированы с риском ТО в общей популяции [127, 128], следовательно, и у лиц после COVID-19.

По данным Willems L.H и соавт., через 3 месяца после заражения SARS-CoV-2 наблюдается устойчивое воспаление (повышение IL-18, IL-6, IL-1ra), активация свёртывания (повышение ТАТ, ф. VIIa-АТ, vWF), значительный уровень эндотелина-1, однако макрососудистой дисфункции не выявлено. Примечательно, что активация эндотелия выявлена как у лиц, наблюдавшихся в стационаре по поводу COVID-19, так и у пациентов, которые наблюдались амбулаторно [129]. Гиперкоагуляция (повышение эндогенного тромбинового потенциала, D-димера и фактора VIII), эндотелиальная дисфункция (повышенные уровни vWF и ICAM-1) и воспаление (IL-6) обнаруживаются у некоторых пациентов через 1 год после выздоровления от COVID-19 причём независимо от степени тяжести перенесённого COVID-19 [125].

Состояние системы гемостаза в периоде реконвалесценции и после выздоровления от COVID-19 остаётся актуальной темой. Последовательность событий, ведущих к осложнениям после COVID-19, до конца не выяснена, но, активация коагуляции и степень воспалительной реакции могут быть ведущими причинами. Вопрос о том, является ли длительная тромбопрофилактика после выздоровления эффективной и безопасной для предотвращения ТО у пациентов с COVID-19, в настоящее время изучается.

1.4. Современные методы исследования системы гемостаза

Нарушения гемостаза ассоциированы с высокой заболеваемостью и смертностью и представляют серьёзную проблему здравоохранения [130]. Лабораторные исследования необходимы для диагностики коагулопатий и мониторинга терапии нарушений гемостаза [131]. Выделяют скрининговые и уточняющие тесты. Скрининговые тесты – время кровотечения, количество тромбоцитов и тесты, характеризующие плазменный гемостаз, которые входят в понятие коагулограммы (протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), фибриноген) [77]. Уточняющие тесты используются в рамках диагностического поиска или в

исследовательских работах (vWF, D-димер, АТ, ПС, ПIS, ВА, факторы свёртывания и др.). Важно соблюдать этапность выполнения тестов (от простого к сложному), исходя из клинических и анамнестических данных пациента. Коагулометрические тесты характеризуют отдельные фрагменты каскада свёртывания, а их воспроизведение *in vitro* не соответствует процессу *in vivo*. С целью наиболее полной имитации условий свёртывания *in vivo* были разработаны интегральные тесты (тромбоэластометрия, тест генерации тромбина, тромбодинамика), которые комплексно оценивают каскад коагуляции и позволяют выявить разнообразные нарушения в системе гемостаза [132].

Клоттинговые методы исследования гемостаза

Коагуляционные (клоттинговые) тесты определяют время необходимое для образования фибрина (сгустка) после добавления активатора свёртывания в реакционную смесь. Для регистрации образования фибрина используются различные принципы: механический, оптико-механический, турбидиметрический. Коагуляционные тесты, такие как протромбиновое время (ПВ), концентрация фибриногена, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и тромбиновое время (ТВ), повсеместно используются в клинической практике, поскольку достаточно быстро и просто выполняются, а большой выбор наборов реагентов позволяет оптимизировать затраты на исследование. Эти тесты были разработаны для оценки коагуляции у пациентов с изолированным дефицитом факторов свёртывания или получающих антикоагулянтную терапию, но впоследствии были экстраполированы для использования в различных клинических ситуациях. [133]. Основные недостатки клоттинговых тестов: во-первых, по времени образования сгустка невозможно оценить систему фибринолиза и влияние естественных антикоагулянтов; во-вторых, низкая чувствительность методов к активации коагуляции, т.е. к тромбоцитической готовности; в-третьих, необходимость получения плазмы крови, что увеличивает время получения результата [77]; в-четвертых, они фиксируют лишь начальную

фазу распространения образования тромбина; наконец, в этих тестах отсутствуют форменные элементы крови [134].

Интегральные методы исследования гемостаза

Интегральные методы представляют собой комплексный подход к оценке функционирования свёртывающей системы в условиях *in vitro*. Данный вид исследований характеризует не отдельные факторы или этапы коагуляции, а результат работы всего каскада свёртывания, включая превращение фибриногена в фибрин и образование и стабильность фибринового сгустка. В настоящее время к данным методам относят: тромбоэластометрию (тромбоэластографию), пьезотромбоэластографию (НПТЭГ), систему Quantra, тест генерации тромбина (ТГТ), тромбодинамику (ТД) и др.. Каждый из методов обладает особенностями, характеризующими его индивидуальную способность регистрировать различные состояния системы свёртывания [77].

Вязкоэластичные методы

Тромбоэластографию разработал профессор Н. Harter в 1948 году. Спустя 25 лет в США Y.G. Kang использовал метод в клинической практике при трансплантации печени [135]. В 1993 году был разработан прибор тромбоэластограф TEG®5000. В 1995 году А. Calatzis модифицировал метод тромбоэластографии, разработал ротационную тромбоэластографию [136]. В 2003 году компания Tem Innovations GmbH (Германия) зарегистрировала тромбоэластометр ROTEM®delta. Оба прибора TEG®5000 и ROTEM®delta имеют сходный принцип работы (Рисунок 1), но и несколько явных отличий, включая технику измерения, реагентную базу, перечень параметров [137].

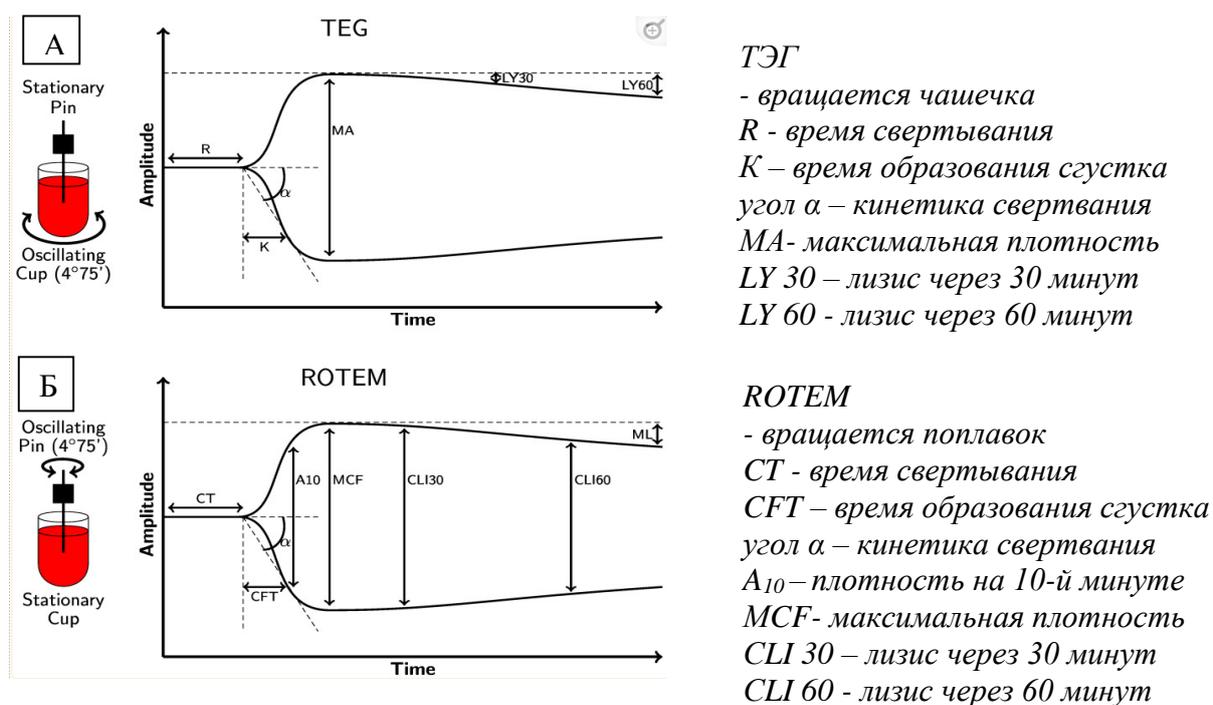


Рисунок 1.2. Принцип и параметры методов: А – тромбозластография на ТЭГ , Б – тромбозластометрия на РОТЕМ.

Литературные данные подтверждают крайне высокую клиническую значимость вязкоэластичных тестов (ВЭТ) ТЭГ/ТЭМ для диагностики нарушений коагуляции у пациентов в критическом состоянии как во взрослой популяции, так и у новорождённых [138, 139], в том числе при посттравматической коагулопатии [140, 141, 142]. Диагностика и целенаправленная терапия массивных кровотечений с использованием алгоритмов «Theragnostic Approach» под контролем тромбозластометрии снижает потребность в переливании крови, частоту осложнений, заболеваемость, смертность и расходы на лечение пациентов, поэтому является неотъемлемой частью подхода менеджмента крови пациента (МКП). Данная концепция пропагандируется ВОЗ во всем мире и ориентирована на повышение безопасности пациента [34, 30]. Мониторинг гемостаза с помощью РОТЕМ используется при кровотечениях во время операций по пересадке печени, при операциях на сердце, послеродовых кровотечениях и для оценки состояния системы гемостаза у пациентов с хронической почечной недостаточностью [143]. Кроме того, ВЭТ успешно используются для выявления гиперкоагуляционных состояний. Например, при циррозе печени и гепатоцеллюлярной карциноме может

наблюдаться гиперкоагуляция (FIBTEM MCF > 25 мм) ввиду повышения концентрации фибриногена и тромбоцитоза, что связано с пятикратным увеличением риска развития тромбоза [145]. В тоже время у пациентов с болезнью печени, за счёт подавления белоксинтетической функции происходит снижение факторов свёртывания и естественных антикоагулянтов, эти изменения характеризуют неустойчивый баланс системы гемостаза. Поскольку метод тромбозластометрии обеспечивает высокую чувствительность к гипер- и гипокоагуляции, он может применяться при любых нарушениях гемостаза [146] и позволяет принять решение о необходимости антикоагулянтной терапии у таких пациентов [147].

Метод низкочастотной пьезотромбозластографии (НПТЭГ) (Россия, «Меднорд») разработан Тюриным И.И. в 1991 году. Принцип метода заключается в регистрации динамики сопротивления образца крови резонансным колебаниям иглы-резонатора. Основным преимуществом НПТЭГ является использование небольшого количества (0,45 мл) цельной крови без антикоагулянтов (стабилизаторов). Пьезотромбозластограф (НПТЭГ) как ТЭГ и ТЭМ может использоваться у постели больного — РОСТ (Point-of-Care-Test) для оценки системы гемостаза, но не требует реагентов. Однако на данный момент сведений относительно клинической значимости метода НПТЭГ недостаточно [148].

Одной из новейших систем является *Quantra*, которая основана на звуковой оценке упругости посредством резонанса или сонореометрии [149]. Модуль сдвига рассчитывается путём анализа модели движения образца. Этот процесс повторяется каждые четыре секунды, чтобы сформировать кривую, которая демонстрирует модуль сдвига в зависимости от времени. Система *Quantra* оценивает внутренний путь (активация каолином), может обнаружить гиперфибринолиз, но не чувствительна к отключению фибринолиза [101].

ВЭТ – тромбозластометрия ROTEM, тромбозластография TEG, *Quantra*, НПТЭГ предоставляют «динамические» данные о формировании и растворении сгустков, являясь интегральными тестами гемостаза, оценивают коагуляцию, учитывая вклад форменных элементов крови и фибриногена в образование сгустка,

а также фибринолитических компонентов [61]. ВЭТ занимают лидирующую позицию среди методов для диагностики, профилактики и лечения нарушений свёртывания крови в критических ситуациях [150].

Тест генерации тромбина

Тест генерации тромбина (ТГТ) – метод, отражающий в динамике образование и ингибирование тромбина после активации коагуляции в образце плазмы [77]. Метод непрерывного мониторинга образования тромбина с использованием хромогенного субстрата первым описал Н. Hemker в 1993 году. За последние два десятилетия усовершенствование этого метода привело к появлению автоматизированных анализаторов генерации тромбина. ТГТ основан на расщеплении флюорогенного субстрата тромбином. Интенсивность флюорисценции пропорциональна концентрации тромбина, образовавшегося в данный момент времени. Дополнительное использование в реакционной смеси тромбомодулина позволяет активировать систему протеина С и оценить её функцию [77]. ТГТ можно проводить, используя бедную или богатую тромбоцитами плазму, цельную кровь [151]. Генерация тромбина *ex vivo* (с лат. — «из жизни»), то есть эксперимент в живой ткани, перенесённой из организма в искусственную внешнюю среду, отражает эндогенную способность системы гемостаза и может свидетельствовать о тромботическом или геморрагическом риске. В отличие от рутинных скрининговых тестов (ПВ и АЧТВ) ТГТ отражает вклад прокоагулянтных и антикоагулянтных элементов, включая двойственную функцию тромбина [151, 152]. Учитывая разнонаправленные эффекты тромбина (прокоагулянтные и антикоагулянтные) при образовании кровяного сгустка, его часто называют белком с лицом Януса [151].

Актуальной проблемой для клиницистов является определение различных фенотипов кровотечения у пациентов с гемофилией при одном и том же уровне фактора свёртывания. Используя ТГТ, можно определить индивидуальную гемостатическую способность [153], персонализировать лечение и проводить мониторинг эффективности заместительной терапии у таких пациентов [154]. В

случае незаместительной терапии в исследовании, проведённом Dargaud и соавт., на основе *ex vivo* профиля генерации тромбина был подобран препарат и доза шунтирующего агента, восстанавливающие гемостатический баланс. Результаты исследования показали клиническую значимость этого подхода, а именно отсутствие кровотечения у пациентов [155]. Аналогичные результаты были получены Kizilosak и соавт. у пациентов с тяжёлой гемофилией ингибиторной природы, получавших эмицизумаб в сочетании с шунтирующим агентом. С помощью ТГТ была определена эффективная доза препарата и минимизирован риск тромботических осложнений [156].

Не менее актуальным является вопрос поиска подходов для диагностики предтромботического состояния ведущего к развитию тромбоза. Генетическое тестирование не отражает ни реализацию полиморфизма генов на уровне функционирования белков, ни взаимодействия компонентов коагуляционного каскада. С этой точки зрения определение лабораторных фенотипов для стратификации тромботического риска может иметь решающее значение. По данным литературы, ТГТ обладает предиктивной способностью относительно риска развития первого и повторного венозного тромбоза; чувствителен к полиморфизму генов гемостаза; определяет связь между гиперкоагуляцией и рецидивирующим тромбозом; выявляет резистентность к активированному протеину С у пациентов с персистенцией АФА и ВА; параметры ТГТ являются предикторами летального исхода от сердечно-сосудистой патологии [157, 158, 159, 160, 161, 162]. Показано, что параметры ТГТ перед операцией могут использоваться в качестве предикторов тромбоза у новорождённых [163]. Активация свёртывания крови, на фоне инфекции, обусловленной вирусными или бактериальными патогенами, развивается после увеличения экспрессии тканевого фактора (инициатора внешнего пути свёртывания крови) на клетках врождённого иммунитета и эндотелиальных клетках сосудов (ЭК) [164]. В таких случаях образование тромбина связывают с активацией внешнего пути, опосредованной тканевым фактором, однако нельзя исключить роль внутреннего пути свёртывания. Образующийся тромбин активирует фактор XI, тем самым усиливая своё

образование за счёт положительной обратной связи, что было продемонстрировано при лихорадке Денге [165]. ТГТ позволяет оценить общий уровень тромбинемии, что крайне важно для прогноза развития заболевания. На образование тромбина влияет низкомолекулярный гепарин (НМГ), а параметры ТГТ являются дозозависимыми [166]. Таким образом, ТГТ отражает результат прокоагулянтной и антикоагулянтной активности, включая систему протеина С, в плазме крови и является универсальным методом для диагностики, прогнозирования, профилактики и мониторинга лечения наследственных и приобретённых коагулопатий, оценки тромбогенного потенциала гемостаза, мониторинга терапии антикоагулянтами, выявления гиперкоагуляции и ДВС-синдрома [77]. Наличие автоматизированных систем и стандартизация метода может способствовать внедрению ТГТ в рутинную клиническую практику.

Тест тромбодинамика

Тест тромбодинамика (ТД) – интегральный тест, позволяющий обнаружить гипер- или гипокоагуляционное состояние системы гемостаза [167, 168]. Этот метод основан на регистрации пространственного роста фибринового сгустка после активации свёртывания в тонком слое плазмы после контакта с поверхностью вставки-активатора с иммобилизованным тканевым фактором. Процесс роста сгустка регистрируется серийным фотографированием в течение 30 минут, на основании которого формируется график роста сгустка в зависимости от времени [77].

Основным направлением использования ТД является мониторинг системы гемостаза при терапии антикоагулянтами. Поскольку ответ на антикоагулянтную терапию индивидуальный, в ряде случаев развиваются осложнения (кровотечения и тромбозы). Российскими исследователями (Баландина А. и соав.) показано, что ТД обладает высокой чувствительностью к эффектам НФГ и НМГ как профилактического, так и терапевтического режимов и может использоваться для мониторинга гепаринотерапии. В их работе продемонстрирована одинаково высокая корреляционная зависимость анти-Ха активности и ТД (параметр V) от

дозы НМГ [169], поэтому выбор метода зависит от технических возможностей лаборатории. Однако, следует учесть высокие требования к преаналитическому (короткий интервал времени, отведённый на подготовку образца крови, и запрет на транспортировку), аналитическому этапу (квалификация оператора) и постаналитическому (интерпретация результатов) для исследований ТД.

Litvinov R. и соавт., используя ТД, определили причинно-следственную связь нарушений гемостаза с местным и системным воспалением при COVID-19: плотность сгустка зависела от СРБ и скорости оседания эритроцитов (СОЭ); размер сгустка от количества моноцитов в крови; начальная скорость образования сгустка от IL-8. Однако повышение СРБ более 10 мг/л парадоксальным образом ассоциировалось со снижением скорости роста сгустка V [170]. Сочетание гипокоагуляции с высокими уровнями СРБ в крови согласуется со способностью СРБ замедлять свёртывание крови *in vitro* путём блокирования прокоагулянтных фосфолипидов [171]. По той же причине начальная скорость роста сгустка была значительно меньше у пациентов с повышенным уровнем антител к кардиолипину [170]. Поскольку высокие уровни СРБ и АФА характерны для пациентов с COVID-19, интерпретация данных ТД у этой категории пациентов затруднительна. Учитывая вышеизложенные особенности теста ТД в нашей работе данный метод не использовался.

Тромботические осложнения часто возникают у больных с COVID-19 несмотря на проведение антикоагулянтной терапии. Коагулопатия, ассоциированная с COVID-19, имеет особый фенотип, отличающийся от коагулопатии, вызванной бактериальным сепсисом (SIC) и диссеминированном внутрисосудистом свёртывании (ДВС), но данных о клинических и лабораторных особенностях САС недостаточно. Особенностью системы гемостаза при COVID-19 является гиперкоагуляционное состояние похожее на гемофагоцитарный синдром и тромботическую микроангиопатию, патогенез которого до сих пор неизвестен, как и механизмы, приводящие к микро- и макротромбозу. Кроме того, уточняются критерии САС [172, 173]. В то же время, поиск ранних маркеров дифференциальной диагностики нарушений в системе гемостаза, основанный на

изучении фенотипа коагулопатии САС, необходим для подбора оптимальных методов терапии. Кроме того, остаётся малоизученным вопрос о динамике стабилизации состояния коагуляции после перенесённого COVID-19.

Таким образом, на сегодняшний день остаётся много нерешённых и дискуссионных вопросов:

1. Как часто у пациентов с COVID-19 развивается коагулопатия и зависит ли частота встречаемости от степени тяжести заболевания?
2. Какие изменения системы гемостаза наблюдаются при САС у пациентов с COVID-19?
3. Зависит ли лабораторный фенотип САС от степени тяжести COVID-19 и как отражается на состоянии системы гемостаза в периоде реконвалесценции?
4. Мониторинг каких лабораторных показателей системы гемостаза у пациентов с COVID-19 необходимо проводить в периоде заболевания и реконвалесценции для оптимизации профилактики тромботических осложнений?

В связи с вышеизложенным, изучение особенностей системы гемостаза у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в периоде заболевания и реконвалесценции является актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (Центр) (2-го и 3-го инфекционных отделений временного структурного подразделения «Центр для оказания медицинской помощи пациентам с подтверждённым диагнозом новой коронавирусной инфекции COVID-19 или подозрением на новую коронавирусную инфекцию COVID-19»), лаборатории клинической иммунологии и на базе инфекционного отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городской клинической больницы имени Ф.И. Иноземцева Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ГКБ им. Ф.И. Иноземцева ДЗМ»).

Данная работа была одобрена этическими комитетами соответствующих учреждений. Информированные согласия были получены от всех участников.

В соответствии с поставленными задачами в когортное проспективное исследование был включён 141 пациент, из них 50 сотрудников ФГБУ «НМИЦ АГП им В.И. Кулакова» Минздрава России, проходивших амбулаторное лечение в период 18.10.2020 – 24.12.2020; 31 пациент, госпитализированный в инфекционный стационар на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им В.И. Кулакова» Минздрава России в период с 23.04.2020 по 26.05.2020; 60 пациентов, госпитализированных в инфекционный стационар на базе ГБУЗ «ГКБ им. Ф.И. Иноземцева ДЗМ» в период с 28.12.2020 по 27.01.2021.

Пациенты были стратифицированы по тяжести состояния согласно классификации, представленной в рекомендациях Минздрава России («Временные методические рекомендации Министерства Здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19 - 26.10.2020 - Версия 9» [174]:

- *лёгкая степень* - Т тела <38 °С, кашель, слабость, боли в горле, отсутствие критериев среднетяжёлого и тяжёлого течения;

- *средняя степень* - Т тела >38 °С, ЧДД >22 /минут, одышка при физических нагрузках, изменения при КТ (рентгенографии), типичные для вирусного поражения (объем поражения минимальный или средний; КТ 1-2), SpO₂ $<95\%$, СРБ сыворотки крови >10 мг/л;

- *тяжёлая степень* - ЧДД >30 /минут, SpO₂ $\leq 93\%$, PaO₂ /FiO₂ ≤ 300 мм рт.ст., снижение уровня сознания, ажитация, нестабильная гемодинамика (систолическое АД менее 90 мм рт.ст. или диастолическое АД менее 60 мм рт.ст., диурез менее 20 мл/час), изменения в лёгких при КТ (рентгенографии), типичные для вирусного поражения (объем поражения значительный или субтотальный; КТ 3-4), лактат артериальной крови >2 ммоль/л, qSOFA > 2 балла.

Все госпитализированные пациенты, включённые в исследование, получали антикоагулянтную терапию, в соответствии с методическими рекомендациями Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (Версия 9) [174]. Пациентам, проходившим амбулаторное лечение, антикоагулянтная терапия назначалась на усмотрение врача терапевта. В группе 1 пероральные антикоагулянты (апиксабан по 2,5 мг 2 раза в сутки или ривароксабан 10 мг 1 раз в сутки) принимали 3 пациента, в группе 2 – 49 пациентов (4 человека, наблюдавшихся амбулаторно и 45 – наблюдавшихся в стационаре) принимали гепарин (НФГ или НМГ), в группе 3 все пациенты принимали гепарин (НФГ или НМГ). В исследовании не было зафиксировано случаев тромботических осложнений (ТО) и летальных исходов. Моментом выздоровления считалось получение отрицательного результата теста ПЦР на SARS-Cov-2.

2.1. Дизайн и общий объем исследования

Расчёт объёма выборки произведён с помощью программы STATISTICA 10 и основан на данных литературы о наиболее изученных параметрах системы гемостаза у больных с тяжёлой формой COVID-19 [175]. При принятии уровня альфа 0,05, уровня достоверности исследования 90 %, дельты уровня фибриногена, достаточно включить 25 человек в каждую группу; дельты D-димера – 29 человек

в каждую группу; дельты антитромбина – 48 человек в каждую группу. Таким образом, для проведения однофакторного анализа каждого из перечисленных параметров гемостаза достаточно включить по 30 человек в каждую группу, итого – 90 человек.



Рисунок 2.1. Стратификация пациентов на группы с учётом степени тяжести инфекционного процесса

Испытуемые обследовались дважды:

- в период заболевания (точка 1) – в день обращения за медицинской помощью (амбулаторное наблюдение) или в день госпитализации (стационарное наблюдение);
- в период реконвалесценции (точка 2) – в течение недели после выздоровления (амбулаторное наблюдение) или в день выписки (стационарное наблюдение).

Критерии включения: возраст более 18 лет, подтверждённый лабораторно диагноз COVID-19 (положительный ПЦР-тест на SARS-CoV-2), подписанное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии исключения: необходимость проведения хирургического вмешательства во время госпитализации по поводу COVID-19, отказ пациента от продолжения участия в исследовании, нарушение протокола исследования.

Критерии невключения: для женщин: беременность или период лактации, наследственный дефицит факторов свёртывания крови, пурпура и другие

геморрагические состояния, онкологические заболевания на период болезни, трансплантированные органы, инфекционные заболевания, кроме SARS-CoV-2.

Для решения 1, 2, 4-й задачи пациенты были стратифицированы на группы по степени тяжести согласно «Временным методическим рекомендациям Министерства Здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19 (Версия 9)» [174] (Рисунок 1).

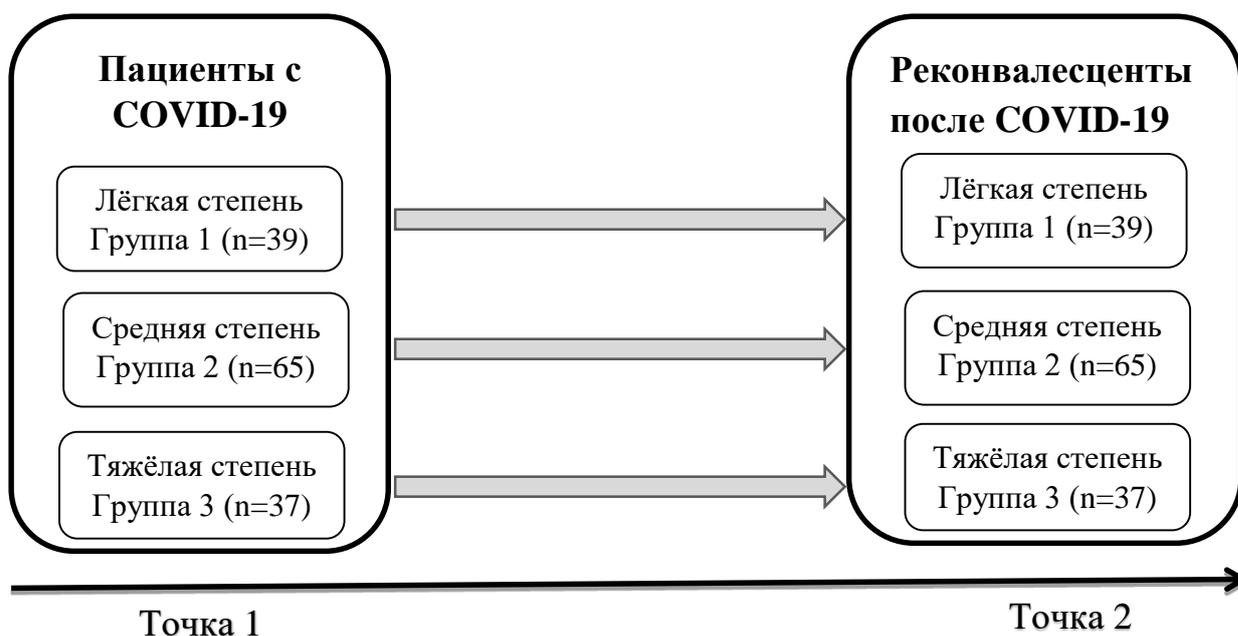


Рисунок 2.2. Дизайн исследования для задачи 1, 2, 4

Лабораторные исследования для задачи 1:

- Коагулометрические показатели (фибриноген по Клауссу, ПВ, МНО, протромбин, АЧТВ, ТВ, D-димер, антитромбин, протеин С, vWF:Ag, vWF:RCo, антиХа-активность)

Лабораторные исследования для задачи 2:

- Тромбоэластометрия (NATEM, EXTEM, INTEM, FIBTEM)
- Количество тромбоцитов (точка 1)

Лабораторные исследования для задачи 4:

- Коагулометрические показатели (антиХа-активность, ВА)
- Уровень и активность ADAMTS-13, определённые методом ИФА

Для решения 3-й задачи пациенты с COVID-19 средней степени тяжести стратифицированы на подгруппы в зависимости от условий наблюдения: амбулаторное и стационарное.

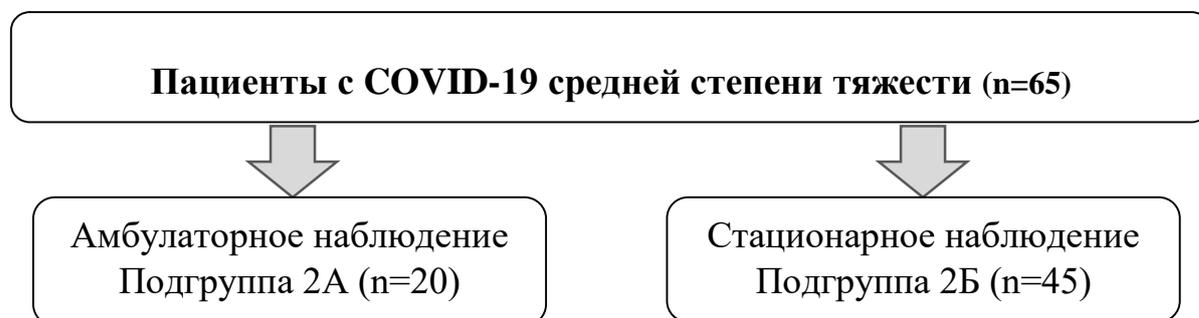


Рисунок 2.3. Дизайн исследования для задачи 3

Лабораторные исследования для задачи 3:

- Коагулометрические показатели (фибриноген по Клауссу, ПВ, МНО, протромбин, АЧТВ, ТВ, D-димер, антитромбин, протеин С, Ag:vWF, vWF:RCo, антиХа-активность)
- Генерация тромбина (AUC, C_{max})

2.2. Материалы исследования

В качестве материала для исследования использовались образцы венозной крови, полученные из периферической вены с помощью закрытых вакуумных систем для взятия крови (Sarstedt, Германия) с активатором свёртывания, антикоагулянтом цитратом натрия 106 мМ (3,2%) и ЭДТА в зависимости от вида исследования. Согласно рекомендациям, взятие крови для оценки системы гемостаза проводилось в последнюю очередь, так как в первой капле крови содержался тканевый фактор, который мог повлиять на полученные результаты [176]. Пробирки транспортировались в лабораторию в вертикальном положении, при соблюдении температурного режима $-18-22^{\circ}\text{C}$ в течение 2-х часов с момента взятия крови. Для проведения исследований использовались полученные в соответствии с правилами пробоподготовки образцы цельной венозной крови,

сыворотки крови и плазмы, а также аликвоты образцов сыворотки и цитратной плазмы, хранившихся в биобанке Центра при -80°C .

Для исследования показателей гемостаза в качестве образца использовалась как цельная венозная кровь, так и плазма. Для получения бедной (БТП) тромбоцитами плазмы центрифугирование проводили в течение трёх часов после взятия крови с помощью центрифуги СМ-6 (ELMI, Латвия) в течение 15 минут (1500g) при комнатной температуре. Для отсроченных исследований гемостаза образцы цитратной плазмы замораживали в течение 4 часов после взятия крови для предотвращения снижения активности факторов свёртывания. Образцы размораживали при температуре 37°C в термостате Гном («ДНК-технология, Россия) непосредственно перед началом исследования.

2.3. Лабораторные методы исследования

Лабораторные исследования проводили на базе лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России. Показатели плазменного гемостаза оценивали с помощью автоматического коагулометра ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory, США). Интегральные показатели гемостаза были получены методом ротационной тромбоэластометрии с помощью 4-х канального тромбоэластометра ROTEM delta (Tem Innovations GmbH, Германия и автоматизированным методом оценки динамики образования и инактивации тромбина «ETP INNOVANCE®» на анализаторе SIEMENS BCS XP (Германия, Siemens-Healthcare Diagnostics) (Таблица 2.1).

Таблица 2.1

Методы исследования системы гемостаза и референсные значения параметров

Показатель, единицы измерения	Референсный интервал
<i>Коагулометрические исследования</i>	
Фибриноген по Клауссу*, г/л	1,7 – 3,7

Показатель, единицы измерения	Референсный интервал
Протромбиновое время (ПВ), МНО, протромбин по Квику, сек / - / %	9,4-12,5/0,8 – 1,2 / 77 – 125
Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), сек	20 – 38
Тромбиновое время (ТВ), сек	15-25
D-димер, мкг/л	<450
Антитромбин (АТ), %	83-125
Протеин С (ПС), %	70-140
Фактор Виллебранда (vWF:Ag), %	I гр. крови: 42,0 -141 II,III, IV гр. крови: 66-176
Активность фактора Виллебранда (vWF:RCo), %	I гр. крови: 48 -202; II,III, IV гр. крови: 60-240
Концентрация гепарина в крови (антиХа-активность), МЕ/мл	Профилактическая доза НМГ: 0,2 - 0,4 Терапевтическая доза НМГ: 0,5 - 1,0
Волчаночный антикоагулянт: Тест с ядом гадюки Рассела (dRVVT), у.е. Тест с кварцевым активатором (SCT), у.е.	< 1,2 – не выявлен > 1,2 – выявлен
<i>Тест генерации тромбина</i>	
Генерация эндогенного тромбина (AUC)*, % от нормы	94 - 101
Максимальная концентрация тромбина (Cmax)*, % от нормы	97 - 105
<i>Тромбоэластометрия NATEM</i>	
Время свёртывания (СТ _{NATEM})*, сек	558–1181
Время образования сгустка (CFT _{NATEM})*, сек	150–562
Угол α_{NATEM} *, градусы	27-61
Плотность сгустка через 10 мин. (A10 _{NATEM})*, мм	22–52
Плотность сгустка через 20 мин. (A20 _{NATEM})*, мм	36-64
Максимальная плотность сгустка (MCF _{NATEM})*, мм	40–64
Максимальный лизис сгустка (ML _{NATEM})*, %	<16
Индекс тромботического потенциала (ТPI _{NATEM})*, ус.ед.	4-30
<i>Тромбоэластометрия EXTEM</i>	
Время свёртывания (СТ _{EXTEM}), сек	38-79
Время образования сгустка (CFT _{EXTEM}), сек	34-159
Угол α_{EXTEM} *, градусы	64-79

Показатель, единицы измерения	Референсный интервал
Плотность сгустка через 10 мин. ($A_{10_{EXTM}}$), мм	43-65
Плотность сгустка через 20 мин. ($A_{20_{EXTM}}$)*, мм	55-72
Максимальная плотность сгустка (MCF_{EXTM}), мм	50-72
Максимальный лизис сгустка (ML_{EXTM}), %	<15
Индекс тромботического потенциала (TRI_{EXTM})*, ус.ед.	19-31
<i>Тромбоэластометрия INTEM</i>	
Время свёртывания (CT_{INTEM}), сек	100-240
Время образования сгустка (CFT_{INTEM}), сек	30-110
Угол α_{EXTM} *, градусы	64-80
Плотность сгустка через 10 мин. ($A_{10_{INTEM}}$), мм	44-66
Плотность сгустка через 20 мин. ($A_{20_{INTEM}}$)*, мм	55-70
Максимальная плотность сгустка (MCF_{INTEM}), мм	50-71
Максимальный лизис сгустка (ML_{INTEM}), %	<15
Индекс тромботического потенциала (TRI_{INTEM})*, ус.ед.	39-143
<i>Тромбоэластометрия FIBTEM</i>	
Плотность сгустка через 10 мин. ($A_{10_{FIBTEM}}$), мм	8-23
Плотность сгустка через 20 мин. ($A_{20_{FIBTEM}}$)*, мм	9-25
Максимальная плотность сгустка (MCF_{FIBTEM}), мм	10-25
Максимальный лизис сгустка (ML_{FIBTEM})*, %	<9
<i>Иммуноферментный анализ (ИФА)</i>	
Антиген ADAMTS-13 (ADAMTS-13:Ag), мЕД/мл	0,41-1,41
Активность ADAMTS-13 (ADAMTS-13:Act), мЕД/мл	0,4-1,3
<i>Гематологические исследования</i>	
Количество тромбоцитов $\times 10^9$ /л,	150-400

Примечание: представленные референсные значения указаны производителем в инструкциях к наборам реагентов или получены в лаборатории Центра*

2.3.1. Коагулометрические методы

В образцах БТП с помощью клоттинговых, хромогенных и иммунотурбидиметрических методов определяли следующие показатели: концентрацию фибриногена по Клауссу, протромбиновое время, МНО, протромбин по Квику, активированное частичное тромбопластиновое время,

тромбиновое время, D-димер, антитромбин, протеин С, антиген и ристоцитин-кофакторную активность фактора Виллебранда, концентрацию НМГ в крови – с использованием реагентов HemosIL (Италия). Исследования проводили на автоматическом коагулометре ACL TOP 700 (Instrumentation Laboratory, США).

Клоттинговым методом с использованием коммерческого набора «QFA Thrombin» определяли количество **фибриногена** по Клауссу. После добавления избытка высокоактивного тромбина к разбавленной плазме измеряли время свёртывания (т.е. время начала образования сгустка). Логарифм времени свёртывания обратно пропорционален логарифму концентрации фибриногена. Концентрацию фибриногена в образце плазмы определяли по калибровочной кривой.

Протромбиновое время (ПВ) определяли клоттинговым методом, используя коммерческий набор «Recombiplastin 2G», основу которого составляет рекомбинантный тканевой фактор человека (РТФ). Готовый реагент представляет собой лизосомальный препарат, содержащий РТФ, обогащённый смесью синтетических фосфолипидов, к которому добавлены хлорид кальция, буфер, консерванты и полибрен, который делает его нечувствительным к дозам гепарина менее 1 ЕД/мл. Поскольку РТФ не содержит никаких контаминирующих факторов свёртывания, этот ПВ-реагент проявляет высокую чувствительность к дефициту факторов внешнего пути свёртывания (X, VII, V, II). Для стандартизации тромбопластинов используется МИЧ (Международный Индекс Чувствительности) и каждая серия Recombiplastin 2G калибруется относительно соответствующего международного стандарта (RTF/95) согласно рекомендации ВОЗ. МНО рассчитывается по формуле: $\text{МНО} = (\text{ПВ исследуемой плазмы} / \text{ПВ нормальной плазмы}) * \text{МИЧ}$. Значение МИЧ для данного лота указано в инструкции к набору.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) определяли клоттинговым методом, используя коммерческий набор «SynthAsil». Инкубация при 37°C образца плазмы с фосфолипидами (имитирующими мембрану тромбоцитов), контактным активатором (высокодисперсная суспензия отрицательно заряженных кремниевых частиц) и буфером создаёт условия для

контактной активации свёртывания. «SynthAsil» чувствителен к снижению концентрации факторов внутреннего и общего путей (XII, XI, IX, VIII, X, V, II и I), эффектам антикоагулянтной терапии гепарином и присутствию ингибиторов, в том числе волчаночных антикоагулянтов.

Тромбиновое время определяли клоттинговым методом, используя коммерческий набор «Thrombin Time». Под влиянием низкой концентрации тромбина характеризуется конечный этап свёртывания – скорость полимеризации фибриногена, которая напрямую зависит от его концентрации, качества и наличия в плазме антикоагулянтов. Данный тест имеет наибольшую чувствительность к присутствию нефракционированного (НФГ) и в меньшей степени низкомолекулярного (НМГ) гепарина, которая зависит от pH среды.

Определение **D-димера** в цитратной плазме осуществляли количественным иммунотурбидиметрическим методом, используя набор «D-DimerHS-500». D-димеры входят в состав растворимых продуктов деградации фибрина, поперечно сшитого фактором XIIIa. Плазмин, расщепляет нерастворимый поперечно-сшитый фибрин, образуя ряд растворимых производных, их молекулярный вес зависит от степени расщепления. Эти растворимые продукты деградации фибрина содержат неоантиген (D-димер домен), который отсутствует в исходной молекуле фибриногена, продуктах его деградации или в растворимом фибрине. D-димер – тест с высокой отрицательной диагностической значимостью. Реагент в наборе «D-DimerHS-500» представляет собой суспензию полистироловых латексных частиц, покрытых моноклональными антителами, высокоспецифичными к D-димер домену. При смешивании плазмы, содержащей D-димер, с реагентом и буфером, латексные частицы агглютинируют. Степень агглютинации прямо пропорциональна концентрации D-димера в образце и определяется по уменьшению светопропускания при длине волны 405 нм по калибровочному графику. Результаты выражались в фибриноген эквивалентных единицах (Fibrinogen Equivalent Unit) FEU - это количество фибриногена, приводящее к определяемому уровню D-димера (мкг/л).

Антитромбин (АТ) или кофактор гепарина I, является главным ингибитором свёртывания крови, блокирует тромбин, факторы Ха и IXa. В наборе «Liquid Antithrombin» используется синтетический хромогенный субстрат для ф.Ха, благодаря этому метод специфичен и не зависит от ко-фактора гепарина II. Уровень антитромбина измеряется в два этапа: инкубация плазмы с фактором Ха в присутствии избытка гепарина, а затем - количественное определение остаточной активности ф.Ха с помощью синтетического хромогенного субстрата. Высвобождение паранитроанилина измеряется кинетическим методом при длине волны 405 нм, его количество обратно пропорционально уровню антитромбина в исследуемой плазме.

Активность **протеина С (ПС)** определяли хромогенным методом, используя коммерческий набор «ProteinC». ПС витамин К-зависимый белок, присутствующий в плазме в виде профермента. In vivo ПС активируется тромбином в присутствии тромбомодулина. In vitro ПС активируется белком яда щитомордника *Agkistrodon contortrix*. Метод определения ПС осуществляется в 2 стадии: инкубация плазмы с активатором ПС и количественное определение ПС при длине волны 405 нм.

Тест «Liquid Anti-Ха» – хромогенный тест для количественного определения **активности гепарина** (нефракционированного (НФГ) и низкомолекулярного (НМГ)) в цитратной плазме при использовании в сочетании с соответствующими калибраторами HemosIL. Гепарин способен усиливать (до 2000 раз) ингибиторную активность антитромбина в отношении протеаз коагуляции. Набор реагентов «Liquid Anti-Ха» предназначен для выполнения одностадийного хромогенного анализа, основанного на использовании синтетического хромогенного субстрата и инактивации фактора Ха. Гепарин в данном методе анализируется в составе комплекса с антитромбином, присутствующим в образце. После образования комплекса гепарин-антитромбин происходят две конкурирующие реакции: ф.Ха нейтрализуется гепарин-антитромбиновым комплексом, а оставшийся фактор Ха количественно определяется с помощью синтетического хромогенного субстрата. Высвобождение паранитроанилина из субстрата измеряется кинетически при

длине волны 405 нм. Скорость высвобождения обратно пропорциональна уровню гепарина в образце. Для снижения перекрестной реакции с антагонистами гепарина, такими как тромбоцитарный фактор 4, в реакционную смесь добавляется сульфат декстрана.

Определение активности **фактора Виллебранда (vWF)** проводили иммунотурбидиметрическим методом. Принцип метода: исследуемую плазму смешивают с латексным реагентом и реакционным буфером, в результате латексные частицы агглютинируют, а агглютинация, измеряемая по уменьшению светопропускания образца при появлении агрегатов, прямо пропорциональна концентрации vWF:Ag.

Ристомицин-кофакторную активность фактора Виллебранда (vWF:RCo) в плазме крови определяли иммунотурбидиметрическим методом, в котором воспроизводится способность фактора Виллебранда взаимодействовать с одним из рецепторов тромбоцитов (комплекс гликопротеинов GPIb-IX-V) *in vitro* в присутствии ристоцетина. Принцип метода: рекомбинантные фрагменты гликопротеинового рецептора тромбоцитов (rGPIb α) нанесены на латексные частицы с помощью специфических моноклональных антител, в присутствии ристоцетина фактор Виллебранда пациента связывает латексные частицы, агглютинация прямо пропорциональна активности vWF в образце и оценивается по уменьшению светопропускания в процессе образования агрегатов по калибровочной кривой.

Волчаночный антикоагулянт (ВА) определяли согласно рекомендациям Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) двумя независимыми тестами (dRVVT и SCT), включающими скрининг (screen) и подтверждение (confirm). В тесте dRVVT яд гадюки Рассела активирует ф. X, а полибрен, делает тест нечувствительным к присутствию гепарина в концентрации до 1 ЕД/мл. В реагенте скрининг (dRVVT screen) содержится низкое количество фосфолипидов, что делает его чувствительным к ВА, а в реагенте подтверждение (dRVVT confirm) содержится избыточное количество фосфолипидов, нейтрализующих ВА и способствующих восстановлению нормального времени свёртывания.

Аналогичный принцип идентификации ВА применяется в тесте с кварцевым активатором SCT (Screen, Confirm. В соответствии с требованиями C28-A3 CLSI для каждого лота реагента (dRVVT screen, dRVVT Confirm, SCT Screen, SCT Confirm) были определены средние значения в секундах, которые использовались в качестве постоянного знаменателя при расчёте коэффициентов k_{screen} и k_{confirm} . Результат выражался нормализованным отношением $(NR) = k_{\text{screen}} / k_{\text{confirm}}$. Тест на ВА считали позитивным при $NR > 1,2$.

2.3.2. Ротационная тромбоэластометрия ТЭМ

Ротационная тромбоэластометрия (ТЭМ) – графическая регистрация вязкоэластичных свойств образца цельной крови в условиях, приближенных к *in vivo*. Метод отражает кинетику этапов формирования сгустка, его плотность и скорость лизиса. Низкая скорость сдвига, используемая в данной методике сопоставима со скоростью венозного кровообращения [177]. В отличие от стандартных тестов коагуляции (ПВ, АЧТВ) тромбоэластометрия позволяет выявлять как гипо-, так и гиперкоагуляционное состояние [99].

Методика выполнения. Образец крови помещается в кювету, затем туда погружается цилиндрический стержень (расстояние между стержнем и кюветой составляет 1 мм), который вращается вправо и влево вокруг своей оси (Рисунок 2.2). Пока кровь жидкая, она не препятствует движению стержня, но после появления первых нитей фибрина, когда кровь начинает сворачиваться, возникает сопротивление движению стержня, при этом величина сопротивления стержня прямо пропорциональна прочности сгустка. Цифровая детекция процесса свёртывания осуществляется оптическим методом. По горизонтальной оси программное обеспечение ROTEM® в миллиметрах строит кривую зависимости (ТЕМограмму) прочности сгустка от времени и рассчитывает численные значения параметров (Рисунок 2.2).

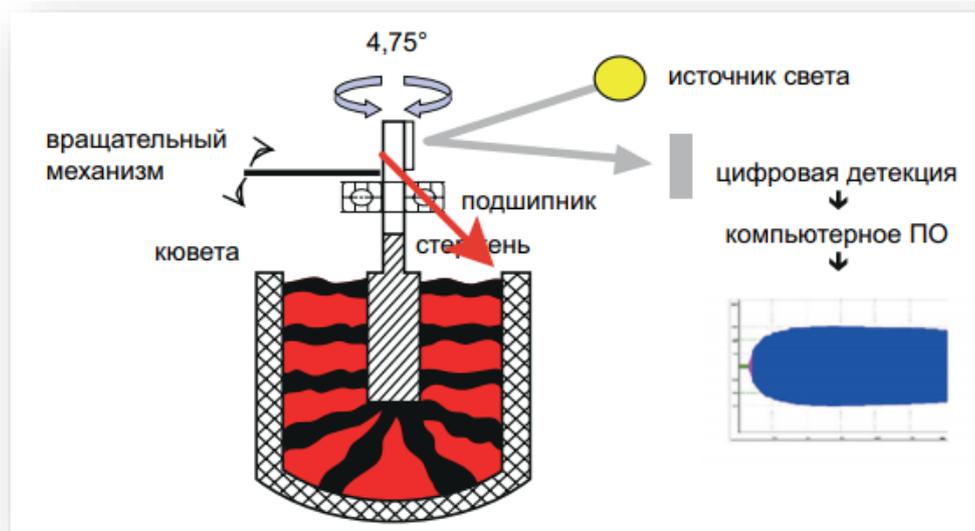


Рис. 2.4. Метод детекции в тромбозластометрии (ТЭМ)

В нашем исследовании применялась нативная тромбозластометрия, свёртывание в таком случае запускалось после рекальцификации цитратной крови путём добавления реагента NATEM (хлорида кальция (CaCl_2)). Кроме того, в работе использовались тесты с активаторами: EXTEM – для инициации процесса свёртывания по внешнему пути добавлялся тканевой фактор (ТФ); INTEM – для активации по внутреннему (контактному) пути в образец вносили эллаговую кислоту; функциональную активность фибриногена – FIBTEM определяли при активации коагуляции аналогично тесту EXTEM, но блокировали вклад тромбоцитов с помощью цитохалазина, благодаря чему формирование сгустка происходило только за счёт полимеризации фибрина.

Параметры тромбозластометрии (ТЭМ) делятся на хронометрические, и структурные. Хронометрические параметры характеризуют время: время свёртывания – CT (Clotting Time, сек.) – рассчитывается от начала измерения до образования и полимеризации первых нитей фибрина (начало формирования сгустка), за это время происходит наработка тромбина; время формирования сгустка – CFT (Clot Formation Time, сек.) – рассчитывается от начала формирования сгустка до прочности 20 мм. Альфа-угол – (α -угол, градусы) – угол между базовой линией и касательной к кривой коагуляции, проведённой через точку 2 мм на

ТЭМограмме. Структурные параметры характеризуют качество образовавшегося сгустка: амплитуда (прочность) в точке x – (A_x , мм) – прочность сгустка в соответствующее время после интервала СТ); максимальная прочность сгустка – MCF (Maximum Clot Firmness). Максимальный лизис – ML (Maximum Lysis) – это снижение прочности сгустка после достижения максимальной прочности сгустка MCF, о гиперфибринолизе свидетельствует $ML > 15\%$ в течение 1 часа (Рисунок 2.3.)

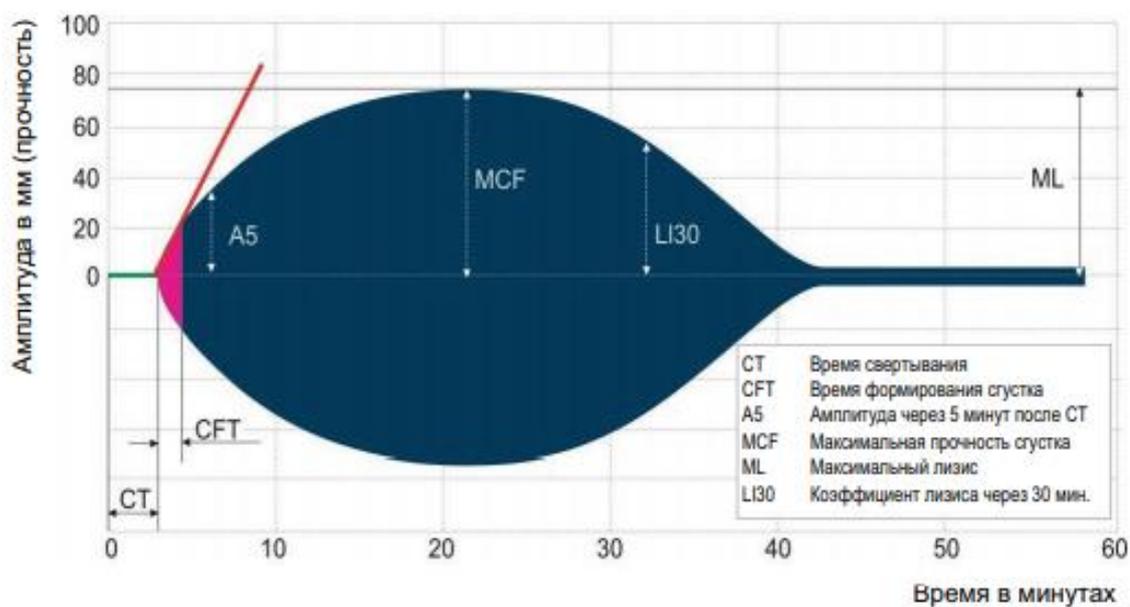


Рисунок 2.5. Основные параметры тромбоэластометрии (ТЭМ)

2.3.3. Тест генерации тромбина

Тест «ETP INNOVANCE®» (эндогенный тромбиновый потенциал) – усовершенствованный метод интегральной оценки количественного образования тромбина, предложенного Nemker и соавт. [178]. «INNOVANCE ETP» – автоматизированный метод оценки динамики образования и инактивации тромбина. Принцип метода: БТП инкубировалась с фосфолипидами и ионами кальция, после добавления активатора (РТФ (Dade® Innovin®)) происходила

инициация и дальнейшее развитие процесса свёртывания, что в итоге вело к образованию тромбина (фактор IIa). Образование и последующая инактивация тромбина регистрировалась посредством мониторинга преобразования слабореактивного тромбин-специфического хромогенного субстрата при длине волны 405 нм. Кривая образования тромбина представлена на рисунке 2.4.



Рисунок 2.6. Кривая образования тромбина

Параметры, получаемые на основе кривой генерации тромбина: время запаздывания (lag time) – интервал времени от внесения активатора до инициации процесса, t_{max} - время до достижения максимального количества тромбина, высота пика (C_{max}) – максимальная концентрация тромбина, эндогенный потенциал тромбина – площадь под кривой (AUC). Анализ проводился на автоматизированном анализаторе Siemens Healthcare Diagnostics.

2.3.4. Определение антигена и активности ADAMTS-13

Для определения антигена и активности ADAMTS-13 (дезинтегрин-подобной металлопротеиназы с мотивом тромбоспондина 1, 13) в сыворотке крови

использовали иммуноферментные наборы «TECHNOZYM ADAMTS-13 Antigen» и «TECHNOZYM ADAMTS-13 Activity» соответственно. Оптическую плотность измеряли на иммуноферментном анализаторе Infinite F50 (TECAN, Австрия) при длине волны 450 нм, результаты оценивали по калибровочной кривой.

2.4. Проведение контроля качества лабораторных исследований

Внутрилабораторный (внутренний) контроль качества проводили согласно приказу "Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов "Министерства здравоохранения Российской Федерации об утверждении отраслевого стандарта №220 от 2003 г. ГОСТ 91500.13.0001-2003. Внутренний контроль качества выполнялся ежедневно, с использованием контрольных материалов для коагулометрических исследований: Norma, High, Low Abnormal Control ASSAYED; Special Test Control Level 1, Level 2, производства Instrumentation Laboratory (Испания) и Control N, Control P производства Siemens Healthineers (Германия).

Внешний контроль качества (ВКК) выполнялся в соответствии с требованиями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития №01И-787/05 от 26.12.2005 и №01И-778/07 от 20.11.2007, а также согласно приказам МЗ от 25.12.97 №380 и 07.02.2000 №45. Лаборатория систематически участвует в международной программе ВКК коагулология RIQAS (Randox International Quality Assessment Scheme), аккредитованной по ISO 15189:2015.

2.5. Статистический анализ

Для статистического анализа использовали таблицы клинических и лабораторных данных, составленные с использованием программы Microsoft Excel 2007. Для статистического анализа данных применяли пакеты прикладных программ Microsoft Office Excel, MedCalc® Software (версия 14.8.1) и Statistica for Windows (версия 10). Категориальные данные анализировали, используя тест χ^2 . Количественные данные анализировали, определяя вид распределения данных (тест Колмогорова-Смирнова): при нормальном распределении данных вычисляли средние значения и стандартное отклонение ($M \pm Sd$), оценку различий в группах осуществляли методом параметрической статистики (t-тест – сравнение в 2-х группах, ANOVA – сравнение в 3-х группах, тест Мак-Немара – сравнение связанных данных в одной группе); при ненормальном распределении данных вычисляли медианы с интерквартильным размахом ($Q_{25}-Q_{75}$), оценку различий в группах осуществляли с использованием методов непараметрической статистики (теста Манна-Уитни – при сравнении 2-х групп, теста Краскела-Уоллиса – при сравнении 3-х групп, критерия Уилкоксона – при сопоставлении показателей, измеренных в разных условиях на одной и той же выборке. Корреляционный анализ проводили, используя непараметрический критерий Спирмена. Пороговые значения тестов определяли с помощью ROC-анализа. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $P < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Характеристика групп пациентов с COVID-19

В ходе работы были изучены клинические данные пациентов с COVID-19 лёгкой (группа 1), средней (группа 2) и тяжёлой степени (группа 3) инфекционного процесса, представленные в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Клиническая характеристика пациентов с COVID-19 разной степени тяжести

Показатель		Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	P-уровень
Пол	мужчины	7 (17,9 %)	24 (36,9 %)	22 (59,5 %)	0,0009***
	женщины	32 (82,1 %)	41 (63,1 %)	15 (40,5 %)	
Возраст, лет		38 (34 – 54)	60 (43 – 78)	63 (53 - 71)	0,0001**
Возраст ≥ 56 лет		8 (20,5%)	41 (63,1 %)	25 (67,6 %)	<0,0001***
Рост, м		1,67 \pm 0,09	1,68 \pm 0,08	1,69 \pm 0,07	0,5664*
Масса тела, кг		71,3 \pm 15,4	78,5 \pm 20,3	83,3 \pm 12,5	0,0094*
ИМТ, кг/м ²		25,2 \pm 4,4	27,4 \pm 6,2	29,1 \pm 5,3	0,0092*
Пациенты с ИМТ ≥ 25 кг/м ²		19 (48,7 %)	34 (52,3 %)	29 (78,4 %)	0,0138***

Примечание: * M \pm Sd, ANOVA; ** Me, (Q25-Q75) (тест Краскела-Уоллиса); *** абс (%), χ^2 -тест

В группах 1 и 2 преобладали женщины, в группе 3 – мужчины. Пациенты группы 2 и 3 были значимо старше, пороговый возраст составил 56 лет. Степень тяжести COVID-19 зависела от индекса массы тела (ИМТ), при этом во всех группах пациентов средний ИМТ был выше нормы. Пациентов с избыточной массой тела и ожирением (ИМТ ≥ 25 кг/м²) было больше в группе 3.

Изучив распространённость групп крови и резус-фактора, выявлено, что, в группе 1 преобладали пациенты с O (I) группой крови, а число пациентов с A (II) группой крови было больше в группах 2 и 3 (Таблица 3.2).

Группа крови и резус-фактор пациентов с COVID-19 разной степени тяжести

Показатель	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	P-уровень
Группа крови 0 (I)	18 (46,1%)	9 (13,9%)	10 (27,0%)	0,0017
Группа крови А (II)	12 (30,8%)	42 (64,6%)	18 (48,7%)	
Группа крови В (III)	3 (7,7%)	11 (16,9%)	7 (18,9%)	
Группа крови АВ (IV)	6 (15,4%)	3 (4,6%)	2 (5,4%)	
Резус-фактор (Rh+)	34 (87,2%)	57 (87,7%)	33 (99,2%)	0,9610

Примечание: абс (%), χ^2 -тест

Длительность клинических проявлений COVID-19 в группе 1 составила $7,4 \pm 5,1$ суток, а в группе 2 – $12,1 \pm 10,4$ суток, в группе 3 – $30,0 \pm 7,4$ суток ($P = 0,0026$). Пневмония по данным КТ была диагностирована у 53 пациентов группы 2 (81,5 %) и 37 пациентов группы 3 (100 %) ($P < 0,0001$). В группе 2 клиническая картина пневмонии соответствовала КТ-1 у 29 (54,7 %) больных или КТ-2 у 24 (45,3 %) больных, в группе 3 – КТ-1 у 2 (2,7 %) больных, КТ-2 у 7 (18,9 %) больных, КТ-3 у 28 (75,7 %) больных. Респираторная поддержка была назначена 50 пациентам группы 2 (76,9 %) и 37 пациентам группы 3 (100 %). В группе 2 респираторную поддержку проводили неинвазивной ИВЛ в виде высокопоточных канюлей у 12 (24 %) пациентов и стандартной оксигенотерапией у 38 (76 %) пациентов. В группе 3 стандартная оксигенотерапия проводилась 6 пациентам (16,2 %), неинвазивная ИВЛ – 27 (73,0 %) пациентам. Среднее время пребывания пациентов в стационаре составило $15 \pm 2,3$ дней. Лечение пациентов проводилось на основании временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) (Версия 9)» [174]. В группе 1 пероральные антикоагулянты аписабан (по 2,5 мг 2 раза в сутки) или ривароксабан (по 10 мг 1 раз в сутки) принимали 3 (%) пациента, в группе 2 – 49 (%) пациентов (4 пациента, наблюдавшихся амбулаторно, и 45 стационарных) принимали гепарин (НФГ или НМГ), в группе 3 все пациенты (100%) принимали гепарин (НФГ или НМГ).

3.2. Особенности состояния системы гемостаза у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

3.2.1. Параметры плазменного гемостаза у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести

Уровень фибриногена зависел от степени тяжести COVID-19 и был выше у пациентов группы 3 как во время заболевания (точка 1), так и в периоде реконвалесценции (точка 2). Концентрация фибриногена демонстрировала большой разброс значений в обеих точках исследования при этом в динамике уровень фибриногена снижался во всех группах пациентов (Таблица 3.3, Рисунок 3.1).

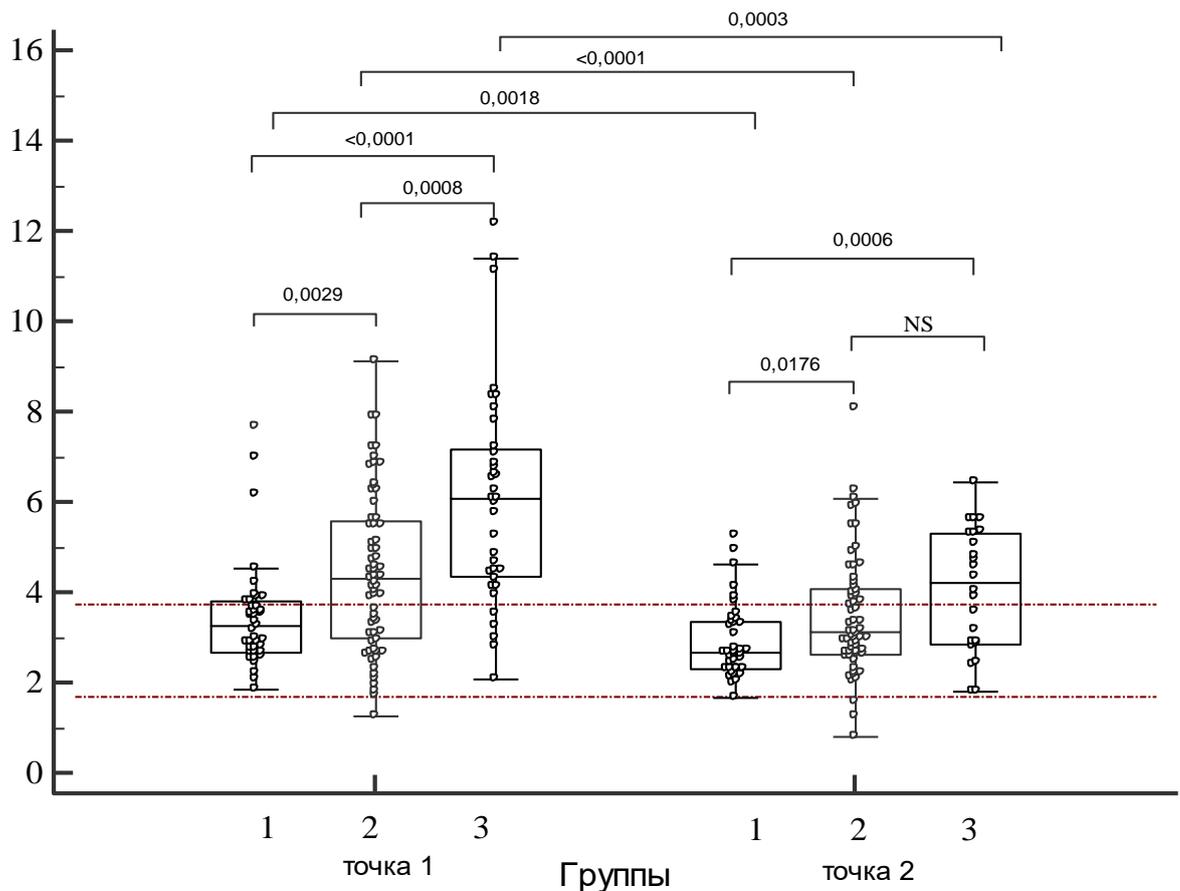


Рисунок 3.1. Динамика изменения уровня фибриногена у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Параметры плазменного гемостаза у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Показатель, ед., РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
Фибриноген, г/л (2,0-3,7)	1	3,2 (2,7-3,8)	4,3 (2,9-5,6)	6,1 (4,3-7,2)	<0,0001 ^{&}
	2	2,6 (2,3-3,4)	3,1 (2,6-4,1)	4,2 (2,9-5,3)	0,0017 ^{*, **}
		#P=0,0018	#P<0,0001	#P=0,0003	
ПВ, сек (11-16)	1	11,9 (11,4- 12,2)	12,9 (12,3- 13,8)	14,1 (12,9- 14,9)	<0,0001 ^{&}
	2	11,7 (11,3-12,2)	12,4 (11,6-13,5)	13,2 (12,0-13,8)	0,0015 ^{*, **}
		#P=0,8447	#P=0,0022	#P=0,0597	
МНО (0,8-1,2)	1	1,05 (1,01-1,09)	1,14 (1,09-1,22)	1,24 (1,13-1,31)	<0,0001 ^{&}
	2	1,03 (0,99-1,07)	1,09 (1,02-1,19)	1,16 (1,04-1,21)	0,0021 ^{*, **}
		#P=0,5716	#P=0,0010	#P=0,0715	
Протромбин по Квику, % (77-125)	1	94,0 (86,0-99,0)	81,0 (73,0-91,0)	70,0 (65,0-84,0)	<0,0001 ^{&}
	2	99,0 (92,0-107,0)	89,0 (77,5-102,0)	80,5 (73,0-95,5)	0,0011 ^{*, **}
		#P=0,0353	#P=0,0002	#P=0,0734	
АЧТВ, сек (20-38)	1	32,3 (30,4-35,0)	31,3 (29,0-34,2)	33,6 (28,7-35,4)	0,1468
	2	30,5 (29,1-32,6)	29,5 (26,9-32,5)	34,3 (28,7-35,3)	0,0201 ^{***}
		#P=0,0027	#P=0,0095	#P=0,9934	
ТВ, сек (15-25)	1	20,8 (19,5-22,0)	20,3 (19,2-22,1)	21,3 (19,5-22,4)	0,7237
	2	21,6 (20,9-22,8)	23,6 (22,0-26,7)	23,7 (21,6-27,9)	0,0004 ^{*, **}
		#P=0,0003 [^]	#P<0,0001	#P=0,0023	
D-димер, мкг/л (<450)	1	371,0 (215,0-464,0)	444,0 (326,0-738,0)	543,0 (278,0-1553,0)	0,0199 ^{*, **}
	2	215,0 (161,0-313,0)	430,5 (197,0-896,0)	940,0 (625,0-4145,0)	<0,0001 ^{&}
		#P=0,0086	#P=0,1093	#P=0,3391	

Продолжение таблицы 3.3

Показатель, ед., РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
vWF:Ag, % (42-176)	1	141,8 (116,4-223,9)	250,7 (193,7-379,2)	328,5 (255,4-365,5)	<0,0001 ^{&}
	2	128,1 (106,6-181,0)	297,7 (208,0-441,3)	372,5 (268,4-525,7)	<0,0001 ^{*,**}
		#P=0,0027	#P=0,2054	#P=0,0273	
vWF:RCo, % (48-240)	1	116,6 (78,1-136,3)	227,6 (133,9-358,5)	260,0 (203,3-316,6)	<0,0001 ^{*,**}
	2	117,9 (97,1-137,4)	294,4 (142,9-431,0)	393,7 (261,5-441,8)	<0,0001 ^{*,**}
		#P=0,1224	#P=0,0002	#P=0,0075	
АТ, % (83-125)	1	94,9 (89,7-103,9)	89 (79,6-98,2)	94,3 (83,6-105,7)	0,0437 [*]
	2	91,4 (83,5-97)	91,6 (83,7-100)	89,8 (76,5-103,5)	0,9193
		#P=0,0075	#P=0,7967	#P=0,4264	
ПС, % (70-140)	1	101,5 (94,1-113)	98,1 (78,3-113,5)	90,8 (70,7-103,3)	0,0295 ^{*,**}
	2	108 (95,2-120,5)	118,4 (99-134,4)	128 (103,1-137,8)	0,0521
		#P=0,1490	#P<0,0001	#P=0,0002	

Примечание: Me (Q25-Q75); # динамика показателей между 1 и 2 точками (Sign тест); - значение P при межгрупповом сравнении (тест Краскела-Уоллиса) отличие: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп, *** - 2 и 3, & всех групп

Удлинение ПВ и МНО зависели от степени тяжести COVID-19 (было больше у пациентов группы 3), уровень протромбина по Квику ввиду особенностей методологии, имел обратную зависимость – снижался. При этом у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести в периоде реконвалесценции наблюдалась нормализация показателей активности факторов протромбинового комплекса, а у пациентов с тяжёлой формой COVID-19 (группа 3) в точке 2 сохранялся дефицит факторов внешнего пути и было выявлено увеличение АЧТВ, одной из причин, которого может быть дефицит факторов внутреннего пути. ТВ у реконвалесцентов группы 2 и 3 было больше, чем в точке 1, при этом влияние на данный параметр антикоагулянтов было исключено (анти-Ха активность в группах не отличалась как в период заболевания ($P=0,788$), так и в периоде реконвалесценции ($P = 0,543$)).

В период заболевания уровень D-димера имел прямую зависимость от степени тяжести инфекции. Превышение РИ для D-димера (>450 мкг/л) в группе 1 отмечалось у 7 (2,7 %), в группе 2 – у 18 (11,7 %), в группе 3 – у 15 (44,1 %) пациентов. Максимальная концентрация D-димера во время заболевания в 1,2 и 3 группах составляла 1500 мкг/л, 297 700 мкг/л, 20 439 мкг/л, соответственно. Важно отметить, что в динамике уровень D-димера снижался в точке 2 по сравнению с точкой 1 только у пациентов группы 1, тогда как в группе 2 и 3 сохранялся на высоком уровне, несмотря на проводимую комплексную терапию (Рисунок 3.2).

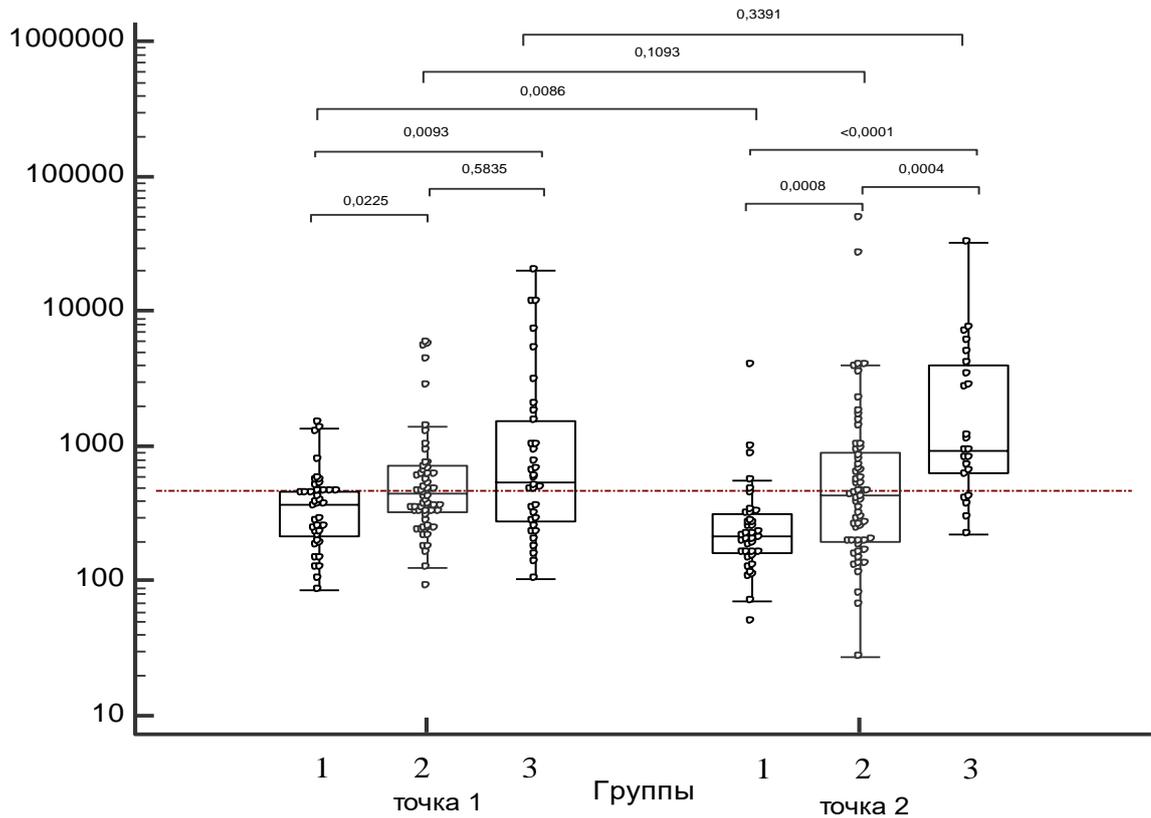


Рисунок 3.2. Динамика уровня D-димера у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Уровень антигена фактора Виллебранда (vWF:Ag) у пациентов с COVID-19 в период заболевания (точка 1) зависел от степени тяжести, максимальное значение медианы было у пациентов группы 3 (Таблица 3.3). При этом ристоцитинкофакторная активность фактора Виллебранда (vWF:RCo) была выше в группе 2 и 3 по сравнению с группой 1. В периоде реконвалесценции у пациентов группы 3 отмечалось увеличение vWF:Ag и vWF:RCo относительно исходного уровня, а в группе 1 – снижение vWF:Ag. Верхний предел референсного интервала для vWF и vWF:RCo представлен для лиц А (II), В (III), АВ (IV) группы крови (для лиц имеющих О (I) группу крови vWF:Ag 42–140,8 %, vWF:RCo 48–201%) так как в данном исследовании нас интересовало повышение биомаркёров эндотелиального повреждения, а не снижение, как при диагностике болезни Виллебранда [44].

Оценка естественных антикоагулянтов важна, поскольку они определяют способность системы гемостаза ограничивать избыточное образования тромбина. Минимальная активность антитромбина в начале заболевания была в группе 2, но

в периоде реконвалесценции отличий по данному показателю между группами не было. Активность протеина С в точке 1 была снижена у пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени, по сравнению с пациентами с COVID-19 лёгкой степени, в динамике в обеих группах наблюдалась нормализация уровня ПС.

В ходе работы были получены пороговые значения статистически значимых параметров плазменного гемостаза, отличающих пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания (Таблица 3.4).

Таблица 3.4

ROC- анализ для определения пороговых значений показателей плазменного гемостаза, отличающих пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания

Показатель	AUC, 95% ДИ	Se,%	Sp, %	Значение критерия	P- уровень
<i>Пациенты лёгкой от остальных (средней и тяжелой степени)</i>					
Фибриноген по Клауссу, г/л	0,743 (0,661-0,814)	84,62	69,39	≤3,9	<0,0001
ПВ,с.	0,815 (0,739-0,876)	87,18	74,23	≤12,5	<0,0001
МНО	0,803 (0,726-0,866)	82,05	75,26	≤1,1	<0,0001
Протромбин по Квику, %	0,775 (0,695-0,842)	82,05	72,16	>85	<0,0001
D-димер, мкг/л	0,650 (0,564-0,730)	76,92	53,61	≤464	0,0024
vWF:Ag, %	0,86 (0,748-0,883)	87,18	71,58	≤227,8	<0,0001
<i>Пациенты тяжелой от остальных (лёгкой и средней степени)</i>					
Фибриноген по Клауссу, г/л	0,765 (0,685-0,833)	82,86	61,76	>4,12	<0,0001
ПВ, с.	0,781 (0,702-0,847)	94,12	52,94	>12,4	<0,0001
МНО	0,764 (0,684-0,833)	94,12	50,00	>1,09	<0,0001
Протромбин по Квику, %	0,756 (0,675-0,826)	94,12	50,00	≤86	<0,0001
vWF:Ag, %	0,723 (0,639-0,796)	81,82	64,36	>243,1	<0,0001

Примечание: пороговые значения тестов определяли, используя ROC-анализ; чувствительность – Se, специфичность – Sp.

В по результатам коагулометрических тестов у пациентов с COVID-19 наблюдалась гиперкоагуляция с повышением уровня фибриногена, которая зависела от степени тяжести инфекционного процесса; умеренное снижение ПС; активация внутрисосудистого свёртывания крови (увеличение концентрации D-димера), которая, по-видимому, повлекла потребление факторов протромбинового комплекса. Отдельно необходимо отметить, повышение уровня фактора Виллебранда (маркера повреждения эндотелия), который, как и фибриноген зависел от степени тяжести COVID-19, что позволяет предположить важную роль гиперкоагуляции и эндотелиопатии, в развитии COVID-ассоциированной коагулопатии. В периоде реконвалесценции у пациентов группы 1 и 2 в целом наблюдалась нормализация параметров плазменного гемостаза, в отличие от пациентов группы 3 с COVID-19 тяжёлой степени, у которых сохранялся высокий уровень фибриногена и D-димера без признаков нормализации активности факторов протромбинового комплекса, но с повышением ТВ и vWF:Ag, что свидетельствовало о сохраняющихся нарушениях системы гемостаза после перенесённого COVID-19.

3.2.2. Параметры тромбоэластометрии ТЭМ у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести

По данным тромбоэластометрии (теста NATEM) межгрупповых отличий хронометрических параметров (времени свёртывания (СТ), образования сгустка (CFT) и угла- α) не было выявлено, однако в динамике данные параметры отражали уменьшение гиперкоагуляции. Плотность сгустка (A_{10} , A_{20} , MCF) и индекс тромботического потенциала (TPI) во время заболевания (точка 1) были больше у пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени (Таблица 3.5). В период реконвалесценции отличий между группами выявлено не было. Интенсивность лизиса сгустка (ML) не отличалась между группами, при этом во всех группах отмечалось снижение данного показателя в периоде реконвалесценции.

Параметры теста NATEM у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Показатель, ед.изм, РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р- уровень
СТ, сек. (558–1181)	1	641 (545-711,2)	681,5 (581,5-817)	708 (584,2-835,7)	0,1380
	2	835 (741-960)	783,0 (678-1021)	923 (614,7-1135)	0,7480
		#P=0,0001	#P=0,0014	#P=0,2059	
CFT, сек. (150–562)	1	227 (212-383)	216,5 (160,5-273)	175 (146-232,8)	0,2276
	2	254 (11,8-12,6)	253 (199,5-404,5)	441 (169,7-756,7)	0,5238
		#P=0,0037	#P=0,0016	#P=0,0398	
Угол α, %, (27-61)	1	51 (45,5-56,8)	53 (45,5-60)	57 (53-64,2)	0,0974
	2	47 (35-52)	47 (35-54,5)	51 (30,5-64,3)	0,8601
		#P=0,0055	#P=0,0028	#P=0,2194	
A ₁₀ , мм, (22–52)	1	39 (34,3-43,8)	44 (37,5-52,5)	53 (40,5-59)	0,0021 ^{*,**}
	2	39 (32-42)	38 (28-46)	33 (17,3-50,2)	0,9514
		#P=0,3118	#P=0,0013	#P=0,0578	
A ₂₀ , мм, (36-64)	1	48 (45-52,7)	55 (48,5-62)	62 (50,8-70)	0,0002 ^{*,**}
	2	50 (44-53)	50 (42,7-56,3)	45 (34,5-62,7)	0,8768
		#P=0,8053	#P=0,0064	#P=0,0413	
MCF, мм, (40–64)	1	50 (48-54)	56,5 (52-64,5)	64,1 (53-70,5)	<0,0001 ^{*,**}
	2	52,5 (47-56)	53 (48-58)	54 (49,3-64,8)	0,5519
		#P=0,5014	#P=0,0213	#P=0,1379	
TPI, у.е., (4-30)	1	14 (10,2-18,8)	18 (13-32,5)	30,1 (18,3-49,3)	0,0038 ^{*,**}
	2	13 (7-18)	13,5 (8-21)	8 (5,25-28,3)	0,7187
		#P=0,2145	#P=0,0067	#P=0,0362	
ML, %, <16	1	2 (0-4)	3 (1-5,5)	3 (0-4,3)	0,3659
	2	0,5 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-1,8)	0,5883
		#P=0,0400	#P<0,0001	#P<0,0417	

Примечание: Me (Q25-Q75); # сравнение динамики показателей в каждой группе между 1 и 2 точками (критерий Уилкоксона); - значение p при межгрупповом сравнении (тест Краскела-Уоллиса) отличие: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп, *** - 2 и 3, & всех групп

По данным теста EXTEM время (СТ) во время заболевания было больше у пациентов 2 и 3 группы по сравнению с группой 1, что свидетельствовало о снижении факторов протромбинового комплекса. Параметры CFT и угол-α отражали более выраженную гиперкоагуляцию у пациентов группы 3 по сравнению с группами 1 и 2 в обеих точках наблюдения, что свидетельствовало о наличии высокого уровня тромбина и активации тромбоцитов, которые

характеризовали прокоагулянтный фенотип системы гемостаза как в периоде заболевания, так и реконвалесценции у этих пациентов. Плотность сгустка (A_{10} , A_{20} , MCF) в точке 1 была повышена у пациентов группы 2 и 3 по сравнению с группой 1, в точке 2 только у реконвалесцентов группы 3, что также подтверждало сохраняющуюся гиперкоагуляцию (Таблица 3.6).

Таблица 3.6

Параметры теста EXTEM у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Показатель, ед.изм, РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
СТ, сек., (38-79)	1	67 (62-73)	79,9 (67-106)	81 (70,5-106,8)	<0,0001 ^{*,**}
	2	85 (71-97)	82 (70-106)	77 (74-86)	0,7192
		#P<0,0001	#P=0,6608	#P=0,2946	
CFT, сек., (34-159)	1	77 (67,5-91,8)	70 (62-86,5)	57 (50,5-72)	0,0043 ^{**,***}
	2	80 (65-95)	68,5 (57-88)	58 (44-64,5)	0,0010 ^{**,***}
		#P=0,9531	#P=0,8044	#P=0,3328	
Угол α , %, (64-79)	1	75 (72-77)	76 (73-78)	78 (76-80)	0,0043 ^{**,***}
	2	74 (71-77)	76,5 (73-79)	78 (78-82)	0,0006 ^{&}
		#P=0,7566	#P=0,7809	#P=0,4855	
A_{10} , мм, (43-65)	1	59 (53,3-60,8)	60,5 (56-66)	64 (58,5-70,5)	0,0074 ^{*,**}
	2	58,5 (53-64)	60 (55-66)	64 (58,5-70,5)	0,0054 ^{**,***}
		#P=0,9491	#P=0,8167	#P=0,5141	
A_{20} , мм, (55-72)	1	64 (59,3-66)	66 (62-71)	70 (62,8-73,3)	0,0131 ^{*,**}
	2	64 (60-68)	66 (63-71)	69 (65-74,8)	0,0065 ^{**,***}
		#P=0,7683	#P=0,9249	#P=0,5398	
MCF, мм, (50-72)	1	65 (60-67)	66 (62-72)	70 (66,3-73,3)	0,0162 ^{*,**}
	2	64,5 (60-69)	67,5 (64-71)	70 (66,3-74,7)	0,0031 ^{*,**}
		#P=0,8328	#P=0,5319	#P=0,4883	
TPI, у.е., (19-131)	1	74,5 (52-86)	87 (59,8-135)	126 (75-154)	0,0084 ^{*,**}
	2	71,5 (46-104)	86 (61,5-135,3)	122 (92-182,8)	0,0007 ^{&}
		#P=0,9204	#P=0,7217	#P=0,4291	
ML, %, (< 15)	1	6 (3,3-9)	6 (4:11)	7 (2,8:9,3)	0,8242
	2	5 (3-9)	4 (2-6)	3 (2-4)	0,0256 ^{*,**}
		#P=0,4852	#P=0,0004	#P=0,0484	

Примечание: Me (Q25-Q75); #сравнение динамики показателей в каждой группе между 1 и 2 точками (критерий Уилкоксона); - значение P при межгрупповом сравнении (тест Краскела-Уоллиса) отличие: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп, *** - 2 и 3, & всех групп

ТPI в точке 1 был повышен у пациентов группы 2 и 3, значимо различался при межгрупповом сравнении в точке 2 и зависел от исходной степени тяжести COVID-19. Межгрупповое сравнение активности фибринолиза (ML) в точке 1 не выявило отличий, однако в динамике значение параметра ML снижалось у пациентов группы 2 и 3 и в точке 2 было меньше чем в группе 1. Следует отметить отсутствие динамики изменения параметров теста EXTEM между точками 1 и 2 внутри групп.

Поскольку структурные параметры тромбоэластометрии позволяют оценить результат взаимодействия плазменного и клеточного гемостаза, мы определили корреляцию MCF_{EXTEM} от количества фибриногена и тромбоцитов у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания. Уровень тромбоцитов представлен в таблице 3.7.

Таблица 3.7

Уровень тромбоцитов у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания

Показатель, ед.изм, РИ	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	P-уровень
Тромбоциты, $\times 10^9/л$, (150-400)	239,8 \pm 52,2	235,7 \pm 90,3	260,5 \pm 110,1	0,3871

Примечание: M \pm Sd, значение P при межгрупповом сравнении (ANOVA)

Зависимость прочности сгустка MCF_{EXTEM} от фибриногена (коэффициент корреляции Спирмена) была средней во всех (1, 2 и 3) группах: $r = 0,52$ ($P=0,0037$), $r = 0,52$ ($P=0,0001$), $r = 0,62$ ($P=0,0042$) соответственно; однако корреляция прочности сгустка MCF_{EXTEM} от количества тромбоцитов в группах отличалась: $r = 0,24$ ($P=0,2468$), $r = 0,49$ ($P=0,0003$), $r = 0,75$ ($P=0,0060$), увеличиваясь соответственно степени тяжести COVID-19, несмотря на отсутствие различий между группами пациентов по количеству тромбоцитов согласно данным гематологического исследования (Таблица 3.7).

Параметр СТ теста INTEM, характеризующий активность факторов внутреннего пути свёртывания, при межгрупповом сравнении (группы 1, 2, 3) в обеих точках исследования не отличался. В точке 1 сокращение CFT и повышение

угла- α – демонстрировали гиперкоагуляцию у пациентов группы 2 и 3, кроме того, у этих пациентов была повышена плотность сгустка (A_{10} , A_{20} , MCF). В периоде реконвалесценции кинетические (CFT, угол- α), все структурные (A_{10} , A_{20} , MCF) параметры и TPI зависели от степени тяжести перенесённой инфекции и характеризовали сохраняющуюся гиперкоагуляцию. Показатель лизиса сгустка (ML) в точке 1 между группами не различался, а в точке 2 ML был меньше у пациентов группы 3. Следует отметить отсутствие динамики изменения параметров теста INTEM между точками 1 и 2, за исключением ML, в группах 2 и 3 (Таблица 3.8).

Таблица 3.8

Параметры теста INTEM у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Показатель, ед.изм, РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	P-уровень
СТ, сек., (100-240)	1	194 (178-212)	190 (174-206)	198 (189-224)	0,1924
	2	200 (192-214)	193 (172-209)	201 (181,3-216)	0,1459
		#P=0,1453	#P=0,7569	#P=0,4408	
CFT, сек., (30-110)	1	70 (62-90)	61,5 (49-72)	56 (45,3-64,3)	0,0002 ^{*,**}
	2	71(57,3-80,7)	59,5 (50-72)	49 (42-53,3)	0,0001 ^{&}
		#P=0,3219	#P=0,7630	#P=0,2511	
Угол α , %, (64-80)	1	76 (73-77)	77 (75-80)	79 (76,8-81)	0,0043 ^{*,**}
	2	75 (73,3-77,8)	78 (75-80)	80 (79-81,8)	<0,0001 ^{&}
		#P=0,7302	#P=0,9332	#P=0,1761	
A_{10} , мм, (44-66)	1	56 (52-60)	60 (56-64,5)	63 (57,5-68,5)	0,0021 ^{*,**}
	2	58 (52,3-60,8)	59,5 (56-64)	63 (58,5-69)	0,0002 ^{&}
		#P=0,6201	#P=0,8084	#P=0,4641	
A_{20} , мм, (55-70)	1	61 (57,3-64)	64 (61-68,5)	65 (62,3-73,3)	0,0029 ^{*,**}
	2	63 (58-65)	65 (62-69)	69 (65-73,8)	<0,0001 ^{&}
		#P=0,3929	#P=0,3915	#P=0,3951	
MCF, мм, (50-71)	1	60 (58-64,8)	64 (61-69)	65 (63,7-71,5)	0,0023 ^{*,**}
	2	63 (58-73)	65 (62-69)	69 (64,8-74)	<0,0001 ^{&}
		#P=0,4856	#P=0,2896	#P=0,3227	
TPI, у.е., (39-143)	1	65,5 (47-85)	87 (63,5-136)	128,5 (80-172,5)	0,0005 ^{*,**}
	2	73 (52,3-97,5)	93 (73,5-113,5)	106,5 (102-126,5)	<0,0001 ^{&}

Показатель, ед.изм, РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
		#P=0,4386	#P=0,4443	#P=0,3947	
ML, %, (< 15)	1	7 (5:10)	7 (4,5:12)	7 (1,8:11,3)	0,8655
	2	6 (4:8,8)	4,5 (2:8)	3 (0:4,8)	0,0235*,**
		#P=0,3325	#P=0,0013	#P=0,0290	

Примечание: Me (Q25-Q75); #сравнение динамики показателей в каждой группе между 1 и 2 точками (критерий Уилкоксона); - значение p при межгрупповом сравнении (тест Краскела-Уоллиса) отличие: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп, *** - 2 и 3, & всех групп

При межгрупповом сравнении по данным теста FIBTEM, во время заболевания отмечалось повышение плотности сгустка (A₁₀, A₂₀, MCF) у пациентов в группах 2 и 3, а в периоде реконвалесценции параметры сгустка зависели от степени тяжести COVID-19, кроме того в группе 3 сохранялись высокие показатели плотности сгустка (выше РИ). Показатель ML в точке 1 был повышен у пациентов в группах 2 и 3; при этом в точке 2 и в динамике не различался (Таблица 3.9).

Таблица 3.9

Параметры теста FIBTEM у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Показатель, ед.изм, РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
A ₁₀ , мм, (8-23)	1	17 (14,3-22)	23,5 (17-33)	28 (19-35,3)	0,0004*,**
	2	17 (13-20)	21 (17-27)	27 (22,3-34,3)	<0,0001&
		#P=0,2869	#P=0,1647	#P=0,9056	
A ₂₀ , мм, (9-25)	1	18 (15-23)	25,5 (18-35)	29 (20-37,3)	0,0002*,**
	2	17 (14-21)	23 (19-30)	28 (23,5-35,8)	<0,0001&
		#P=0,3048	#P=0,0279	#P=0,8744	
MCF, мм, (10-25)	1	18 (15,3-23,7)	26 (18,5-35,5)	29 (20-37,5)	0,0001*,**
	2	17 (14-21)	24 (18-30)	28,1 (24,5-36)	<0,0001&
		#P=0,2865	#P=0,0186	#P=0,8588	
ML, %, < 9	1	0 (0-1)	1 (0-4,5)	1 (0-3,3)	0,0232*,**
	2	0 (0-1)	0 (0-3)	0 (0-2,3)	0,3781
		#P=0,7827	#P=0,2770	#P=0,1015	

Примечание: курсивом выделены значения, превышающие РИ; Me (Q25-Q75); #сравнение динамики показателей в каждой группе между 1 и 2 точками (критерий Уилкоксона); - значение p при межгрупповом сравнении (тест Краскела-Уоллиса) отличие: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп, *** - 2 и 3, & всех групп

По результатам ротационной тромбоэластометрии в период заболевания в группах 2 и 3 по сравнению с группой 1 выявлено увеличение угла- α EXTEM, INTEM, что свидетельствовало о высоком уровне тромбина, в результате чего активировались тромбоциты (увеличение скорости полимеризации фибрина (CFT EXTEM, INTEM) и увеличивалась плотность сгустка (MCF EXTEM, INTEM). Индекс TPI_{EXTEM, INTEM}, характеризующий суммарный вклад форменных элементов крови и плазменных факторов, превышал РИ и демонстрировал тромботическую готовность системы свёртывания у пациентов группы 2 и 3 в период заболевания и зависел от степени тяжести перенесённой инфекции в периоде реконвалесценции. Кроме того, у пациентов 3 группы в периоде реконвалесценции сохранялась высокая функциональная активность фибриногена (A_{10} , A_{20} , MCF FIBTEM). Следует отметить, что реагенты ROTEM EXTEM и FIBTEM содержат полибрен, который нейтрализует гепарин, присутствующий в образце, что даёт возможность объективно оценить состояние системы гемостаза пациентов, которым проводится терапия гепарином. Таким образом, методом ротационной тромбоэластометрии у пациентов с COVID-19 выявлены признаки нарушений плазменного и клеточного гемостаза в период заболевания и реконвалесценции.

3.2.3. Параметры теста генерации тромбина у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания

Межгрупповой анализ основных параметров (эндогенный потенциал тромбина (AUC) и максимальная концентрация тромбина (C_{max})) теста генерации тромбина (ТГТ) у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания не показал статистических различий (Рисунок 3.3.), но выявил тенденцию к снижению уровня тромбина у пациентов группы 2 по сравнению с пациентами группы 1, что не согласовалось с результатами исследования плазменного гемостаза и данными тромбоэластометрии (Глава 3 п.3.2.1, п.3.2.2).

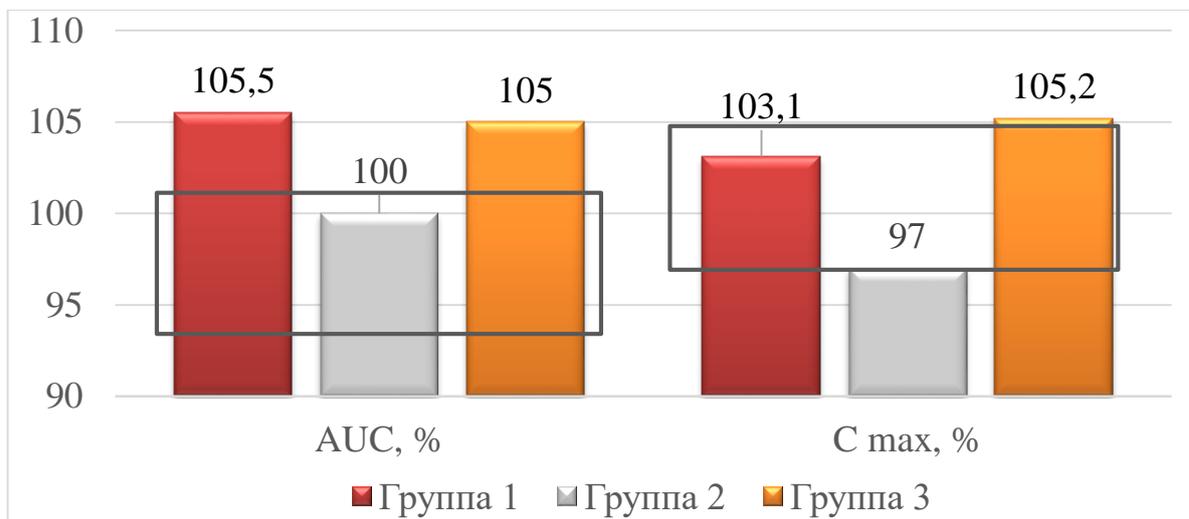


Рисунок 3.3. Параметры теста генерации тромбина у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания

Для выяснения причины данного наблюдения мы детально изучили группу пациентов средней степени тяжести. Поскольку пациенты группы 2 наблюдались в различных условиях (амбулаторно и в стационаре) и проводимая у них терапия отличалась (Глава 2), мы выделили подгруппы: 2А – амбулаторное наблюдение и 2Б – стационарное наблюдение, затем проанализировали коагулометрические показатели плазменного гемостаза. По данным стандартных тестов у пациентов подгруппы 2Б, в отличие от подгруппы 2А, отмечались лабораторные признаки гиперкоагуляции, активации внешнего пути свёртывания и потребления факторов протромбинового комплекса, признаки тромбинемии и повышение маркеров эндотелиального повреждения (Таблица 3.10). Полученные данные свидетельствует о существенном отличии состояния системы гемостаза у пациентов одной, а именно средней степени тяжести, наблюдавшихся в различных условиях.

Параметры плазменного гемостаза у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести, наблюдавшихся в различных условиях

Показатель, ед. изм., РИ	Подгруппа 2А (n=20) Амбулаторно	Подгруппа 2Б (n=45) Стационарно	Р- значение
Фибриноген по Клауссу, г/л (1,7-3,7)	3,15 (2,7-3,6)	4,9 (4,3-5,6)	<0,0001
ПВ, сек. (11,0-16,0)	11,8 (11,6-12,4)	13 (12,9-13,8)	<0,0001
МНО, (0,8-1,2)	1,05 (1,02-1,1)	1,14 (1,1-1,2)	0,0001
Протромбин по Квику, % (77-125)	94,5 (83-97,8)	81 (75-84)	0,0019
D-димер, мкг/л (<450)	326,5 (250,2-442,1)	494 (392,9-663,6)	0,0003
АТ, % (83-125)	97,3 (93-100)	87,4 (79,7-92,7)	0,0036
ПС, % (70-140)	104,2 (98,8-117,1)	92,4 (79,9-102,6)	0,0069
vWF:Ag, % (42-176)	180,5 (136,6-202,5)	307,1 (527,5-377,8)	<0,0001
vWF:RCo, % (48-240)	120,5 (104,5-126,2)	315,5 (233,9-356,9)	<0,0001

Примечание: курсивом выделены значения, превышающие РИ; Me (Q25-Q75); тест Манна-Уитни.

По данным ТГТ площадь под кривой AUC в группах пациентов средней степени тяжести не отличалась, однако максимальная концентрация тромбина (C_{max}) была выше у пациентов подгруппы 2А (Таблица 3.11), наблюдавшихся амбулаторно, у которых не было признаков нарушения гемостаза и все коагулометрические параметры были в пределах РИ, в отличие от пациентов подгруппы 2Б с признаками гиперкоагуляции (Таблица 3.10).

Таблица 3.11

Параметры теста генерации тромбина у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести, наблюдавшихся в различных условиях

Показатель, ед.изм, РИ	Подгруппа 2А (n=20) Амбулаторно	Подгруппа 2Б (n=45) Стационарно	Р- значение
AUC, % (94 - 101)	99,5 (97-104,7)	100 (88-104)	0,3607
C_{max} , % (97 - 105)	105,5 (100,2-107,8)	97 (88-102,2)	0,0042

Примечание: курсивом выделены значения, превышающие РИ; Me (Q25-Q75), U-тест Манна-Уитни

Предположив влияние проводимой антикоагулянтной терапии на показатели ТГТ, мы определили количество пациентов в подгруппах 2А и 2Б, принимающих антикоагулянты, и сравнили анти-Ха активность в образцах крови этих пациентов (Таблица 3.12).

Таблица 3.12

Количество пациентов с COVID-19 средней степени тяжести, принимающих антикоагулянты и наблюдавшихся в различных условиях, и анти-Ха активность у этих пациентов

	Подгруппа 2А (n=20) Амбулаторно	Подгруппа 2Б (n=45) Стационарно	Р-значение
Пациенты, принимающие антикоагулянты	4 (20%)	45 (100%)	0,0006
Анти-Ха активность, (ЕД/мл)	0,00	0,03 (0,01 - 0,26)	<0,0001

Примечание: абс (%); Ме (Q25-Q75), U-тест Манна-Уитни

В образцах крови пациентов, принимающих антикоагулянты выявлена отрицательная корреляционная связь средней силы $r = -0,57$ ($P=0,0022$) и $r = -0,59$ ($P=0,0015$) между параметрами ТГТ (C_{max} и AUC) и анти-Ха активностью соответственно (Рисунок 3.4.).

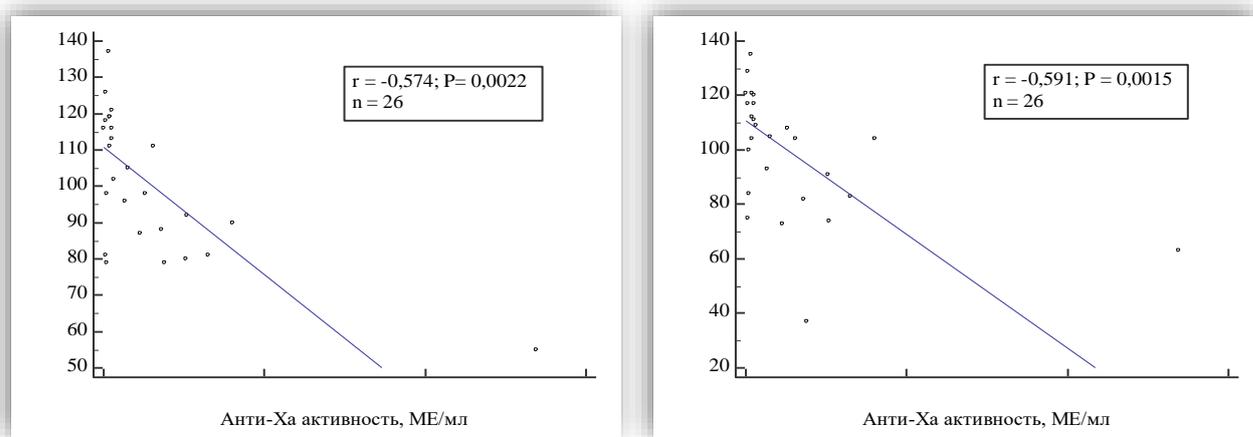


Рисунок 3.4. Корреляция параметров теста генерации тромбина и анти-Ха активности у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести

Поскольку параметры ТГТ демонстрировали зависимость от анти-Ха активности в образце крови, для определения уровня тромбинемии мы исключили из анализа пациентов со значениями анти-Ха активности более 0,06 МЕ/мл и повторно сравнили параметры ТГТ у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести, учитывая условия наблюдения пациентов. У пациентов с COVID-19 тяжёлой степени (группа 3) оба параметра ТГТ (C_{\max} и AUC) превышали РИ, а у пациентов с COVID-19 лёгкой степени (группа 1) – только параметр AUC, при этом статистически значимой разницы параметров ТГТ между группами 1 и 3 не выявлено (Рисунок 3.5.).

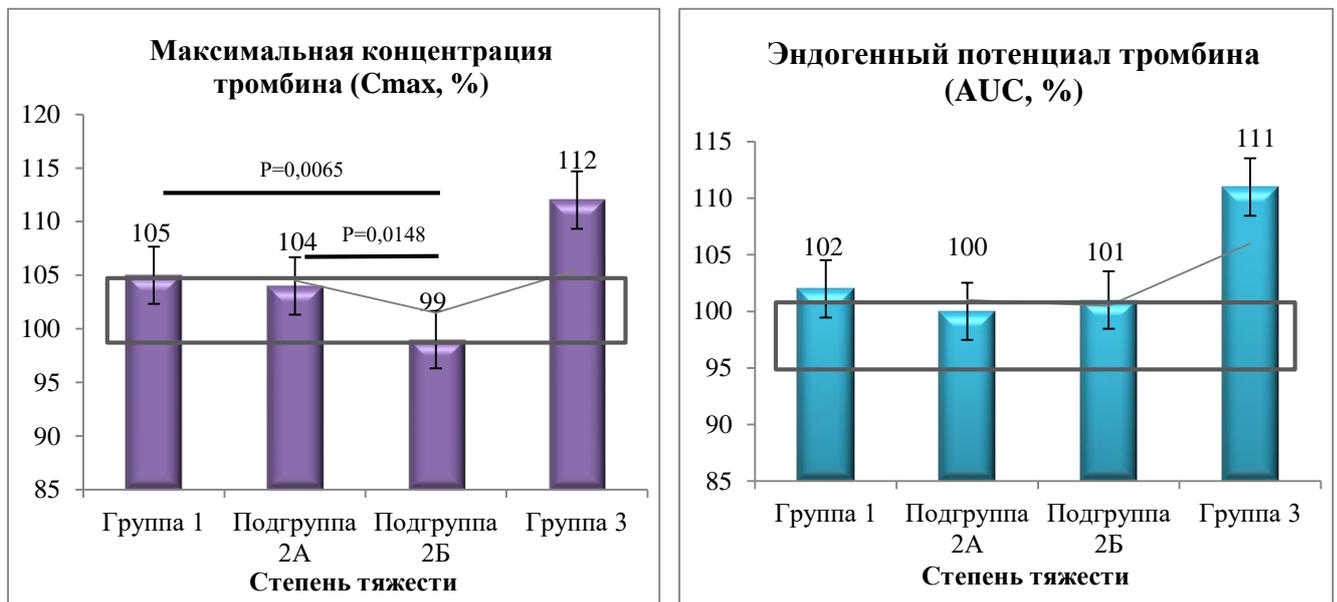


Рисунок 3.5. Параметры теста генерации тромбина в плазме пациентов с COVID-19 различной степени тяжести и уровнем анти-Ха активности менее 0,06 ЕД/мл

У пациентов средней степени тяжести, наблюдавшихся в стационаре (подгруппа 2Б) концентрация тромбина (C_{\max}) была ниже, чем в подгруппе 2А ($P=0,0148$), вероятно, ввиду проводимой антикоагулянтной терапии. В стационаре (группа 2Б) все пациенты принимали гепарин, и он полностью нейтрализовал избыток тромбина, наличие которого характерно для состояния гиперкоагуляции, а из пациентов (группа 2А), наблюдавшихся амбулаторно, только 4 (20%) испытуемых принимали антикоагулянты. У пациентов группы 3 оба параметра ТГТ превышали РИ, несмотря на антикоагулянтную терапию, которую получали все

пациенты этой группы, следовательно, ингибирование тромбина происходило не полностью (Рисунок 3.5.).

3.3. Оценка эндотелиальной дисфункции у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

3.3.1. Определение антигена и активности ADAMTS-13

В начале заболевания (точка 1) уровень ADAMTS-13:Ag (антиген) имел тенденцию к снижению у пациентов с COVID-19 тяжёлой степени, но статистически значимых различий выявлено не было. При этом наблюдалось достоверное снижение данного показателя в динамике между измерениями в двух точках ($P = 0,0002$). Активность ADAMTS-13:Act (точка 1) в группах 2 и 3 была ниже, чем в группе 1. В динамике достоверного снижения активности ADAMTS-13:Act в точке 2 в группах не происходило. (Таблица 3.16).

Таблица 3.13

Содержание антигена и активность ADAMTS-13 в крови у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести

Показатель, ед.изм, РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
ADAMTS-13:Ag, мЕД/мл (0,41-1,41)	1	0,83±0,22	0,75±0,26	0,70±0,3	0,1678 0,1584* 0,0662** 0,4461***
	2	0,78±0,22	0,73±0,29	0,46±0,23	<0,0001 0,2952* <0,0001** <0,0001***
		#P=0,4095	#P=0,6458	#P=0,0002	

Показатель, ед.изм, РИ	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
ADAMTS-13:Act, мЕД/мл (0,4-1,3)	1	1,02±0,18	0,89±0,20	0,89±0,23	0,0093 0,0027* 0,0116** 0,9720***
	2	0,95±0,12	0,89±0,15	0,79±0,22	0,0007 0,0391* 0,0005** 0,0228***
		#P=0,0533	#P=0,9541	#P=0,0970	

Примечание: M±Sd, ANOVA; значение P при сравнении показателей в группах: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп, *** - 2 и 3; # сравнение динамики показателей в каждой группе в 1-й и 2-й точке (t-тест для связанных выборок)

У пациентов группы 2 и 3 чаще выявлялось снижение (ниже РИ) уровня антигена ADAMTS-13 в крови, причём, в группе 3 отмечалась отрицательная динамика и в точке 2 частота снижения возросла почти в два раза (Таблица 3.17).

Таблица 3.14

Частота выявления сниженного уровня ADAMTS-13 у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	Р-уровень
1	1 (2,6%)	12 (18,5%)	8 (21,6%)	0,0180*, 0,0110**
2	3 (7,7%)	10 (15,4%)	18 (48,6%)	0,2500*, 0,0001**

Примечание: абс (%), χ^2 -тест; значение P при сравнении частоты: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп

Дисбаланс между уровнем vWF и ADAMTS-13, в том числе снижение уровня и активности ADAMTS-13 при повышенной концентрации vWF создаёт условия, способствующие развитию микротромбоза, вторичной микроангиопатии. Соотношение активности (vWF:RCo/ADAMTS-13:Act) было значимо больше у пациентов группы 2 и 3 как во время заболевания, так и в периоде реконвалесценции; соотношение vWF:Ag/ADAMTS-13:Ag было больше у пациентов группы 2 и 3 в точке 2 (Таблица 3.18, Рисунок 3.6).

Таблица 3.15

Соотношение vWF/ADAMTS-13 у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести

Показатель	Точка	Группа 1 (n = 39)	Группа 2 (n = 65)	Группа 3 (n = 37)	P-уровень
vWF:Ag/ADAMTS-13:Ag	1	2,7±3,2	5,7±9,7	5,6±3,7	0,1429
vWF:RCo/ADAMTS-13:Act		1,5±1,8	3,1±2,1	3,6±2,2	0,0005
vW:Ag/ADAMTS-13:Ag	2	2,2±1,9	6,9±12,3	10,3±9,9	0,0066
vWF:RCo/ADAMTS-13:Act		1,5±1,7	3,5±2,2	4,5±2,0	<0,0001

Примечание: M±Sd; ANOVA; количество антигена и активность vWF представлены в МЕД/мл (%/100)

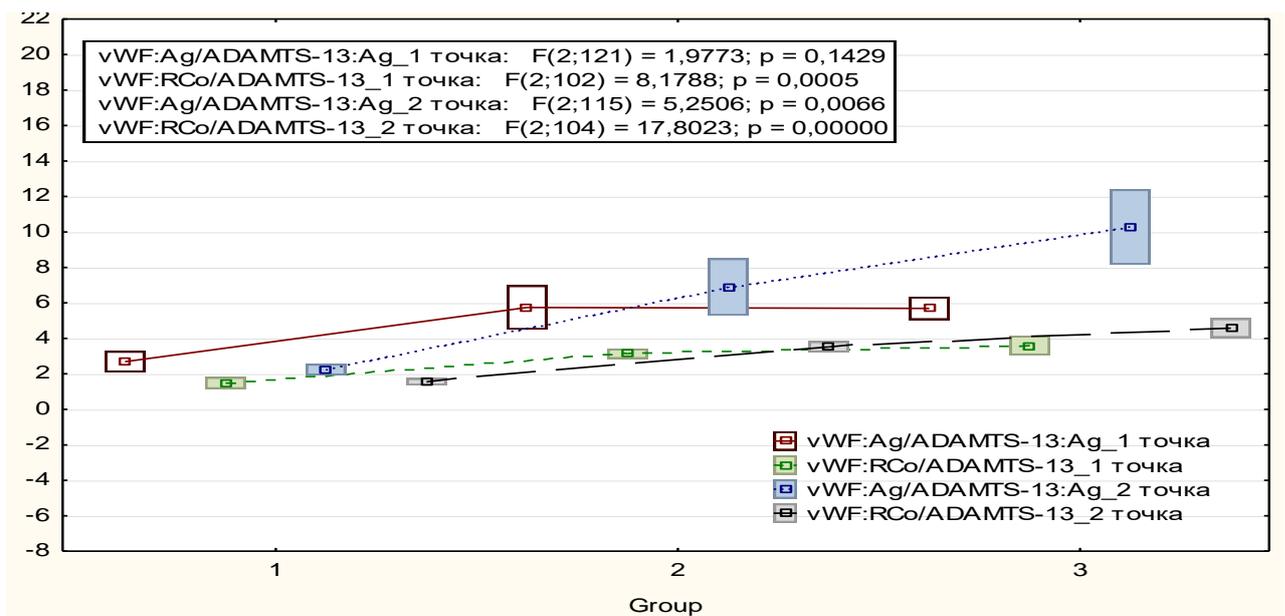


Рисунок 3.6. Динамика соотношения уровня и активности vWF и ADAMTS-13 у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести

С помощью ROC-анализа нами были определены пороговые значения соотношения антигенов (vWF:Ag/ADAMTS-13:Ag) и активностей (vWF:RCo/ADAMTS-13:Act), отличающие пациентов с COVID-19 легкой степени от пациентов с COVID-19 средней и тяжелой степени в период заболевания (Таблица 3.19).

Таблица 3.16

ROC- анализ для определения пороговых значений соотношений vWF:Ag/ADAMTS-13:Ag и vWF:RCo/ADAMTS-13:Act, отличающих пациентов с COVID-19 лёгкой степени от средней и тяжёлой в период заболевания

Показатель	AUC, 95% ДИ	Se,%	Sp, %	Значение критерия	P-уровень
vW:Ag/ADAMTS-13:Ag	0,74 (0,653-0,831)	74,5	70,0	2,45	P=0,033
vWF:RCo/ADAMTS-13:Act	0,83 (0,798-0,886)	73,3	90	1,55	P=0,0021

Примечание: пороговые значения тестов определяли, используя ROC-анализ; чувствительность – Se, специфичность – Sp.

3.3.2. Определение волчаночного антикоагулянта у пациентов с COVID-19

Ввиду методологических особенностей (см. главу «Материалы и методы») наличие волчаночного антикоагулянта (ВА) определялось в образцах плазмы с анти-Ха активностью не более 1 МЕ/мл (n = 102). При первичном обследовании 50 пациентов (49 %) были ВА-позитивны: изолированно тест dRVVT у 46 пациентов (92 %), изолированно тест SCT – у 1 пациента (2 %); одновременно по двум тестам (dRVVT и SCT) – у 1 пациента легкой степени и 2 пациентов тяжелой степени COVID-19. Медиана нормализованного отношения NR (dRVVT) = 1,54 (0,97: 2,1) была максимальной у пациентов с COVID-19 тяжёлой степени (P < 0,0001) (Рисунок 3.5), кроме того, NR (dRVVT) прямо коррелировало со степенью тяжестью инфекционного процесса (r = 0,49 (0,327 - 0,626), P < 0,0001).

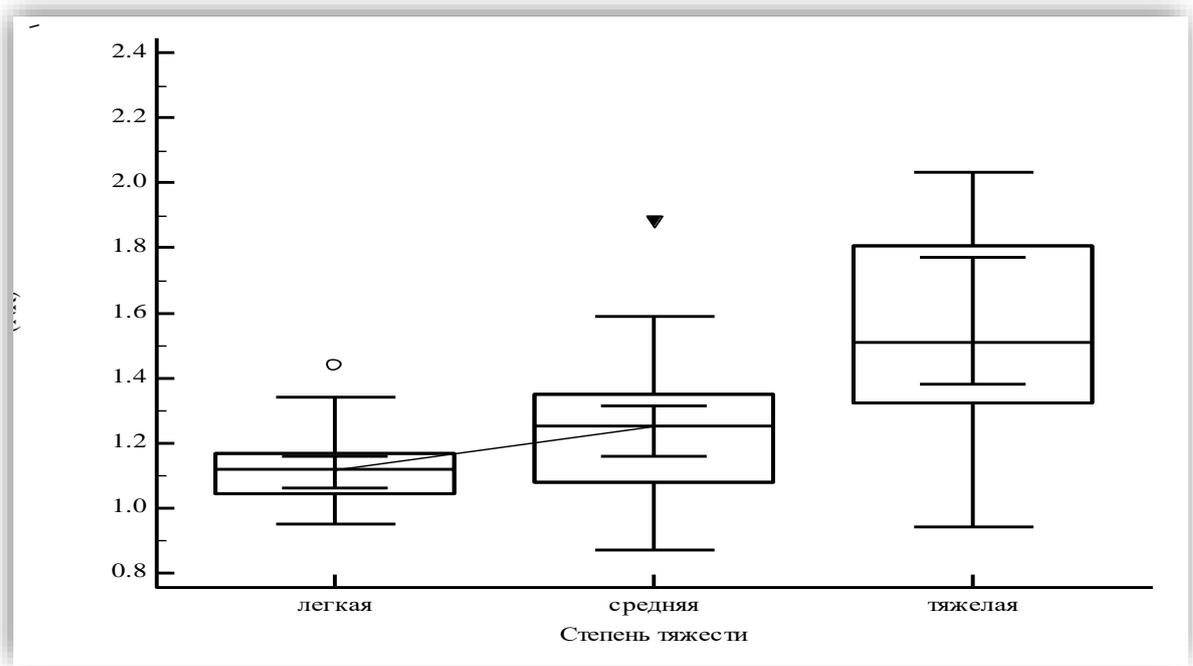


Рисунок 3.7. Эффект ВА в тесте с ядом гадюки Рассела у пациентов с COVID-19 различной степени тяжестью в период заболевания

В период заболевания количество ВА-положительных пациентов зависело от степени тяжести и было больше всего в группе с тяжёлой формой COVID-19. В периоде реконвалесценции количество ВА-положительных пациентов было меньше всего в группе 1, а в группах 2 и 3 не отличалось. (Таблица 3.17).

Таблица 3.17

Количество ВА-положительных пациентов с COVID-19 в группах разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Р-уровень
Точка 1	4 (14,8%) n=27	27 (49,1%) n=55	19 (95%) n=20	0,0177* 0,0001** 0,0248***
Точка 2	2 (8 %) n=25	17 (39,5%) n=43	7 (58,3%) n=12	0,0177* 0,0037** 0,3834***

Примечание: абс (%), χ^2 -тест; значение Р при сравнении частоты: * - 1 и 2 групп, ** - 1 и 3 групп, *** - 2 и 3 групп

Такими образом, в период заболевания во всех группах пациентов с COVID-19 выявлены лабораторные признаки эндотелиопатии: наблюдалась персистенция

волчаночного антикоагулянта, а его нормализованное соотношение (NR) коррелировало со степенью тяжести COVID-19, снижение уровня антигена ADAMTS-13 в группе 3, а в группах средней и тяжёлой степени был выявлен дисбаланс vWF:Ag и ADAMTS-13. В периоде реконвалесценции во всех группах отмечалась персистенция волчаночного антикоагулянта, а у лиц перенёсших тяжёлую форму COVID-19 дисфункция эндотелия прогрессировала, что повышало риск развития ТО.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведённого комплексного лабораторного обследования пациентов с COVID-19 в период заболевания и реконвалесценции выявлены особенности состояния системы гемостаза, соответствующие различной степени тяжести инфекционного процесса. Патогенез нарушений свёртывания крови, связанных с COVID-19, обусловлен большим количеством сложных взаимодействий между секрецией провоспалительных цитокинов/факторов свёртывания, гиперактивацией тромбоцитов и повреждением эндотелиальных клеток [179]. В ходе исследования было установлено, что лабораторные показатели гемостаза у пациентов с COVID-19 лёгкой степени менялись в динамике, но были в пределах РИ, следовательно, резервная ёмкость системы гемостаза при лёгком течении инфекционного процесса достаточна, и персистенция вируса SARS-CoV-2 не вызывает нарушений коагуляции, что согласуется с результатами Bingwen E. F. и соавт. и может быть основанием для отказа от назначения антикоагулянтов пациентам и реконвалесцентам данной группы [180].

Согласно полученным данным, для пациентов с COVID-19 характерно повышение концентрации фибриногена и продуктов его деградации [181, 182, 183, 184, 185]. По нашим данным уровень фибриногена зависел от степени тяжести COVID-19 и был выше у пациентов с тяжёлой формой инфекционного процесса как во время заболевания, так и в периоде реконвалесценции. Гиперфибриногемия, наблюдаемая у пациентов с COVID-19, является одной из причин гиперкоагуляции, которая отражает степень воспалительного ответа и коррелирует со степенью тяжести в период заболевания [211], а по нашим данным и в период реконвалесценции. Структурные параметры тробоэластометрии (A_{10} , A_{20} , MCF), характеризующие размер и плотность сгустка, также отражали высокую степень гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19 группы 2 и 3, что согласуется с результатами Kong и соавт. [99, 186]. По данным исследований, проведённых до пандемии COVID-19, $A_{10 \text{ EXTEN, INTEM}} > 61,5$ мм и/или $MCF_{\text{EXTEN, INTEM}} > 68$ мм, являются критериями гиперкоагуляции и активации тромбоцитов и обладают

прогностическим значением относительно развития тромбоза [187]. Кроме того, нами показано, что в период заболевания в группах 2 и 3 медиана $МСF_{FIBTEM}$ превышала 25 мм, по данным Zanetto A., эти изменения ассоциированы с пятикратным увеличением риска развития тромбоза [145]. Однако в нашем исследовании данное состояние гемостаза не стало причиной развития тромбоза. Важно отметить, положительную динамику снижения уровня фибриногена к периоду реконвалесценции, но функциональная активность фибриногена у пациентов с COVID-19 тяжёлой степени в динамике не снижалась. Индекс TPI, характеризующий суммарный вклад форменных элементов крови и плазменных факторов свёртывания в прочность и стабильность сгустка, в тестах EXTEM и INTEM демонстрировал тромботическую готовность системы свёртывания у пациентов группы 2 и 3 во время заболевания и зависел от степени тяжести перенесённой инфекции в периоде реконвалесценции, что свидетельствовало о декомпенсации коагуляции [31]. Персистенция SARS-CoV-2 может вызывать динамичное изменение состояния системы гемостаза из-за повышения уровня провоспалительных белков и гиперкоагуляции, результатом чего является отложение фибрина в сосудах лёгких и тканей [188], до гипокоагуляции ввиду длительной активации и чрезмерного потребления факторов свёртывания [101], поэтому уровень фибриногена является весьма переменным параметром. По литературным данным, прогрессирующее снижение уровня фибриногена в значительной степени ассоциировано с высокой летальностью (29% случаев) [181]. В нашем исследовании не было пациентов с гипофибриногемией (менее 1 г/л). Таким образом, концентрация фибриногена увеличивалась прямо пропорционально степени тяжести COVID-19, возрастал не только уровень, но и функциональная активность фибриногена. Кроме того, нами показано, что прокоагулянтный фенотип гемостаза сохранялся после выздоровления, у пациентов, перенёсших заболевание в тяжёлой форме и средней степени тяжести, что определяет необходимость мониторинга состояния системы гемостаза в период реконвалесценции у таких пациентов для определения тактики лечения.

Нами подтверждена связь параметров (ПВ, МНО, протромбин по Квику) протромбинового комплекса со степенью тяжести инфекционного процесса, что согласуется с полученными ранее данными [189]. Тенденция к пролонгированию ПВ и МНО с нарастанием тяжести заболевания обусловлена истощением факторов протромбинового комплекса (ф. II, ф. VII, ф. IX, ф. X) за счёт активации коагуляции ввиду повышения экспрессии тканевого фактора на моноцитах, макрофагах и эндотелиальных клетках [5]. С помощью тромбоэластометрии также обнаружен дефицит факторов протромбинового комплекса (пролонгирование ST_{EXTEM}) [190]. SARS-CoV-2 может вызывать повышенное преобразование фактора XII в его активную форму (ф. XIIa). Это первый этап контактно-кининового пути, ведущий к синхронной активации внутреннего каскада свёртывания крови и плазменной калликреин-кининовой системы, что приводит к потреблению факторов контактного (внутреннего) пути и пролонгированию АЧТВ [50].

Гиперкоагуляция способствовала активации фибринолиза, вызывая повышение D-димера, который является маркёром активации внутрисосудистого свёртывания даже у пациентов с COVID-19 лёгкой и средней степени тяжести [191]. Известно, что высокий уровень D-димера служит предиктором неблагоприятного исхода заболевания [192, 193, 194]. Полученные нами данные свидетельствуют о выявлении высокой концентрации D-димера среди пациентов с COVID-19 тяжёлой степени, однако максимальное значение (297 700 мкг/л) было обнаружено у пациента средней степени тяжести (группа 2). При этом следует отметить широкий диапазон значений данного параметра в пределах одной группы, что обусловлено индивидуальными особенностями состояния эндотелия до инфицирования SARS-CoV-2 и устойчивостью к повреждению. Стойкое повышение концентрации D-димера в периоде реконвалесценции является косвенным признаком сохраняющейся дисфункции эндотелия, обусловленной избыточным образованием тромбина в периоде заболевания [191].

Все больше исследователей полагают, что патогенез COVID-19 включает нарушение состояния микрососудистого русла [217, 243]. Повышение уровня эндотелиальных маркеров (CD31, ICAM-1, VCAM-1, E-селектин, P-селектин, vWF)

в ткани лёгкого и в крови подтверждают наличие эндотелиопатии на локальном и системном уровне при COVID-19 [13]. По нашим данным, во время заболевания повышение фактора Виллебранда ассоциировалось со степенью тяжести COVID-19, кроме того, его уровень имел прогностическое значение [89, 196, 197]. В периоде реконвалесценции уровень vWF отражал сохраняющуюся дисфункцию эндотелия у пациентов, перенёвших заболевание в средней степени тяжести и тяжёлой форме. В динамике (сравнение между точкой 1 и 2) достоверное снижение vWF наблюдалось в группе с лёгкой формой COVID-19, а в группе пациентов, перенёвших инфекцию в тяжёлой форме, vWF в точке 2 повышался. Эндотелиальная дисфункция представляет важнейший механизм в патофизиологии COVID-19, поэтому пациенты пожилого возраста с заболеваниями в анамнезе, ассоциированными с эндотелиитом (сердечно-сосудистые заболевания и/или факторы сердечно-сосудистого риска, включая ожирение, сахарный диабет, гипертонию), имеют высокий риск летального исхода при COVID-19 [45, 198]. По нашим данным, во всех группах пациентов, даже при лёгкой форме инфекции, наблюдалась персистенция ВА. Вирус SARS-CoV-2 и провоспалительные цитокины, являясь причиной ремоделирования плазматической мембраны (экзоцитоз мембранных микрочастиц и экспозиция фосфолипидов, которые обычно скрыты от иммунных клеток), индуцируют образование ВА в результате повреждения и массовой гибели клеток эндотелия [199]. Хотя связь между инфекционными заболеваниями и индукцией аутоантител давно известна [200], мы обнаружили, что ВА ассоциированы со степенью тяжести инфекционного процесса при COVID-19, кроме того, эффект присутствия ВА наблюдался у пациентов в периоде реконвалесценции. Персистенцию ВА во время заболевания можно расценивать, как маркёр повреждения (апоптоза) эндотелия, а в периоде реконвалесценции, как признак структурной дисфункции. В повреждённом эндотелии наблюдается окислительный стресс, нарушение регуляции коагуляции и лейкоцитарная инфильтрация. Все эти механизмы приводят к усилению кальцификации (осаждению фосфата кальция) и ригидности сосудов. Поскольку влияние вируса на клетки эндотелия до конца не изучено, существует

необходимость в исследованиях, определяющих его долгосрочное влияние на здоровье сосудов [201].

Повреждение и активация эндотелия, экзоцитоз содержимого гранул активированных тромбоцитов при COVID-19 способствуют повышению уровня, циркулирующего vWF. При этом для пациентов с COVID-19 характерно снижение антигена и активности металлопротеиназы ADAMTS-13, наиболее выраженное при тяжёлой форме заболевания, которое способствует дополнительному увеличению количества vWF и его активности. Дисбаланс между vWF и ADAMTS-13 отражается в повышении значения соотношения vWF:RC₀/ADAMTS-13:Act, которое было значимо выше у пациентов группы 2 и 3 как в периоде заболевания, так и в периоде реконвалесценции. Мы установили пороговое значение vWF:RC₀/ADAMTS-13:Act, отличающее пациентов с COVID-19 лёгкой степени от пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени, которое в обеих точках исследования составило 1,55. Дисбаланс между vWF и ADAMTS-13, может создавать условия, способствующие развитию микротромбоза, в артериолах и капиллярах с последующим развитием ишемии, как у пациентов, так и у реконвалесцентов [19, 68].

Пациенты с COVID-19 имеют высокий риск тромботических осложнений, однако у некоторых пациентов наблюдались кровотечения [202]. Понимание баланса между коагуляцией и фибринолизом поможет определить оптимальные подходы к профилактике тромбозов и потенциальную пользу фибринолитической терапии. Активность фибринолиза за счёт повышения PAI сильно ослабляется при различных патологических состояниях, включая травмы и сепсис [97]. Повышение PAI-1 снижает активность плазмина и, следовательно, фибринолиза [203], в частности в межальвеолярном пространстве, что способствует отложению фибрина в лёгких [17, 204]. Тем не менее во время заболевания у пациентов группы 2 и 3 отмечалась компенсаторная активация фибринолиза (увеличение ML_{ФИБТЕМ}) на фоне выраженной гиперкоагуляции. Динамичное изменение системы фибринолиза является ещё одной особенностью, COVID-ассоциированной коагулопатии. Существуют данные о высокой частоте остановки фибринолиза, которая

коррелировала с тромботическими событиями и почечной недостаточностью при COVID-19 тяжёлой степени [100, 205]. По нашим данным, снижение лизиса сгустка ($ML_{\text{EXTEM}} < 3,5 \%$) выявлено у 6 (0,9%) пациентов с COVID-19 средней и 2 (5,4%) пациентов тяжёлой степени. По литературным данным, наилучшая прогностическая ценность относительно развития ТЭО обеспечивалась комбинацией повышенного уровня D-димера ($>2,6$ мкг/мл) и остановкой фибринолиза ($ML_{\text{EXTEM}} = 0 \%$), в таком случае частота венозной тромбоэмболии составляла 50% [206]. Среди пациентов, включённых в наше исследование, с лабораторными признаками остановки фибринолиза у 4-х уровень D-димера превышал 2,6 мкг/мл, следовательно, эти пациенты составляли группу высокого риска ТЭО и развития полиорганной недостаточности. В периоде реконвалесценции у 1-го пациента, перенёвшего COVID-19 в тяжёлой форме, по совокупности параметров ML_{EXTEM} и D-димера был выявлен высокий риск ТЭО. Фибринолиз – сложный процесс с множеством механизмов регуляции, который имеет достаточно большой резерв устойчивости к нарушениям коагуляции. Так, по всей видимости, на начальном этапе развития гиперкоагуляции, соответствующей лёгкой и средней степени тяжести, включается механизм активации фибринолиза, лабораторным признаком которого является повышение D-димера в крови, увеличение ML_{FIBTEM} . В случаях прогрессирования заболевания (тяжёлая степень) в результате массивной и длительной стимуляции активации происходит истощение белковых субстратов и дисбаланс в системе ингибитор-активатор (РАI-t-РА), что ведёт к остановке фибринолиза.

Приобретенная тромбофилия, в частности, снижение средней активности естественных антикоагулянтов, включая ПС и АТ, характерна для COVID-ассоциированной коагулопатии [65, 117]. Глубокое прокоагуляционное состояние приводило к потреблению и снижению уровня АТ, в результате чего развивалась резистентность к лечению гепарином, что увеличивало смертность [207]. По нашим данным у пациентов не было дефицита АТ и ПС. Минимальная активность АТ в начале заболевания была в группе 2, но в периоде реконвалесценции отличий между группами не было. Активность протеина С в точке 1 была снижена у

пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени, по сравнению с пациентами лёгкой степени, но в динамике в обеих группах происходила нормализация уровня ПС. Снижение естественных антикоагулянтов считается диагностическим критерием неявного ДВС, согласно определению Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH) [13]. В отличие от пациентов с ДВС-синдромом и сепсисом, для которых показана корреляция между снижением антитромбина и тяжестью заболевания, мы такую связь не подтвердили, несмотря на то что снижение активности естественных антикоагулянтов отмечается раньше, чем явный ДВС-синдром [65].

Известно что, особенностью САС является высокий уровень тромбина, о чем свидетельствует повышенный уровень комплекса тромбин-антитромбин [208]. Ввиду того, что у пациентов с COVID-19 наблюдался дисбаланс в системе прокоагулянты-антикоагулянты: гиперкоагуляция на фоне снижении уровня антикоагулянтов, а ключевым фактором, определяющим риск развития ТО, является тромбинемия, для оценки протромбогенного потенциала мы использовали тест генерации тромбина. Поскольку параметры ТГТ зависят от уровня гепарина в крови, а в нашем исследовании не регламентировалось время взятия крови относительно введения антикоагулянта, мы исключили из анализа образцы с анти-Ха активностью более 0,06 ЕД/мл. Таким образом мы получили значения параметров ТГТ, подтверждающие наиболее высокий уровень тромбина у пациентов с COVID-19 тяжёлой степени. Иммуный ответ, дисфункция эндотелиальных клеток, тромбоцитов и активация комплемента приводят к усилению генерации тромбина как путём контактной активации, так и через тканевой фактор. О. Cohen и соав. обнаружили корреляцию между ЕТР и показателем SIC и предложили ТГТ как инструмент для выявления пациентов с риском развития COVID-19 – ассоциированной коагулопатии [209].

Эндогенный потенциал тромбина был повышен у пациентов лёгкой степени, ввиду того, что антикоагулянтная терапия не проводилась, а у пациентов тяжёлой степени ввиду избыточного образования тромбина, обусловленного тяжестью COVID-19. Параметры ТГТ у госпитализированных пациентов с COVID-19 схожи

со значениями, полученными у здоровых людей, несмотря на антикоагулянтную терапию, что указывает на состояние гиперкоагуляции [209]. Параметры ТГТ коррелировали с анти-Ха активностью и демонстрировали зависимость от проводимой антикоагулянтной терапии, учитывая индивидуальный прокоагулянтный фенотип системы гемостаза у пациентов средней степени тяжести. Следовательно, назначение антикоагулянтной терапии у пациентов средней степени тяжести позволило ингибировать избыток тромбина, образующегося под воздействием вируса SARS-CoV-2 до нормального уровня, при этом у пациентов тяжёлой степени такого снижения достичь не удалось. Несмотря на убедительное патофизиологическое обоснование, имеющих в литературе данных недостаточно, чтобы рекомендовать высокие дозы антикоагулянтов при COVID-19. Однако, антикоагулянтная терапия, даже в амбулаторных условиях в период заболевания, может улучшить клиническое течение [210].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

COVID-19 сопровождается коагулопатией и тромботическими осложнениями. САС имеет специфические характеристики и отличается от наблюдаемой при бактериальном сепсисе и ДВС. Особенностью САС является прокоагулянтный фенотип системы гемостаза, который способствует развитию микро- и макротромбозов, дыхательной недостаточности, ОРДС и летальному исходу.

Лабораторные параметры гемостаза при COVID-19 зависят от степени тяжести и демонстрируют повышенные уровни D-димера, vWF, фибриногена, умеренное увеличение протромбинового времени. У пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени методом тромбоэластометрии выявляется гиперкоагуляция с активацией тромбоцитов и повышением функциональной активности фибриногена, обусловленной высоким уровнем тромбина. Функциональная активность системы фибринолиза во время заболевания стимулируется активацией коагуляции и повышается, но в некоторых клинических

случаях происходит остановка фибринолиза, что, безусловно, является прогностическим фактором развития ТО, полиорганной недостаточности и летального исхода. Параметры ТГТ позволяют оценить эффективность проводимой антикоагулянтной терапии с учётом индивидуальных особенностей COVID-19-ассоциированной коагулопатии. Вероятно, антикоагулянтная терапия, в том числе у амбулаторных пациентов в период заболевания, может улучшить клиническое течение. Период реконвалесценции характеризуется субклиническими последствиями инфекционного заболевания, эндотелиальной дисфункцией и прокоагулянтным фенотипом системы гемостаза, что определяет необходимость мониторинга системы гемостаза у лиц после перенесённого COVID-19 в тяжёлой форме.

Схема лабораторного исследования параметров системы гемостаза у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести в период заболевания и реконвалесценции

После анализа полученных в ходе исследования данных мы усовершенствовали схему лабораторного исследования параметров системы гемостаза у пациентов с COVID-19 и реконвалесцентов, включив в неё параметры как стандартных тестов гемостаза, так и интегральных методов, а также маркеров эндотелиальной дисфункции. Использование в клинической практике данной схемы позволит комплексно оценить состояние системы гемостаза у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести как в период заболевания, так и в период реконвалесценции и будет способствовать выявлению пациентов высокого риска ТО, а при выписке из стационара будет использоваться для решения тактики наблюдения и терапии у реконвалесцентов.

Схема исследования параметров системы гемостаза у пациентов с COVID-19 в период заболевания и реконвалесценции

	Лёгкая и средняя степень тяжести (амбулаторно)	Средняя степень тяжести (стационарно)	Тяжёлая степень
Пациенты с COVID-19	<p><i>Плазменный гемостаз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Фибриноген** • D-димер** <p>** 3-х кратное повышение</p>	<p><i>Плазменный гемостаз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Фибриноген • ПВ (МНО, протромбин) • D-димер • vWF:Ag <p><i>Тромбоцитарный гемостаз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • A10_{ФВТЕМ}, MCF_{ФВТЕМ} • TPI_{EXТЕМ} <p><i>Эндотелиальная функция</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • vWF: RCo /ADAMTS-13:Act 	<p><i>Плазменный гемостаз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Фибриноген • ПВ (МНО, протромбин) • D-димер • vWF:Ag <p><i>Тромбоцитарный гемостаз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • A10_{ФВТЕМ}, MCF_{ФВТЕМ} • TPI_{EXТЕМ} <p><i>Эндотелиальная функция</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • vWF: RCo /ADAMTS-13:Act <p><i>Эффект антикоагулянтной терапии</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Cmax
Реконвалесценты после COVID-19	Лабораторный контроль не требуется	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Плазменный гемостаз</i> • D-димер • vWF:Ag • CT_{EXТЕМ} • <i>Тромбоцитарный гемостаз</i> • Угол α EXТЕМ, TPI_{EXТЕМ} 	<p><i>Плазменный гемостаз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Фибриноген • ПВ (МНО, протромбин) • D-димер • vWF:Ag <p><i>Тромбоцитарный гемостаз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • A10, 20_{ФВТЕМ}, MCF_{ФВТЕМ} • TPI_{EXТЕМ} <p><i>Фибринолиз</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • ML_{EXТЕМ} <p><i>Эндотелиальная функция</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • vWF: RCo /ADAMTS-13:Act
Лабораторный контроль при выписке из стационара для решения тактики наблюдения и терапии			

Примечание: жирным шрифтом выделены параметры лабораторного обследования в соответствии с временными методическими рекомендациями Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Версия 9 [174].

ВЫВОДЫ

1. Повышение концентрации и функциональной активности фибриногена, отражали гиперкоагуляцию, которая коррелировала со степенью тяжести COVID-19; у всех пациентов в период реконвалесценции наблюдалось снижение концентрации фибриногена относительно исходного уровня, при этом его функциональная активность у пациентов, перенёсших COVID-19 в тяжёлой форме оставалась высокой.

2. В период заболевания состояние гемостаза характеризовалось активацией коагуляции с потреблением факторов внешнего пути свёртывания (продолгование ПВ, ST_{EXTEM}) и повышением фибринолитической активности (ML_{FIBTEM}), которая способствовала увеличению уровня D-димера у пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени.

3. Показатель прочности сгустка $MC_{F_{EXTEM}}$ и уровень фибриногена коррелировали во всех (1, 2 и 3) группах: $r = 0,52$, $r = 0,51$, $r = 0,61$, соответственно; однако зависимость прочности сгустка $MC_{F_{EXTEM}}$ от количества тромбоцитов у пациентов в группах различалась: $r = 0,24$, $r = 0,48$, $r = 0,75$, увеличиваясь соответственно степени тяжести COVID-19, несмотря на отсутствие различий в количестве тромбоцитов.

4. Кинетика образования сгустка, характеризующаяся сокращением времени (CFT_{EXTEM}), в группах пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени указывала на повышенное образование тромбина, функциональную активность тромбоцитов, а также ускоренную полимеризацию фибрина как в период заболевания, так и в период реконвалесценции. Индекс тромботического потенциала (TP_{EXTEM}) был больше у пациентов с COVID-19 тяжёлой степени во время заболевания и в периоде реконвалесценции.

5. Состояние системы гемостаза у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести, наблюдавшихся в разных условиях (амбулаторно или стационарно), существенно отличалось, что свидетельствовало об особенностях COVID-ассоциированной коагулопатии у пациентов с одинаковой, а именно

средней степенью тяжести. Стационарные пациенты (подгруппа 2Б) имели признаки гиперкоагуляции, дефицита факторов протромбинового комплекса и повышение маркеров эндотелиального повреждения в отличие от амбулаторных пациентов (подгруппа 2А).

6. Максимальная концентрация тромбина (C_{max}) была больше у пациентов с COVID-19 лёгкой степени ввиду отсутствия антикоагулянтной терапии, а также у пациентов с COVID-19 тяжёлой степени ввиду резистентности к проводимой антикоагулянтной терапии.

7. У пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени в период заболевания и реконвалесценции отмечались признаки дисфункции и нарушения тромборезистентности эндотелия сосудов, о чем свидетельствовало увеличение уровня vWF, снижение металлопротеиназы ADAMTS-13 в плазме крови и, соответственно, повышение соотношения vWF:RCo/ADAMTS-13:Act.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведённого исследования позволили сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики и других специальностей.

1. Параметры тромбозластометрии (CFT, MCF и TPI) могут использоваться для оценки системы гемостаза у пациентов с COVID-19 и реконвалесцентов, получающих антикоагулянтную терапию.

2. Для определения эндогенного потенциала тромбина с помощью теста генерации тромбина (ТГТ) предварительно необходимо определить антиХа-активность в образце крови, поскольку параметры теста (C_{max} и AUC) зависят от концентрации гепарина.

3. Значения соотношения vWF:Ag/ADAMTS-13:Ag и vWF:RCo/ADAMTS-13 могут использоваться для оценки степени тяжести COVID-19.

Пороговое значение соотношения $vW:Ag/ADAMTS-13:Ag$ составило 2,45, $vWF:RCo/ADAMTS-13$ – 1,55.

4. Предложена схема исследования системы гемостаза у пациентов с COVID-19 и реконвалесцентов, включающая параметры стандартных и интегральных методов, а также маркеров эндотелиальной дисфункции, которая может использоваться при синдромальной диагностике нарушений системы свёртывания крови при инфекционно-воспалительных заболеваниях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. – URL: <https://covid19.who.int/> (дата обращения: 07.09.2023).
2. Perico L. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19 / L. Perico, A. Benigni, F. Casiraghi et al. // Nature Reviews. Nephrology. – 2021. – № 17. – P. 46-64.
3. Lu R. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. / R. Lu, X. Zhao, J. Li et al. // Lancet (London, England). – 2020. – №22. – P. 565-574.
4. Choi W.-Y. Mortality Rate of Patients with COVID-19 Based on Underlying Health Conditions / W.-Y. Choi // Disaster Medicine and Public Health Preparedness. – 2021. № 3. – P. 1-16.
5. Hadjadj J. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients / J. Hadjadj, N. Yatim, L. Barnabei et al.. // Science (New York). – 2020. – № 369. – P. 718-724.
6. Ranucci M. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. / M. Ranucci, A. Ballotta, U. Di Dedda et al. // Journal of thrombosis and haemostasis : JTH. – 2020. №7 – P.1747-1751.
7. Reddy R. Circulating angiotensin peptides levels in Acute Respiratory Distress Syndrome correlate with clinical outcomes: A pilot study / R. Reddy, I. Asante, S. Liu et al. // PloS one. – 2019. – №. 14. – P. e0213096.
8. Ziegler C. G. K. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues / C. G. K. Ziegler, S. J. Allon, S. K. Nyquist et al. // Cell. – 2020. – № 5. – P. e1016-1035.e19.

9. Hamming I. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis / I. Hamming, W. Timens, M. L. C. Bulthuis et al. // *Journal of Pathology*. –2004. – № 2. – P. 631-637.
10. Kwaan, H. C. The Central Role of Fibrinolytic Response in COVID-19-A Hematologist's Perspective / H. C. Kwaan, P. F. Lindholm. // *International journal of molecular sciences*. – 2021. –№ 3. – P. 1-16.
11. Sayyadi M. Status of major hemostatic components in the setting of COVID-19: the effect on endothelium, platelets, coagulation factors, fibrinolytic system, and complement / M. Sayyadi, S. Hassani, M. Shams, A. Dorgalaleh. // *Annals of hematology*. – 2023. – № 102. – P. 1307-1322.
12. Ranucci M. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome / M. Ranucci, A. Ballotta, U. Di Dedda et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. –№ 7. – P. 1747-1751.
13. Birnhuber A. Between inflammation and thrombosis: endothelial cells in COVID-19 / A. Birnhuber, E. Fließer, G. Gorkiewicz et al. // *The European Respiratory Journal*. – 2021. – № 3 – P. e2100377.
14. Iba T. Proposal of the Definition for COVID-19-Associated Coagulopathy / T. Iba, T. E. Warkentin, J. Thachil et al. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – № 2. – P. e191.
15. Tuculeanu G. Coagulation Disorders in Sepsis and COVID-19 - A Review of Inflammation–Coagulation Crosstalk in Bacterial Sepsis and COVID-19 / G. Tuculeanu, E. C. Barbu, M. Lazar et al. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2023. –№ 2. – P. e601.
16. wen Xu S. Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies / S. wen Xu, I. Ilyas, J. ping Weng. –// *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2023. – № 4. – P. e695.
17. Valdebenito S. COVID-19 Lung Pathogenesis in SARS-CoV-2 Autopsy Cases /

S. Valdebenito, S. Bessis, D. Annane et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – №10. – P. 1-23.

18. Da Silva S. J. R. Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned / S. J. R. Da Silva, J. C. F. Do Nascimento, R. P. Germano Mendes et al. // *ACS Infectious Diseases*. – 2022. – № 9. – P. e1758-1814.

19. Gouzi F. Recovery of Endothelium-dependent vascular relaxation impairment in convalescent COVID-19 patients: Insight from a pilot study / F. Gouzi, A. Philippe, J. Pastre et al. // *Respiratory medicine and research*. – 2023. – № 8. – P. e101044.

20. Vita, A. De. Increased Thrombotic Risk in COVID-19: Evidence and Controversy / A. De Vita, F. Franceschi, M. Covino. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2023. – № 13. – P. 12-23.

21. Colling, M. E. COVID–19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms / M. E. Colling, Y. Kanthi // *Vascular Medicine (United Kingdom)*. – 2020. – № 5. – P. 471-478.

22. Manolis A. S. COVID-19 Infection: Viral Macro- and Micro-Vascular Coagulopathy and Thromboembolism/Prophylactic and Therapeutic Management / A. S. Manolis, T. A. Manolis, A. A. Manolis et al. // *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. – 2021. – № 1. – P. 12-24.

23. Middeldorp S. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19 / S. Middeldorp, M. Coppens, T. F. van Haaps et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – № 8. – P. e1995-2002.

24. Llitjos J. F. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients / J. F. Llitjos, M. Leclerc, C. Chochois et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – № 7. – P. e1743-1746.

25. Klok F. A. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: An updated analysis / F. A. Klok, M. J. H. A. Kruip, N. J. M. van der Meer et al. // *Thrombosis Research*. – 2020. –

№ 4. – P. 148-150.

26. Miesbach W. COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation. / W. Miesbach, M. Makris. // Clin Appl Thromb Hemost. – 2020. – №1. – P. e1076029620938149.

27. Barrett C. D. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19: A comment / C. D. Barrett, H. B. Moore, M. B. Yaffe, E. E. Moore. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2020. – № 8. – P. e 2060-e2063.

28. Маркелов М.И. Особенности системы плазменного гемостаза у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 / Маркелов М.И., Безнощенко О.С., Иванец Т.Ю., Пырегов А.В., Есян Р.М., Гаврилова Иванец Т.Ю. Кречетова Л. В. // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 9. – С. 138-144.

29. Devreese K. M. J. COVID-19–related laboratory coagulation findings / K. M. J. Devreese. // International Journal of Laboratory Hematology. – 2021. –№ 7. – P. 36-42.

30. Turner S. Long COVID: pathophysiological factors and abnormalities of coagulation / S. Turner, M. A. Khan, D. Putrino et al. // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2023. – № 6. – P. 321-344.

31. von Meijenfeldt F. A. ustained prothrombotic changes in COVID-19 patients 4 months after hospital discharge / F. A. von Meijenfeldt, S. Havervall, J. Adelmeijer et al. // Blood Advances. – 2021. – № 3. – P. 756-759.

32. Juneja G. K. Biomarkers of coagulation, endothelial function, and fibrinolysis in critically ill patients with COVID-19: A single-center prospective longitudinal study / G. K. Juneja, M. Castelo, C. H. Yeh et al. // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2021. – № 6. – P. e1546-e1557.

33. Chan J. F.-W. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. / J. F.-W. Chan, K.-H. Kok, Z. Zhu et al. // Emerging microbes & infections. – 2020. – № 1. – P. 221-236.

34. Infantino M. Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives. / M. Infantino, A. Damiani, F. L. Gobbi et al. // The Israel Medical Association journal : IMAJ. – 2020. –№ 4. – P. 203-210.
35. Tang Y. W. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. / Y. W. Tang, J. E. Schmitz, D. H. Persing et al. // American Society for Microbiology, 2020. – № 5. – P. e00512-20.
36. Wan Y. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus / Y. Wan, J. Shang, R. Graham et al. // Journal of Virology. – 2020. – № 2 – P.e00127-20.
37. Ashour H. M. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. / H. M. Ashour, W. F. Elkhatib, M. M. Rahman, H. A. Elshabrawy // Pathogens (Basel, Switzerland). – 2020. – № 3. – P.186.
38. Liatsos G. D. SARS-CoV-2 induced liver injury: Incidence, risk factors, impact on COVID-19 severity and prognosis in different population groups / G. D. Liatsos.// World Journal of Gastroenterology. – 2023. –№ 16. – P. 2397.
39. Chu H. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study / H. Chu, J. F.-W. Chan, T. T.-T. Yuen et al. // The Lancet Microbe. – 2020. –№ 1. – P. e14-e23.
40. Matsuyama S. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2- expressing cells / S. Matsuyama, N. Nao, K. Shirato et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2020. – № 13. – P. 7001-7003.
41. Hamming I. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis / I. Hamming, W. Timens, M. L. C. Bulthuis et al.// Journal of Pathology. – 2004. – № 2. – P. 631-637.
42. Sun P. Understanding of COVID-19 based on current evidence / P. Sun, X. Lu, C. Xu et al. // Journal of Medical Virology. – 2020. –№ 6. – P. 548-551.

43. Zhao J. Relationship between the ABO Blood Group and the COVID-19 Susceptibility. / J. Zhao, Y. Yang, H. Huang et al. // *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2020. – № 7. – P.328-331.
44. Liu X. Association of ABO blood groups with von Willebrand factor, factor VIII and ADAMTS-13 in patients with lung cancer / X. Liu, X. Chen, J. Yang, R. Guo // *Oncology Letters*. – 2017. – № 3. – P. 3787.
45. Li M. Endothelium dysfunction and thrombosis in COVID-19 with type 2 diabetes / M. Li, X. Wu, J. Shi, Y. Niu. // *Endocrine*. – 2023. – № 10. – P.15-27.
46. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Версия 10 (утв. Министерством здравоохранения РФ 8 февраля 2021 г.). С. 1-261.
47. Chen N. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study / N. Chen, M. Zhou, X. Dong et al. // *The Lancet*. – 2020. – № 2. – P. 507-513.
48. WorldoMeter. <https://www.worldometers.info/coronavirus/coronavirus-age-sex-demographics/>.
49. Patanavanich R. Smoking Is Associated With COVID-19 Progression: A Meta-analysis / R. Patanavanich, S. A. Glantz. // *Nicotine & Tobacco Research*. – 2020. – № 9. – P. 1653.
50. Bailey M. Vascular risk factors for COVID-19 ARDS: endothelium, contact-kinin system / M. Bailey, D. Linden, H. Guo-Parke et al. // *Frontiers in medicine*. – 2023. – № 6. – P.e10:1208866.
51. Whyte C. S. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19 / C. S. Whyte, G. B. Morrow, J. L. Mitchell et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2020. – № 7. – P. 1548-1555.

52. Siddiqi H. K. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal / H. K. Siddiqi, M. R. Mehra. // *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. – 2020. – № 5. – P. 405.
53. Алексеева Е. И. COVID-19-Индукцированный «Цитокиновый Шторм» — Особая Форма Синдрома Активации Макрофагов / Е. И. Алексеева, Р. Ф. Тепаев, И. Ю. Шилькрот [и др.] // *Вестник Рамн*. – 2021. – Т. 76. – № 1. – С. 51-66.
54. Crayne C. B. The Immunology of Macrophage Activation Syndrome. / C. B. Crayne, S. Albeituni, K. E. Nichols, R. Q. Cron // *Frontiers in immunology*. – 2019. – №2. – P. 119.
55. Schulert G. S. Macrophage activation syndrome and cytokine-directed therapies. / G. S. Schulert, A. A. Grom // *Best practice & research. Clinical rheumatology*. – 2014. – № 2. – P. 277-292.
56. McGonagle D. Immune mechanisms of pulmonary intravascular coagulopathy in COVID-19 pneumonia / D. McGonagle, J. S. O’Donnell, K. Sharif et al. // *The Lancet Rheumatology*. – 2020. – № 7. – P. e437.
57. Witkowski M. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. / M. Witkowski, U. Landmesser, U. Rauch // *Trends in cardiovascular medicine*. – 2016. – № 4. – P. 297-303.
58. Dong J. IL-1 and IL-6 induce hepatocyte plasminogen activator inhibitor-1 expression through independent signaling pathways converging on C/EBPdelta. / J. Dong, S. Fujii, S. Imagawa et al. // *American journal of physiology. Cell physiology*. – 2007. – № 1. – P. 209-215.
59. Галстян Г. М. Коагулопатия при COVID-19 / Г. М. Галстян // *Пульмонология*. – 2020. – Т. 30. – № 5. – P. 645-657.
60. Lorini F. L. Coagulopathy and COVID-19 / F. L. Lorini, M. Di Matteo, P. Gritti et al. // *European heart journal supplements : journal of the European Society of Cardiology*. – 2021. – № 10. – P. e95-e98.

61. Pavoni V. Questions about COVID-19 associated coagulopathy: possible answers from the viscoelastic tests / V. Pavoni, L. Ganesello, M. Pazzi et al. // *Journal of Clinical Monitoring and Computing*. – 2022. – № 1. – P. 55.
62. Alnima T. COVID-19 Coagulopathy: From Pathogenesis to Treatment / T. Alnima, M. M. G. Mulder, B. C. T. Van Bussel, H. Ten Cate. // *Acta Haematologica*. – 2022. – № 3. – P. 282-296.
63. Chowdary P. COVID-19 coagulopathy - what should we treat? / P. Chowdary // *Experimental physiology*. – 2022. – №7. – P.749-758.
64. Zeng Z. Pulmonary pathology of early-phase COVID-19 pneumonia in a patient with a benign lung lesion / Z. Zeng, L. Xu, X. Y. Xie et al. // *Histopathology*. – 2020. – № 5. – P. 823.
65. Zhang Y. Profile of natural anticoagulant, coagulant factor and anti-phospholipid antibody in critically ill COVID-19 patients / Y. Zhang, W. Cao, W. Jiang et al. // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2020. – № 10. – P. 580-586.
66. Iba T. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy / T. Iba, J. H. Levy, J. M. Connors et al. // *Critical Care*. – 2020. – № 1. – P. 1-8.
67. Panigada M. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis / M. Panigada, N. Bottino, P. Tagliabue et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – № 7. – P. 1738-1742.
68. Grigoreva K. N. Clinical significance of measuring ADAMTS-13, its inhibitor and von Willebrand factor in obstetric and gynecological practice / K. N. Grigoreva, V. O. Bitsadze, J. K. Khizroeva et al. // *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*. – 2021. – № 1. – P. 93-106.
69. Kerr, R. Interleukin 6 and haemostasis. / R. Kerr, D. Stirling, C. A. Ludlam // *British journal of haematology*. – 2001. – № 10. – P. 3-12.
70. Stouthard J. M. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. /

- J. M. Stouthard, M. Levi, C. E. Hack et al. // *Thrombosis and haemostasis*. – 1996. – № 5. – P. 738-42.
71. Roberts J. C. Characterization of laboratory coagulation parameters and risk factors for intraventricular hemorrhage in extremely premature neonates / J. C. Roberts, M. J. Javed, M. K. Lundy et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2022. – № 8. – P. 1797-1807.
72. Wardlaw J. M. Small vessel disease: mechanisms and clinical implications / J. M. Wardlaw, C. Smith, M. Dichgans. // *The Lancet. Neurology*. – 2019. – № 7. – P. 684-696.
73. Jourde-Chiche N. Endothelium structure and function in kidney health and disease / N. Jourde-Chiche, F. Fakhouri, L. Dou et al. // *Nature reviews. Nephrology*. – 2019. – № 2. – P. 87-108.
74. Krüger-Genge A. Vascular endothelial cell biology: An update. / A. Krüger-Genge, A. Blocki, R. P. Franke et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – № 9. – P. 4411.
75. Bernard I. Endothelium infection and dysregulation by sars-cov-2: Evidence and caveats in COVID-19. / I. Bernard, D. Limonta, L. K. Mahal et al. // *Viruses*. – 2020. – № 12. – P. 29.
76. Varga Z. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. / Z. Varga, A. J. Flammer, P. Steiger et al. – *Lancet Publishing Group*. – 2020 – № 5. – P.1417-1418.
77. Долгов В.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / П. В. Долгов В.В., Вавилова Т.В., Свирин П.В. – Москва, 2019. – 400 с.
78. Gupta N. The stimulation of thrombosis by hypoxia. / N. Gupta, Y.-Y. Zhao, C. E. Evans // *Thrombosis research*. – 2019. – №9. – P. 77-83.
79. Schmitt F. C. F. Acute fibrinolysis shutdown occurs early in septic shock and is associated with increased morbidity and mortality: results of an observational pilot study / F. C. F. Schmitt, V. Manolov, J. Morgenstern et al. // *Annals of Intensive Care*. –

2019. – № 1. – P. e119.

80. Goshua G. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study / G. Goshua, A. B. Pine, M. L. Meizlish et al. // *The Lancet Haematology*. – 2020. – № 8. – P. e575-e582.

81. Escher R. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation / R. Escher, N. Breakey, B. Lämmle // *Thrombosis Research*. – 2020. – №190. – P. 62.

82. Chioh F. W. J. Convalescent COVID-19 patients are susceptible to endothelial dysfunction due to persistent immune activation / F. W. J. Chioh, S. W. Fong, B. E. Young et al. // *ELife*. – 2021. – №3. – P.e64909.

83. Ma Z. Endothelial contribution to COVID-19: an update on mechanisms and therapeutic implications / Z. Ma, K. Y. Yang, Y. Huang, K. O. Lui // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2022. – №3. – P. 69-82.

84. Vítková V. Endothelial cell-derived microvesicles: potential mediators and biomarkers of pathologic processes / V. Vítková, J. Živný, J. Janota. // *Biomarkers in medicine*. – 2018. – № 2. – P. 161-175.

85. Kauskot A. Platelet receptors / A. Kauskot, M. F. Hoylaerts. // *Handbook of experimental pharmacology*. – 2012. – № 210. – P. 23-57.

86. Boknäs N. Associations between hemostatic markers and mortality in COVID-19 – Compounding effects of D-dimer, antithrombin and PAP complex / N. Boknäs, C. Laine, A. Hillarp et al. // *Thrombosis Research*. – 2022. – №5. – P. 97-104.

87. Martyanov A. A. Longitudinal multiparametric characterization of platelet dysfunction in COVID-19: Effects of disease severity, anticoagulation therapy and inflammatory status / A. A. Martyanov, A. E. Boldova, M. G. Stepanyan et al. // *Thrombosis Research*. – 2022. – №3. – P. 27-37.

88. Neave L. Microangiopathic Hemolytic Anemia in Pregnancy / L. Neave, M. Scully // *Transfusion Medicine Reviews*. – 2018. – № 4. – P. 230-236.

89. Mancini I. The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients /

- I. Mancini, L. Baronciani, A. Artoni et al // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2021. – № 2. – P. 513-521.
90. Bazzan M. Low ADAMTS 13 plasma levels are predictors of mortality in COVID-19 patients / M. Bazzan, B. Montaruli, S. Sciascia et al // *Internal and Emergency Medicine*. – 2020. – № 5. – P. 861-863.
91. Tiscia G. L. Reduction of ADAMTS13 Levels Predicts Mortality in SARS-CoV-2 Patients. / G. L. Tiscia, G. Favuzzi, A. De Lorenzo et al // *TH open : companion journal to thrombosis and haemostasis*. – 2020. – № 3. – P. e203-e206.
92. Ono T. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS-13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure / T. Ono, J. Mimuro, S. Madoiwa et al. // *Blood*. – 2006. – № 2. – P. 528-534.
93. Tiscia G. The prognostic value of ADAMTS -13 and von willebrand factor in COVID-19 patients: Prospective evaluation by care setting / G. Tiscia, G. Favuzzi, A. De Lorenzo et al. // *Diagnostics*. – 2021. – № 9. – P. 1648.
94. Kenny L. C. Platelets, coagulation, and the liver / L. C. Kenny, K. R. McCrae, F. Gary Cunningham // *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy, Fourth Edition*. – Elsevier Science. – 2014. – № 2. – P. 379-396.
95. Gaffney P. J. The haemostatic balance - Astrup revisited / P. J. Gaffney, T. A. Edgell, C. M. Whitton. // *Haemostasis*. – 1999. – №9. – P. 58-71.
96. Antovic A. Impaired Fibrinolysis in the Antiphospholipid Syndrome / A. Antovic, M. Bruzelius. // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2021. – № 5. – P. 506-511.
97. Meizoso J. P. Fibrinolysis Shutdown in COVID-19: Clinical Manifestations, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Implications / J. P. Meizoso, H. B. Moore, E. E. Moore. // *Journal of the American College of Surgeons*. – 2021. – № 6. – P. 995.
98. Wright F. L. Fibrinolysis Shutdown Correlation with Thromboembolic Events in

Severe COVID-19 Infection / F. L. Wright, T. O. Vogler, E. E. Moore et al. // Journal of the American College of Surgeons. – 2020. – № 2. – P. 193-203.

99. Kong R. Hyper- and hypocoagulability in COVID-19 as assessed by thromboelastometry -two case reports- / R. Kong, N. Hutchinson, K. Görlinger. –// Korean Journal of Anesthesiology. – 2021. – № 4. – P. 350.

100. Meizoso J. P. Persistent Fibrinolysis Shutdown Is Associated with Increased Mortality in Severely Injured Trauma Patients. / J. P. Meizoso, C. A. Karcutskie, J. J. Ray et al. // Journal of the American College of Surgeons. – 2016. – № 4. – P. 575-582.

101. Schmitt F. C. F. Acute fibrinolysis shutdown occurs early in septic shock and is associated with increased morbidity and mortality: results of an observational pilot study / F. C. F. Schmitt, V. Manolov, J. Morgenstern et al. // Annals of Intensive Care. – 2019. – № 1. – P. 1-15.

102. Zhang J. Identification of soluble thrombomodulin and tissue plasminogen activator-inhibitor complex as biomarkers for prognosis and early evaluation of septic shock and sepsis-induced disseminated intravascular coagulation / J. Zhang, M. Xue, Y. Chen et al. // Annals of Palliative Medicine. – 2021. – № 10. – P. 1000-1017.

103. D'Alessandro A. Serum Proteomics in COVID-19 Patients: Altered Coagulation and Complement Status as a Function of IL-6 Level / A. D'Alessandro, T. Thomas, M. Dzieciatkowska et al. // Journal of Proteome Research. – 2020. – № 11. – P. 4417-4427.

104. Безнощенко О.С. Частота выявления и длительность циркуляции волчаночного антикоагулянта у пациентов с COVID-19 / Долгушина Н. В., Безнощенко О.С., Шпилюк М.А., Иванец Т.Ю., Кречетова Л.В., Пырегов А.В., Кодацкий Д.С., Тавлуева Е.В., Мелкумян А.Р., Городнова Е.А. // Российский иммунологический журнал. – 2021. – Т. 24. – № 3. – С. 413-418.

105. Grosso G. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) — A possible link between coagulation and complement activation in the antiphospholipid syndrome (APS) / G. Grosso, A. Vikerfors, B. Woodhams et al. // Thrombosis Research. – 2017. – № 10. – P. 168-173.

106. Baker S. K. A critical role for plasminogen in inflammation / S. K. Baker, S. Strickland. // *The Journal of experimental medicine*. – 2020. – № 4. – P.e20191865.
107. Rey J. R. Arterial thrombotic complications in hospitalized patients with COVID-19 / J. R. Rey, J. Caro-Codón, D. Poveda Pineda et al. // *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. – 2020. – № 9. – P. 769-771.
108. Ribes A. Thromboembolic events and COVID-19 / A. Ribes, F. Vardon-Bounes, V. Mémier et al. // *Advances in biological regulation*. – 2020. – № 8. – P. 100735.
109. Angelini D. E. COVID-19 and venous thromboembolism: A narrative review / D. E. Angelini, S. Kaatz, R. P. Rosovsky et al. // *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. – 2022. – № 2. – P. e12666.
110. Макацария А. Д. Влияние различных видов антикоагулянтной терапии на снижение летальности при COVID-19 / А. Д. Макацария, Е. В. Слуханчук, В. О. Бицадзе [и др.] // *Вестник российской академии медицинских наук*. – 2021. – Т. 76. – № 3. – С. 268-278.
111. Tang N. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia / N. Tang, D. Li, X. Wang, Z. Sun. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – № 4. – P. 844-847.
112. Bertolletti L. Venous thromboembolism and COVID-19 / L. Bertolletti, F. Couturaud, D. Montani et al. // *Respiratory Medicine and Research*. – 2020. – № 11. – С. 100759.
113. Han H. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection / H. Han, L. Yang, R. Liu et al. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2020. – № 7. – P. 1116-1120.
114. Ai T. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases / T. Ai, Z. Yang, H. Hou et al // *Radiology*. – 2020. – № 2. – P. e32-e40.
115. Luo W. Clinical Pathology of Critical Patient with Novel Coronavirus Pneumonia

(COVID-19) : First Case of the Whole Lung Biopsy. / W. Luo, H. Yu, J. Gou et al. // preprint. – 2020. – P. 2020020407.

116. Wang D. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China / D. Wang, B. Hu, C. Hu et al. // JAMA. – 2020. – № 11. – P. 1061-1069.

117. Ferrari E. High Prevalence of Acquired Thrombophilia Without Prognosis Value in Patients With Coronavirus Disease 2019 / E. Ferrari, B. Sartre, F. Squara et al. // Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease. – 2020. – № 21 – P. e017773.

118. Favalaro E. J. Is Lupus Anticoagulant a Significant Feature of COVID-19? A Critical Appraisal of the Literature / E. J. Favalaro, B. M. Henry, G. Lippi. // Seminars in thrombosis and hemostasis. – 2022. – № 1. – P. 55-71.

119. Gendron N. Lupus Anticoagulant Single Positivity During the Acute Phase of COVID-19 Is Not Associated With Venous Thromboembolism or In-Hospital Mortality / N. Gendron, M. A. Dragon-Durey, R. Chocron et al. // Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.). – 2021. – № 11. – P. 1976-1985.

120. Stelzer M. The Role of Antiphospholipid Antibodies in COVID-19 / M. Stelzer, J. Henes, S. Saur. // Current rheumatology reports. – 2021. – № 7. – P.72-81.

121. Butt A. COVID-19 and antiphospholipid antibodies / A. Butt, D. Erkan, A. I. Lee. // Best Practice & Research. Clinical Haematology. – 2022. – № 3. – P. e101402.

122. Долгушина Н.В. Профиль антифосфолипидных антител и состояние системы комплемента у больных COVID-19 разной степени тяжести / Долгушина Н.В., Менжинская И.В., Безнощенко О.С., Муллабаева С.М., Городнова Е.А., Кречетова Л.В. // Медицинская иммунология. – 2022. – Т. 24. – № 2. – С. 351-366.

123. Большая медицинская энциклопедия (1970). РЕКОНВАЛЕСЦЕНТ. – URL: <http://med.niv.ru/doc/encyclopedia/med/articles/2563/rekonvalescent.htm> (дата обращения: 17.05.2023).

124. Castanares-Zapatero D. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review / D. Castanares-Zapatero, P. Chalon, L. Kohn et al. // *Annals of Medicine*. – 2022. – № 1. – P. 1473.
125. Goërtz Y. M. J. Persistent symptoms 3 months after a SARS-CoV-2 infection: the post-COVID-19 syndrome? / Y. M. J. Goërtz, M. Van Herck, J. M. Delbressine et al. // *ERJ Open Research*. – 2020. – № 4. – P. e00542-e2020.
126. Halpin S. J. Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: A cross-sectional evaluation / S. J. Halpin, C. McIvor, G. Whyatt et al. // *Journal of medical virology*. – 2021. – № 2. – P. 1013-1022.
127. Gatt A. Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy / A. Gatt, A. Riddell, V. Calvaruso et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2010. – № 9. – P. 1994-2000.
128. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory / A. Tripodi. // *Clinical Chemistry*. – 2016. – № 5. – P. 699-707.
129. Willems L. H. Sustained inflammation, coagulation activation and elevated endothelin-1 levels without macrovascular dysfunction at 3 months after COVID-19 / L. H. Willems, M. Nagy, H. ten Cate et al. // *Thrombosis Research*. – 2022. – №. 209. – P. 106.
130. Raskob G. E. Thrombosis: a major contributor to the global disease burden / G. E. Raskob, P. Angchaisuksiri, A. N. Blanco et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2014. – № 10. – P. e2363-e2371.
131. Bronić A. Policies and practices in haemostasis testing among laboratories in Croatia: a survey on behalf of a Working Group for Laboratory Coagulation of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine / A. Bronić, D. C. Herak, S. Margetić et al. // *Biochemia Medica*. – 2017. – № 1. – P. 199.
132. Жалялов А. С. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений / А. С. Жалялов, А. Н. Баландина, А. Д.

Купраш [и др.] // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2017. – Т. 16. – № 1. – С. 69-82.

133. Volod O. Viscoelastic Hemostatic Assays: A Primer on Legacy and New Generation Devices / O. Volod, C. M. Bunch, N. Zackariya et al. // Journal of Clinical Medicine. – 2022. – № 3. – P. 860.

134. Prior S. M. Continuous thrombin generation in whole blood: new applications for assessing activators and inhibitors of coagulation / S. M. Prior, K. G. Mann, K. Freeman et al. // Analytical biochemistry. – 2018. – № 6. – P. 19-25.

135. Гриневич Т. Н. Ротационная тромбоэластометрия (ROTEM) / Т. Н. Гриневич, А. В. Наумов, С. В. Лелевич // ГрГМУ. – 2010. – Т. 50. – № №1. – С. 7-9.

136. Korpallová B. Role of Thromboelastography and Rotational Thromboelastometry in the Management of Cardiovascular Diseases / B. Korpallová, M. Samoš, T. Bolek et al. // Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. – 2018. – № 8. – P. 1199.

137. Görlinger K. Rotational thromboelastometry (ROTEM®) / K. Görlinger, D. Dirkmann, A. A. Hanke. // Trauma Induced Coagulopathy. – 2016. – С. 267-298.

138. Brill J. B. The Role of TEG and ROTEM in Damage Control Resuscitation / J. B. Brill, M. Brenner, J. Duchesne et al. // Shock (Augusta, Ga.). – 2021. – № 12 – P. 52-61.

139. Sokou R. A Risk Score for Predicting the Incidence of Hemorrhage in Critically Ill Neonates: Development and Validation Study / R. Sokou, D. Piovani, A. Konstantinidi et al. // Thrombosis and haemostasis. – 2021. – № 2. – P. 131-139.

140. Moore E. E. Trauma-induced coagulopathy / E. E. Moore, H. B. Moore, L. Z. Kornblith et al. // Nature reviews. Disease primers. – 2021. – № 1. – P. 30-42.

141. Görlinger K. The role of evidence-based algorithms for rotational thromboelastometry-guided bleeding management / K. Görlinger, A. Pérez-Ferrer, D. Dirkmann et al. // Korean journal of anesthesiology. – 2019. – № 4. – P. 297-322.

142. Frigo M. G. Practical approach to transfusion management of post-partum haemorrhage / M. G. Frigo, V. Agostini, A. Brizzi et al. // *Transfusion medicine* (Oxford, England). – 2021. – № 1. – P. 11-15.
143. Abdelmaguid A. Evaluation of novel coagulation and platelet function assays in patients with chronic kidney disease / A. Abdelmaguid, L. N. Roberts, L. Tugores et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2022. – № 4. – P. 845-853.
144. Almskog L. M. Hypercoagulation Detected by Rotational Thromboelastometry Predicts Mortality in COVID-19: A Risk Model Based on a Prospective Observational Study / L. M. Almskog, A. Wikman, J. Svensson et al. // *TH Open: Companion Journal to Thrombosis and Haemostasis*. – 2022. – № 1. – P. e50-e59.
145. Zanetto A. Thromboelastometry hypercoagulable profiles and portal vein thrombosis in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma / A. Zanetto, M. Senzolo, A. Vitale et al. // *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. – 2017. – № 4. – P. 440-445.
146. Pavoni V. Evaluation of coagulation function by rotation thromboelastometry in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia / V. Pavoni, L. Gianesello, M. Pazzi et al. // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2020. – № 2. – P. 281-290.
147. Zanetto A. Cancer-Associated Thrombosis in Cirrhotic Patients with Hepatocellular Carcinoma / A. Zanetto, E. Campello, L. Spiezia et al. // *Cancers*. – 2018. – № 11. P. 450.
148. Filonova M. V. Changes in Hemostasis System in Outbred Female Mice with Cisplatin-Induced Procoagulant Status / M. V. Filonova, E. P. Fedorova, A. A. Churin et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2020. – № 1. – P. 15-18.
149. Corey F. S. Sonic Estimation of Elasticity via Resonance: A New Method of Assessing Hemostasis / F. S. Corey, W. F. Walker. // *Annals of biomedical engineering*. – 2016. – № 5. – P. 1405-1424.

150. Gong J. Evaluation of Blood Coagulation by Optical Vortex Tracking / J. Gong, Y. Zhang, H. Zhang et al. // *Sensors (Basel, Switzerland)*. – 2022. – № 6. – P. 4793.
151. Depasse F. Thrombin generation assays are versatile tools in blood coagulation analysis: A review of technical features, and applications from research to laboratory routine / F. Depasse, N. B. Binder, J. Mueller et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2021. – № 12. – C. 2907.
152. Tripodi A. Acquired coagulation disorders: revisited using global coagulation/anticoagulation testing / A. Tripodi, V. Chantarangkul, P. M. Mannucci. // *British journal of haematology*. – 2009. – № 1. – P. 77-82.
153. Teichman J. Novel assays in the coagulation laboratory: a clinical and laboratory perspective / J. Teichman, H. R. Chaudhry, M. Sholzberg. // *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. – 2018. – № 4. – P. 480-484.
154. Chelle P. Prediction of individual factor VIII or IX level for the correction of thrombin generation in haemophilic patients / P. Chelle, A. Montmartin, M. Piot et al. // *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia*. – 2018. – № 6. – P. 995-1001.
155. Dargaud Y. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab / Y. Dargaud, A. Lienhart, M. Janbain et al. // *Haematologica*. – 2018. – № 4. – P. e181-e183.
156. Kiziloca H. Management of perioperative hemostasis in a severe hemophilia A patient with inhibitors on emicizumab using global hemostasis assays / H. Kiziloca, C. L. Yukhtman, E. Marquez-Casas et al. // *Therapeutic advances in hematology*. – 2019. – №.10. – P. 1-9.
157. Van Hylckama Vlieg A. Elevated endogenous thrombin potential is associated with an increased risk of a first deep venous thrombosis but not with the risk of recurrence / A. Van Hylckama Vlieg, S. C. Christiansen, R. Luddington et al. // *British*

journal of haematology. – 2007. – № 6. – P. 769-774.

158. Segers O. Thrombin generation as an intermediate phenotype for venous thrombosis / O. Segers, R. Van Oerle, H. Ten Cate et al. // *Thrombosis and haemostasis*. – 2010. – № 1. – P. 114-122.

159. van Hylckama Vlieg A. The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study / A. van Hylckama Vlieg, C. A. Baglin, R. Luddington et al. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2015. – № 9. – P. 1642-1652.

160. Liestol S. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test is associated with thrombotic events in patients with lupus anticoagulants / S. Liestol, P. M. Sandset, M. C. Mowinckel, F. Wisloff. // *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. – 2007. – № 11. – P. 2204-2211.

161. Zuily S. Thrombin generation in antiphospholipid syndrome / S. Zuily, K. A. Aissa, A. Membre et al. // *Lupus*. – 2012. – № 7. – P. 758-760.

162. Attanasio M. Residual thrombin potential predicts cardiovascular death in acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention / M. Attanasio, R. Marcucci, A. M. Gori et al. // *Thrombosis research*. – 2016. – № 1. – P. 52-57.

163. Emani S. Hypercoagulability panel testing predicts thrombosis in neonates undergoing cardiac surgery / S. Emani, D. Zurakowski, C. W. Baird et al. // *American journal of hematology*. – 2014. – № 2. – P. 151-155.

164. Subramaniam S. A thrombin-PAR1/2 feedback loop amplifies thromboinflammatory endothelial responses to the viral RNA analogue poly(I:C) / S. Subramaniam, Y. Ogoti, I. Hernandez et al. // *Blood Advances*. – 2021. – № 7. – P. 2760-2774.

165. Van Gorp E. C. Activation of coagulation factor XI, without detectable contact activation in dengue haemorrhagic fever / E. C. Van Gorp, M. C. Minnema, C. Suharti

et al. // *British Journal of Haematology*. – 2001. – № 1. – P. 94-99.

166. Chistolini A. Effect of low or high doses of low-molecular-weight heparin on thrombin generation and other haemostasis parameters in critically ill patients with COVID-19 / A. Chistolini, F. Ruberto, F. Alessandri et al. // *British Journal of Haematology*. – 2020. – № 4. – P. e214-e218.

167. Lipets E. N. Global assays of hemostasis in the diagnostics of hypercoagulation and evaluation of thrombosis risk / E. N. Lipets, F. I. Ataullakhanov. // *Thrombosis Journal*. – 2015. – № 1 – P. 4-18.

168. Кречетова Л.В. Использование теста тромбодинамики в диагностике нарушений гемостаза у больных COVID-19 разной степени тяжести / Кречетова Л.В., Нечипуренко Д.Ю., Шпилюк М.А., Безнощенко О.С. [и др.]. // *Клиническая практика*. – 2021. – Т. 12. – № 4. – С. 23-37.

169. Balandina A. N. Thrombodynamics—A new global hemostasis assay for heparin monitoring in patients under the anticoagulant treatment / A. N. Balandina, I. I. Serebriyskiy, A. V. Poletaev et al. // *PLoS ONE*. – 2018. – № 6. P. e0199900.

170. Litvinov R. I. Altered platelet and coagulation function in moderate-to-severe COVID-19 / R. I. Litvinov, N. G. Evtugina, A. D. Peshkova et al. // *Scientific Reports* 2021 11:1. – 2021. – № 1. – P. 1-14.

171. Devreese K. M. J. Interference of C-reactive protein with clotting times / K. M. J. Devreese, C. J. Verfaillie, F. De Bisschop, J. R. Delanghe. // *Clinical chemistry and laboratory medicine*. – 2015. – № 5. – P. e141-e145.

172. Mei Z. W. Role of von Willebrand Factor in COVID-19 Associated Coagulopathy / Z. W. Mei, X. M. R. van Wijk, H. P. Pham, M. J. Marin. // *The Journal of Applied Laboratory Medicine*. – 2021. – № 5. – P. 1305-1315.

173. Iba T. Clinical Medicine Proposal of the Definition for COVID-19-Associated Coagulopathy / T. Iba, T. E. Warkentin, J. Thachil et al. // *J. Clin. Med.* – 2021. – №. 10. – P. 191.

174. Временные методические рекомендации Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Версия 9 (утв. Министерством здравоохранения РФ 26.10.2020 г.) С. 1-236.
175. Luo H. Characteristics of coagulation alteration in patients with COVID-19 / H. Luo, C. You, S. Lu, Y. Fu // *Annals of Hematology*. – 2021. – № 1. – P. 45-52.
176. Guder W. G. *Samples: From the Patient to the Laboratory: The Impact of Preanalytical Variables on the Quality of Laboratory Results: Third Revised Edition* / W. G. Guder, S. Narayanan, H. Wisser et al. // Wiley Blackwell. – 2007. – P. 1-107.
177. Ramiz S. Clinical utility of viscoelastic testing (TEG and ROTEM analyzers) in the management of old and new therapies for hemophilia / S. Ramiz, J. Hartmann, G. Young et al. // *American Journal of Hematology*. – 2019. – № 2. – P. 249-256.
178. Hemker H. C. The Calibrated Automated Thrombogram (CAT): A universal routine test for hyper- and hypocoagulability / H. C. Hemker, P. Giesen, R. AlDieri et al. // *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. – 2002. – № 5-6. – P. 249-253.
179. Chen G. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019 / Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 2020. – № 5. – P. 2620-2629.
180. Fan B. E. Global haemostatic tests demonstrate the absence of parameters of hypercoagulability in non-hypoxic mild COVID-19 patients: a prospective matched study—Reply to comment from Muzaffar et al. / B. E. Fan, Y. W. Chia, G. H. Lim et al. // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2022. – № 4. – P. 976.
181. Tang N. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia / N. Tang, D. Li, X. Wang, Z. Sun. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – № 4. – P. 844-847.
182. Manolis A. S. COVID-19 Infection: Viral Macro- and Micro-Vascular Coagulopathy and Thromboembolism/Prophylactic and Therapeutic Management / A. S. Manolis, T. A. Manolis, A. A. Manolis et al. // *Journal of cardiovascular*

pharmacology and therapeutics. – 2021. – № 1. – P. 12-24.

183. Kruse J. M. Thromboembolic complications in critically ill COVID-19 patients are associated with impaired fibrinolysis / J. M. Kruse, A. Magomedov, A. Kurreck et al. // *Critical care (London, England)*. – 2020. – № 12. – P. 676.

184. Grobler C. COVID-19: The Rollercoaster of Fibrin(Ogen), D-Dimer, Von Willebrand Factor, P-Selectin and Their Interactions with Endothelial Cells, Platelets and Erythrocytes / C. Grobler, S. C. Maphumulo, L. M. Grobbelaar et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – № 14. – P. 1-25.

185. Krechetova L. V. The use of the thrombodynamics test in the diagnostics of hemostasis disorders in patients with COVID-19 of varying severity / L. V. Krechetova, D. Y. Nechipurenko, M. A. Shpilyuk et al. // *Journal of Clinical Practice*. – 2021. – № 4. – P. 23-37.

186. Долгушина Н.В. Роль и место интегральных методов в диагностике нарушений системы гемостаза у больных COVID-19 / Долгушина Н.В., Шпилюк М.А., Безнощенко О. С. [и др.] // *Лабораторная служба*. – 2022. – № 11. – С. 7-15.

187. Hincker A. Rotational thromboelastometry predicts thromboembolic complications after major non-cardiac surgery / A. Hincker, J. Feit, R. N. Sladen, G. Wagener. // *Critical Care*. – 2014. – № 10. – P. 549.

188. Xu Z. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome / Z. Xu, L. Shi, Y. Wang et al. // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2020. – № 4. – P. 420-422.

189. Henry B. M. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. / B. M. Henry, M. H. S. De Oliveira, S. Benoit et al. – De Gruyter, 2020. – № 6. – P.1021-1028.

190. Terpos E. Hematological findings and complications of COVID-19 / E. Terpos, I. Ntanasis-Stathopoulos, I. Elalamy et al. // *American journal of hematology*. – 2020. –

№ 7. – P. 834-847.

191. Marchandot B. COVID-19 Related Coagulopathy: A Distinct Entity? / B. Marchandot, L. Sattler, L. Jesel et al. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – № 6. – P. 1651.
192. Li Y. Clinical Significance of Plasma D-Dimer in COVID-19 Mortality / Y. Li, Y. Deng, L. Ye et al. // *Frontiers in medicine*. – 2021. – № 5. – P. 638097.
193. Simadibrata D. M. D-dimer levels on admission and all-cause mortality risk in COVID-19 patients: a meta-analysis / D. M. Simadibrata, A. M. Lubis. // *Epidemiology and infection*. – 2020. – № 9. – P. e202.
194. Rajendran V. Course of COVID-19 Based on Admission D-Dimer Levels and Its Influence on Thrombosis and Mortality / V. Rajendran, S. Gopalan, P. Varadaraj et al. // *Journal of clinical medicine research*. – 2021. – № 7. – P. 403-408.
195. Jung F. COVID-19 and the endothelium / F. Jung, A. Krüger-Genge, R. P. Franke et al. // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. – 2020. – № 1. – P. 107-119.
196. Dolgushina N. V. Von Willebrand factor and ADAMTS-13 are associated with the severity of COVID-19 disease / N. V. Dolgushina, E. Gorodnova, O. Beznoshenco et al. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2022. – № 7. – P. 4006.
197. Долгушина Н.В. Патент "Способ лабораторной диагностики тяжести COVID-19 по определению соотношения активности фактора Виллебранда и ADAMTS-13" / Долгушина Н.В., Городнова Е.А., Кречетова Л.В., Иванец Т.Ю., Безнощенко О.С. [и др.] № 2774143 от 22.02.2022.
198. Gu S. X. Thrombocytopeny and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation / S. X. Gu, T. Tyagi, K. Jain et al. // *Nature Reviews Cardiology* 2020 18:3. – 2020. – № 3. – P. 194-209.
199. Helms J. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study / J. Helms, C. Tacquard, F. Severac et al. // *Intensive Care Medicine*. – 2020. – № 6. – P. 1089-1098.

200. Zuo Y. Prothrombotic autoantibodies in serum from patients hospitalized with COVID-19 / Y. Zuo, S. K. Estes, R. A. Ali et al. // *Science Translational Medicine*. – 2020. – №. 12. – P 570.
201. Badaras I. Vascular Aging and COVID-19 / I. Badaras, A. Laučytė-Cibulskienė. // *Angiology*. – 2023. – № 4. – P. 308.
202. Zuo Y. Plasma tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in hospitalized COVID-19 patients / Y. Zuo, M. Warnock, A. Harbaugh et al. // *Sci Rep*. – 2021 – № 1. – P. 1580.
203. Cabrera-Garcia D. High levels of plasminogen activator inhibitor-1, tissue plasminogen activator and fibrinogen in patients with severe COVID-19 / D. Cabrera-Garcia, A. Miltiades, S. Parsons et al. // *Neurosurg Anesthesiology*. – 2022. – № 1. – P. 133-140.
204. Won T. Endothelial thrombomodulin downregulation caused by hypoxia contributes to severe infiltration and coagulopathy in COVID-19 patient lungs / T. Won, M. K. Wood, D. M. Hughes et al. // *EBioMedicine*. – 2022. – № 1. –P. e103812.
205. Prins M. H. A Critical Review of the Evidence Supporting a Relationship Between Impaired Fibrinolytic Activity and Venous Thromboembolism / M. H. Prins, J. Hirsh. // *Archives of Internal Medicine*. – 1991. – № 9. – P. 1721-1731.
206. Görlinger K. The role of rotational thromboelastometry during the COVID-19 pandemic: a narrative review / K. Görlinger, H. Almutawah, F. Almutawaa et al. // *Korean Journal of Anesthesiology*. – 2021. – № 2. – P. 91.
207. Joshi D. Adequate Antithrombin III Level Predicts Survival in Severe COVID-19 Pneumonia / D. Joshi, S. Manohar, G. Goel et al. // *Cureus*. – 2021. – № 10. P. 1-13.
208. Katz D. Monitoring of COVID-19-Associated Coagulopathy and Anticoagulation with Thromboelastometry / D. Katz, P. Maher, C. Getrajdman et al. // *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. – 2021. – № 3. – P. 168.
209. Cohen O. Association between Thrombin Generation and Clinical Characteristics

in COVID-19 Patients / O. Cohen, N. Landau, E. Avisahai et al. // *Acta haematologica*. – 2023. – № 2. – P. 151-160.

210. Casale M. Thromboembolism in COVID-19: the unsolved problem / M. Casale, G. Dattilo, E. Imbalzano et al. // *Panminerva Medica*. – 2023. – № 1. – P. 51-57.