

УДК 616.005.6+616.9
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-4-87-94

И. А. ТИХОМИРОВА¹, М. М. РЯБОВ²

Сравнительный анализ показателей состояния системы гемостаза при тяжелом течении COVID-19

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Республиканская, д. 108/1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль, Россия 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5
E-mail: tikhom-irina@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 15.08.21 г.; принята к печати 12.11.21 г.

Резюме

Введение. Клинический опыт ведения пациентов с новой коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, позволил выявить специфические нарушения гемостаза, на основании чего было введено понятие COVID-ассоциированной коагулопатии. **Цель** исследования – оценить направленность изменений показателей коагулограммы, параметров свертывания цельной крови и характеристик тромбоцитарного и плазменного гемостаза у пациентов с тяжелым течением COVID-19. **Материалы и методы.** Для оценки параметров системы гемостаза кровь отбирали венопункцией у 12 пациентов с тяжелой формой COVID-19 и 16 практически здоровых лиц. Процесс свертывания цельной крови исследовали методом низкочастотной пьезотромбоэластографии. С помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов измеряли число тромбоцитов и показатели спонтанной и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Оценивали фибринолитическую активность плазмы, активность плазминогена, содержание фибриногена, D-димера, протромбиновое время (ПТВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), (протромбиновый индекс (ПТИ) и международное нормализованное отношение (МНО). **Результаты.** У пациентов с тяжелой формой COVID-19 отмечен повышенный уровень фибриногена, 6-кратное увеличение D-димера и удлинение ПТВ. Число тромбоцитов у пациентов было снижено на 51 % ($p < 0,05$), спонтанная агрегация практически не отличалась от нормы. Выявлено почти полное ингибирование реактивности тромбоцитов в отношении АДФ и угнетение XPa-зависимого фибринолиза, несмотря на повышенную на 19,3 % ($p < 0,05$) активность плазминогена. Выраженная активация тромбоцитарного гемостаза, значительная интенсификация полимеризационного этапа формирования сгустка и повышенная интенсивность лизиса и ретракции сгустка зафиксированы при анализе показателей процесса свертывания цельной крови. **Заключение.** Зафиксированные нами значительный рост уровня D-димера и парадоксальное ингибирование фибринолитической активности плазмы при ее изолированной оценке по тесту XPa-зависимого фибринолиза (в отличие от повышенной интенсивности лизиса сгустка при оценке свертывания цельной крови) свидетельствуют о комплексном характере патогенетических механизмов коагулопатии при инфицировании SARS-CoV-2 и вовлеченности клеточных компонентов крови и сосудистой стенки в процесс патологического тромбообразования.

Ключевые слова: тяжелая форма COVID-19, коагулопатия, агрегация тромбоцитов, фибринолиз, D-димер

Для цитирования: Тихомирова И. А., Рябов М. М. Сравнительный анализ показателей состояния системы гемостаза при тяжелом течении COVID-19. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2021;20(4):87–94. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-4-87-94.

UDC 616.005.6+616.9
DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-4-87-94

I. A. TIKHOMIROVA¹, M. M. RYABOV²

Comparative analysis of hemostasis system state indicators in severe COVID-19

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia 108/1, Respublikanskaya str., Yaroslavl, Russia, 150000

² Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia 5, Revolutsionnaya str., Yaroslavl, Russia, 150000
E-mail: tikhom-irina@yandex.ru

Received 15.08.21; accepted 12.11.21

Summary

Introduction. Clinical experience in managing patients with a new coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 allowed to identify specific hemostasis disorders, and enables to introduce the concept of COVID-associated coagulopathy. The *aim* of the study was to assess the direction of coagulogram parameter changes, whole blood clotting parameters and characteristics of platelet and plasma hemostasis in patients with severe COVID-19. **Materials and methods.** The parameters of the hemostasis system were assessed using venous blood of 12 patients with severe COVID-19 and 16 healthy volunteers. The whole blood clotting process

was investigated by low-frequency piezothromboelastography. The platelet count and indicators of spontaneous and ADP-induced platelet aggregation were estimated with the help of a laser platelet aggregation analyzer. Fibrinolytic activity of plasma, plasminogen activity, content of fibrinogen, D-dimer, PTT, APTT, PTI and INR were assessed. *Results.* An increased level of fibrinogen, a 6-fold increased D-dimer level, and increased PTT were found in patients with severe COVID-19. The patient platelets count was reduced by 51 % ($p < 0.05$), spontaneous platelet aggregation remained at nearly normal level. Almost complete inhibition of ADP-induced platelet reactivity and inhibition of XIIa-dependent fibrinolysis was revealed, despite an increased by 19.3 % ($p < 0.05$) plasminogen activity. Parameters of the whole blood coagulation process pointed a pronounced activation of platelet hemostasis, a significant intensification of the polymerization stage of clot formation and an increased intensity of clot lysis and retraction. *Conclusion.* The significant increase of D-dimer level and paradoxical inhibition of plasma fibrinolytic activity revealed by test of XIIa-dependent fibrinolysis (in contrast to the increased intensity of clot lysis when assessing the coagulation of whole blood) indicate the complex pathogenic mechanisms of coagulopathy caused by SARS-CoV-2 infection, and the involvement of blood cells and the vascular wall in the process of pathological thrombus formation.

Keywords: *severe COVID-19, coagulopathy, platelet aggregation, fibrinolysis, D-dimer*

For citation: *Tikhomirova I. A., Ryabov M. M. Comparative analysis of hemostasis system state indicators in severe COVID-19. Regional hemodynamics and microcirculation. 2021;20(4):87–94. Doi: 10.24884/1682-6655-2021-20-4-87-94.*

Введение

Поражение микроциркуляторного русла играет важную роль в патогенезе COVID-19 [1]. Основной причиной нарушения микроциркуляции при новой коронавирусной инфекции считается дисфункция эндотелия, которая ведет к изменению баланса сосудистого русла в сторону сужения сосудов, вызывающего ишемию, к воспалению и прокоагулянтному состоянию. Как только SARS-CoV-2 прикрепляется к рецептору АПФ2 эндотелиальных клеток (ЭК), инициируется высвобождение тканевого фактора, который связывает FVII и активирует внешний путь коагуляции. Способность SARS-CoV-2 проникать в эндотелиоциты ведет к развитию системной дисфункции эндотелия. Вследствие системной дисфункции эндотелия и коагулопатии при COVID-19 повышается риск летального исхода по причине венозной (около 70 % пациентов, находящихся в критическом состоянии) или артериальной тромбоэмболии, значительно реже – геморрагических осложнений [2].

Клинический опыт ведения пациентов с новой коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, позволил выявить специфические нарушения гемостаза, которые в основном носят гиперкоагуляционную направленность (хотя отмечаются и геморрагические проявления), на основании чего было введено понятие COVID-ассоциированной коагулопатии [3].

Коагулопатия при COVID-19 ассоциирована со всеми основными компонентами триады Вирхова (повреждение эндотелия, стаз и состояние гиперкоагуляции) [4], поэтому риск тромбоэмболических осложнений повышается при длительной иммобилизации и наличии сопутствующих заболеваний, при которых имеет место дисфункция эндотелия (сахарный диабет и др.). Множественный тромбоз сосудов и системные нарушения ведут к полиорганной недостаточности, характерной для тяжелого течения COVID-19 [2].

При полиорганной недостаточности выявлено воспаление эндотелия во всех пораженных органах (легкие, почки, кишечник и т. д.). Эндотелиальная дисфункция может вызвать системное прокоагулянтное состояние в дополнение к специфическим повреждениям органа [5]. ЭК также вносят свой вклад в регулирование кровотока из-за их способности подавлять тромбогенность; в патофизиологической

ситуации, такой как индуцированное инфекцией SARS-CoV-2 гиперактивное воспаление, ЭК начинают генерировать антифибринолитическое и протромботическое микроокружение и в основном участвуют в тромбоэмболии [6].

Тромботические осложнения (венозная и легочная тромбоэмболия) при COVID-19 встречаются примерно у одной трети пациентов, находящихся в отделении интенсивной терапии, даже несмотря на тромбопрофилактику антикоагулянтами [7–9]. Тромбоз на уровне микроциркуляции в легких ведет к обструкции мелких сосудов и легочной недостаточности [8, 10, 11]. Взаимосвязь тяжелой формы COVID-19 с вирусной коагулопатией, которая проявляется в легочной эмболии, венозном, артериальном и микрососудистом тромбозе, обусловленных повреждением легочного эндотелия, и тромботическими осложнениями, ведущими к развитию острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), зафиксирована в ряде клинических исследований [12].

Способность вирусных инфекций интенсифицировать процесс свертывания крови хорошо известна, однако у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, отмечен беспрецедентный уровень тромботических осложнений. Причем риск таких осложнений присутствует не только у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, но и у пациентов без коморбидности (здоровых лиц) [13]. COVID-19-вызванная коагулопатия проявляется как иммунотромботический ответ и неконтролируемый процесс у пациентов с критическим течением заболевания [13].

Механизмы коагулопатии пока не изучены, высказываются предположения о вкладе таких факторов, как повреждение эндотелия, гипоксия, дисрегуляция иммунного ответа из-за провоспалительных цитокинов, гибели лимфоцитов [14]. До сих пор спорным остается вопрос, являются ли фиксируемые нарушения гемостаза следствием системного воспаления, или они представляют собой специфический эффект, вызванный вирусом [15]?

Исходя из высокого риска тромботических осложнений в случае госпитализации по поводу средне-тяжелого, тяжелого и крайне тяжелого течения у пациентов с COVID-19, в числе необходимых лабораторных исследований рекомендовано выполнение коагулограммы с определением активированного ча-

стичного тромбопластинного времени (АЧТВ), протромбинового времени, протромбинового отношения и (или) процент протромбина по Квику, фибриногена, D-димера (количественным методом) [1].

Поскольку коагулопатия при COVID-19 ассоциируется с риском смерти, а ее механизмы изучены недостаточно, представляло интерес сопоставить рутинные лабораторные показатели коагулограммы, рекомендованные к применению для госпитализированных пациентов, с параметрами свертывания цельной крови (дающими общую картину состояния системы гемостаза) и изолированными характеристиками агрегационных свойств тромбоцитов и фибринолитической активности плазмы, в определенной степени отражающими состояние тромбоцитарного и плазменного гемостаза.

Цель – оценить направленность изменений показателей коагулограммы, параметров свертывания цельной крови и характеристик тромбоцитарного и плазменного гемостаза у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

Материалы и методы исследования

Характеристика групп обследуемых. В исследование были включены 12 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 с тяжелой формой течения, госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) в июне-июле 2020 г. (5 мужчин, 7 женщин в возрасте от 48 до 83 лет (средний возраст – $62,6 \pm 11,7$ года). Сопутствующие заболевания в анамнезе: СД II типа (2 пациента), нарушение толерантности к глюкозе (1), стенокардия напряжения ФК II (3), последствия ОНМК с моторной афазией (1), гипертоническая болезнь III ст. (4), общий атеросклероз с преимущественным поражением сердца и сосудов нижних конечностей (1). У 7 пациентов в период нахождения в ОРИТ, несмотря на проводимую терапию, состояние прогрессивно ухудшалось, и на фоне нарастающей полиорганной недостаточности наступила смерть.

На момент обследования 6 пациентов находились на ИВЛ, 6 пациентам применялась инсуффляция увлажненного кислорода; все пациенты получали профилактические дозы эноксапарина натрия. Согласно действующим рекомендациям, назначение низкомолекулярных гепаринов показано всем госпитализированным пациентам и должно продолжаться, как минимум, до выписки [1]. В контрольную группу были включены 16 практически здоровых лиц обоего пола (7 мужчин и 9 женщин, средний возраст обследуемых составил $57,4 \pm 12,5$ года).

Забор крови производился из локтевой вены с применением стандартных цитратных (3,8 %) вакутейнеров.

Исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (в редакции 2013 г.).

Оценка процесса свертывания цельной крови. Оценку процесса свертывания цельной крови производили методом низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) с помощью программно-аппаратного комплекса АРП-01М (ООО «Меднорд-Техника», Россия). Принцип действия аппарата основан на ре-

гистрации изменения сопротивления исследуемой среды резонансным колебаниям иглы-резонатора, закрепленной на пьезоэлектрическом элементе и опущенной в кювету с кровью пациента. Частоты колебаний иглы в воздухе и в жидкости поддерживаются равными автоматически. Кювету с исследуемой рекальцифицированной кровью 0,5 мл помещали в камеру термостата аппарата и приводили в соприкосновение с пробным телом датчика (иглой-резонатором) при его опускании вниз и запуске исследования.

С помощью программного обеспечения комплекса на основе полученных графических записей процесса свертывания крови рассчитывали следующие показатели: A_0 – начальный показатель агрегатного состояния крови в начальный момент времени t_0 (отн. ед.); t_1 – время контактной фазы коагуляции (мин); A_1 – амплитуда контактной фазы коагуляции (отн. ед.); ИКК – интенсивность контактной фазы коагуляции (отн. ед.); КТА – константа тромбиновой активности (отн. ед.); ВСК – время свертывания крови, (мин); ИКД – интенсивность коагуляционного драйва (отн. ед.); АПС – амплитуда полимеризации сгустка (отн. ед.); ВПС – время полимеризации сгустка (мин); ИПС – интенсивность полимеризации сгустка (отн. ед.); Т – время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка (мин); МА – максимальная амплитуда сгустка (отн. ед.); ИТС – интенсивность тотального свертывания крови (отн. ед.); ИЛРС – интенсивность лизиса и ретракции сгустка, определяется в процентах, на которые уменьшается величина амплитуды сгустка в течение 10 мин после достижения МА (%) [16].

Оценка агрегации тромбоцитов. Параметры тромбоцитарного гемостаза оценивали с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 «Биола» (ООО НПФ «Биола», Москва, Россия). Агрегация регистрировалась как традиционным методом, предложенным Борном и О'Брайеном, так и флуктуационным методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени, предложенным З. А. Габбасовым и др. [17].

С помощью анализатора АЛАТ-2 «Биола» в обогащенной тромбоцитами плазме крови оценивали число тромбоцитов и параметры спонтанной и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по Борну и по кривой среднего размера агрегатов.

По Борну степень агрегации ($CA_{\text{Борн}}$) определяется как максимальное приращение после добавления индуктора и измеряется в процентах. Скорость агрегации ($V_{\text{Борн}}$) определяется как максимальный наклон кривой и измеряется в процентах в минуту. По кривой среднего размера агрегатов степень агрегации (CA_R) определяется как максимальное значение среднего размера агрегатов после добавления индуктора и измеряется в относительных единицах. Скорость агрегации (V_R) определяется как максимальный наклон кривой среднего размера и измеряется в относительных единицах в минуту. Показатель агрегации (I_R) и ($I_{\text{Борн}}$) – значение среднего размера агрегатов или среднего приращения в заранее заданное время (2 мин) после добавления индуктора, измеряется в относительных единицах и в процентах соответственно.

Определение фибринолитической активности плазмы. Определение фибринолитической активности плазмы крови проводили стандартным методом с помощью набора «ХIIа-зависимый фибринолиз» (НПО «РЕНАМ», Россия). Тест основан на измерении времени полного лизиса эуглобулиновой фракции, полученной из плазмы крови при осаждении в кислой среде и содержащей факторы свертывания крови и фибринолиза. Из плазмы крови выделяют эуглобулиновую фракцию, содержащую плазминоген, фибриноген, факторы свертывания и не содержащую ингибиторов фибринолиза. При добавлении к этой фракции кальция хлористого образуется сгусток фибрина, который затем лизируется плазмином. Реакция активируется фактором XIIа. Время от момента образования сгустка до его растворения отражает фибринолитическую активность исследуемой плазмы крови.

Оценка активности плазминогена. Оценку активности плазминогена выполняли стандартным хромогенным методом с помощью набора «Реахром-плазминоген» (НПО «РЕНАМ», Россия). Метод определения активности плазминогена в образце плазмы основан на его способности образовывать комплекс со стрептокиназой, который гидролизует пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождаемого при этом пара-нитроанилина (pNA) прямо пропорционально активности плазминогена в образце плазмы и оценивалось по оптической плотности образца против кюветы сравнения на спектрофотометре UNICO-2100 (США) при длине волны 405 нм.

Оценка показателей коагулограммы. Оценка гемостазиологических показателей выполнялась рутинными методами лабораторной клинической диагностики с использованием автоматического анализатора гемостаза (коагулометра) ACL TOP 700 (Werfen, США). Определяли протромбиновое время (ПТВ), международное нормализованное отношение (МНО), протромбиновый индекс (ПТИ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Оценивали содержание фибриногена (по Клаусу) и D-димера (иммуноферментным методом).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы «Statistica 13.0» (StatSoft Inc., США). Данные представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентилей. Для сравнения двух выборок использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Поскольку с самого начала распространения инфекции у значительной части пациентов с тяжелым течением COVID-19 отмечено обширное внутрисосудистое свертывание крови, было предложено использовать коагуляционные тесты для оценки степени тяжести заболевания [14]. Коагулопатия при COVID-19 сходна с другими коагулопатиями, характерными для тяжелых инфекций, – такими, например, как ДВС-синдром или тромботическая микроангиопатия. Однако по клиническим и лабораторным показателям коагулопатия при COVID-19 имеет существенные от-

личия и может быть классифицирована как специфическое внутрисосудистое свертывание крови. В качестве характерных признаков в ряде исследований были предложены следующие показатели: высокий уровень D-димера (в некоторых случаях до 6-кратного превышения референтных значений) [10, 18, 19], высокое содержание фибриногена и пролонгированное протромбиновое время [14, 18]. По результатам клинических и лабораторных исследований отмечена взаимосвязь высокого уровня D-димера со смертностью пациентов с тяжелым течением COVID-19 [12]. Периодический контроль D-димера, протромбинового времени, фибриногена и числа тромбоцитов был рекомендован с целью оценки тяжести течения и эффективности терапии COVID-19.

Тромбоцитопения (от 100 до $150 \cdot 10^9$ /л) рассматривается многими авторами как один из основных прогностических критериев тяжести течения COVID-19 [18–20], в то время как в других исследованиях указывается, что тромбоцитопения не всегда характерна для данной коагулопатии [14, 21] и коагулопатия при COVID-19, наряду с признаками, характерными для развернутой фазы ДВС-синдрома в виде высокого уровня D-димера, не имеет типичных признаков потребления фибриногена и тромбоцитов (число тромбоцитов умеренно снижено, значительно повышен фибриноген) [1].

В нашем исследовании зафиксирован выраженный (6-кратный) рост уровня D-димера, повышенное содержание фибриногена и несколько удлиненное протромбиновое время в сравнении с референтными значениями (табл. 1).

Количество тромбоцитов у пациентов было на 51 % ($p < 0,05$) ниже, чем у практически здоровых лиц (табл. 2), однако тромбоцитопения в общепринятом понимании этого термина ($< 150 \cdot 10^9$ /л) зафиксировано не было. Статистически значимых различий в показателях спонтанной агрегации тромбоцитов у пациентов в сравнении со здоровым контролем не выявлено, отмечена тенденция к снижению максимальной степени агрегации, скорости агрегации и к росту показателя агрегации тромбоцитов при COVID-19 (табл. 2).

Отмечено почти полное ингибирование реактивности тромбоцитов в отношении АДФ у пациентов – максимальная степень агрегации тромбоцитов, скорость агрегации и показатель агрегации, определяемые флукуационным методом по З. А. Габбасову, были ниже, чем в группе контроля на 87,5 % ($p < 0,01$), 97,7 % ($p < 0,001$) и 74,5 % ($p < 0,01$) соответственно. Аналогичные показатели, определяемые по методу Борна, были снижены на 95,3 % ($p < 0,01$), 89,2 % ($p < 0,001$) и 95,8 % ($p < 0,01$) соответственно (табл. 2).

Такое изменение агрегационных свойств тромбоцитов может быть как следствием их гиперактивации при COVID-19, так и результатом непосредственного взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с тромбоцитами. В ряде исследований было продемонстрировано, что вирус способен связываться как с тромбоцитами, влияя на их количество и функции, так и мегакариocyтами (воздействуя на процесс кроветворения). Механизм такого взаимодействия пока не выяснен,

Таблица 1

Показатели коагулограммы (Me [Q1; Q3])

Table 1

Coagulation parameters (Me [Q1; Q3])

Показатель	Пациенты с COVID-19	Референтные значения
Фибриноген, г/л	4,48 [4,29; 4,67]	2–4
D-димер, нг/мл	3418 [3260; 3561]	< 500
ПТВ, с	17,6 [16,9; 17,9]	10–15
АЧТВ, с	36,1 [31,9; 40,5]	24–35
ПТИ, %	86,0 [78,5; 96,0]	80–120
МНО, отн. ед.	1,25 [1,18; 1,35]	0,8–1,35

Примечание: фибриноген – содержание фибриногена; D-димер – уровень D-димера; ПТВ – протромбиновое время; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ПТИ – протромбиновый индекс; МНО – международное нормализованное отношение.

Таблица 2

Число тромбоцитов и показатели агрегации тромбоцитов и фибринолитической активности плазмы (Me [Q1; Q3])

Table 2

Platelet number and platelet aggregation parameters and fibrinolytic plasma activity (Me [Q1; Q3])

Показатель	Контроль	Пациенты с COVID-19
N тр, ·10 ⁹ /л	484 [361; 609]	237 [177; 304]*
<i>Спонтанная агрегация тромбоцитов</i>		
SAR, отн. ед.	2,09 [1,55; 2,53]	1,50 [1,24; 1,80]
СА Борн, %	3,74 [3,18; 5,30]	3,00 [1,54; 5,06]
VR, отн. ед./мин	0,448 [0,285; 0,769]	0,331 [0,265; 0,826]
VBорн, %/мин	2,89 [2,75; 3,22]	2,06 [1,28; 3,74]
IR, отн. ед.	1,03 [1,01; 1,06]	1,15 [1,07; 1,27]
IBорн, %	0,648 [0,382; 0,698]	0,867 [0,456; 1,99]
<i>АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов</i>		
SAR, отн. ед.	14,4 [13,1; 15,1]	1,80 [1,62; 2,21]**
СА Борн, %	60,7 [22,5; 65,7]	2,88 [1,72; 3,12]**
VR, отн. ед./мин	42,8 [39,5; 42,8]	0,987 [0,811; 1,17]***
VBорн, %/мин	38,1 [37,0; 42,9]	4,11 [3,16; 7,69]**
IR, отн. ед.	5,95 [5,44; 6,92]	1,52 [1,28; 2,06] *
IBорн, %	50,4 [18,3; 58,5]	2,12 [1,58; 2,93]**
<i>Фибринолитическая активность плазмы</i>		
ФАП, мин	31,5 [19,8; 43,3]	270 [214; 605]***
АП, %	72,1 [61,9; 82,4]	86,0 [68,5; 98,5]*

Примечание: N тр – количество тромбоцитов; SAR – максимальная степень агрегации тромбоцитов по среднему радиусу; САБорн – максимальная степень агрегации тромбоцитов по Борну; VR – скорость агрегации по среднему радиусу; VBорн – скорость агрегации по Борну; IR – показатель агрегации по среднему радиусу; IBорн – показатель агрегации по Борну; ФАП – фибринолитическая активность плазмы крови (XIIa-зависимый фибринолиз); АП – активность пламиногена.

одними авторами высказываются предположения о вовлеченности АПФ-2-рецепторов, другими – о реализации этого процесса через АПФ2-независимый механизм и альтернативные рецепторы [22].

Кроме того, такое изменение агрегатных свойств тромбоцитов у обследуемых нами пациентов с тяжелой формой COVID-19 отчасти может быть

обусловлено применением антикоагулянтной терапии. Известно, что гепарины способны ингибировать агрегацию тромбоцитов. Парентеральное введение низкомолекулярных гепаринов в профилактических дозах (40 мг и выше эноксапарин) рекомендовано ISTH (Международным обществом по тромбозу и гемостазу) в качестве тромбопрофилактики при

Показатели свертывания цельной крови (Me [Q1; Q3])

Table 3

Parameters of whole blood clotting (Me [Q1; Q3])

Показатель	Контроль	Пациенты с COVID-19
A ₀ , отн. ед.	212 [207; 260]	283 [225; 353]*
A ₁ , отн. ед.	120 [107; 209]	235 [201; 365]**
T ₁ , мин	0,50 [0,10; 1,50]	0,40[0,10;0,95]
ИКК, отн. ед.	-13,8 [-11,6; -18,4]	0 [-7,5; 0,0]**
КТА, отн. ед.	24,4 [20,0; 32,3]	26,8 [22,4; 43,9]
ВСК, мин	13,8 [10,4; 16,4]	8,95 [3,63; 13,0]*
ИКД, отн. ед.	21,3 [16,7; 24,2]	34,7 [23,6; 38,9]*
АПС, отн. ед.	405 [393; 511]	749 [546; 846]**
ВПС, мин	20,4 [18,1; 23,9]	20,6 [14,4; 23,0]
ИПС, отн. ед.	7,20 [4,50; 7,75]	8,15 [6,00; 11,5]*
T, мин	31,2 [24,1; 51,8]	38,1 [24,7; 66,2]
МА, отн. ед.	389 [280; 475]	481 [377; 590]
ИТС, отн. ед.	13,4 [8,64; 16,1]	12,2 [9,47; 16,7]
ИЛРС, %	1,98 [1,65; 2,30]	2,46 [2,28; 2,75]*

Примечание: A₀ – начальный показатель агрегатного состояния крови; t₁ – время контактной фазы коагуляции; A₁ – амплитуда контактной фазы коагуляции; ИКК – интенсивность контактной фазы коагуляции; КТА – константа тромбиновой активности; ВСК – время свертывания крови; ИКД – интенсивность коагуляционного драйва; АПС – амплитуда полимеризации сгустка; ВПС – время полимеризации сгустка; ИПС – интенсивность полимеризации сгустка; T – время формирования фибрин-тромбоцитарной структуры сгустка; МА – максимальная амплитуда сгустка; ИТС – интенсивность тотального свертывания крови; ИЛРС – интенсивность лизиса и ретракции сгустка.

ведении пациентов с COVID-19 (кроме случаев активного кровотечения и при количестве тромбоцитов менее $25 \cdot 10^9$ /л) [23]. Кроме прямого антикоагулянтного эффекта, они еще оказывают противовирусное, противовоспалительное и цитопротекторное действие. Коагулопатия при COVID-19 играет важную роль в патогенезе тяжелого COVID-19 и требует направленной коррекции, однако, как было показано, применение только антитромботических препаратов малоэффективно, и изолированная терапия гепаринами при COVID-19 может быть недостаточна для предотвращения тромбозов [4, 9].

Существенная роль в развитии коагулопатии при тяжелой форме COVID-19 отводится и процессу фибринолиза. Вопрос о состоянии фибринолиза при COVID-19 остается открытым, одни авторы [14, 24] на основании повышенного содержания D-димера предполагают, что это обусловлено усиленным фибринолизом (легкие обладают высокой фибринолитической активностью). Другими авторами [25] зафиксировано отсутствие лизиса сгустка в течение 30 мин (при повышенном уровне D-димера) у 57 % пациентов, находившихся в отделении интенсивной терапии, с высокой степенью вероятности коррелировавшее с тромботическими осложнениями. Для объяснения этих результатов было высказано предположение, что при парадоксальном повышении уровня D-димера у таких пациентов основным источником D-димера выступают легкие при общем системном гипофибринолизе [26].

В нашем исследовании, несмотря на повышенную на 19,3 % ($p < 0,05$) активность плазминогена у пациентов с новой коронавирусной инфекцией, для лизиса сгустка потребовалось более 4 ч (табл. 2).

Эндотелий контролирует фибринолиз посредством высвобождения PAI-1. В условиях заражения SARS-CoV-2 эндотелиоциты начинают генерировать антифибринолитическое микроокружение, способствуя тромбозам [6]. Дисрегуляция фибринолиза и дисбаланс сериновых протеаз вносят свой вклад в фибринолитический дефицит у пациентов с тяжелым течением COVID-19 [12].

Исходя из того, что плазмин вовлечен в процесс захвата и репликации SARS-CoV-2, был сделан вывод о том, что ингибирование активности плазмينا может способствовать снижению риска инфицирования [24]. Однако в исследовании G. V. Moore et al. [27] было продемонстрировано, что назначение t-PA значительно улучшало дыхательную функцию SARS-CoV-2-инфицированных пациентов с острым респираторным синдромом (ОРС) за счет растворения периаальвеолярных отложений фибрина вплоть до отмены интубации. В активации тканевого активатора плазминогена t-PA участвует АПФ2, и утрата АПФ2 смещает баланс PAI-1/tPA в сторону протромботического состояния [14]. Кроме того, принудительная вентиляция легких при ОРС может приводить к повреждению легких, которое само по себе вызывает бронхолегочную коагулопатию с существенным снижением активности t-PA [28].

Анализ показателей свертывания цельной крови у пациентов с тяжелым течением COVID-19 продемонстрировал повышенную на 33,5 % ($p < 0,05$) свертываемость крови уже в начальной точке измерения (табл. 3).

О существенной активизации контактной фазы коагуляции (тромбоцитарного гемостаза) свидетельствуют повышенные в сравнении с контролем амплитуда этой фазы и ее интенсивность (А1 и ИКК) на 95,8 и 100 % ($p < 0,01$) соответственно (табл. 3). Время свертывания крови (ВСК) у пациентов было сокращено на 35,1 % ($p < 0,05$), интенсивность коагуляционного драйва (ИКД), которая характеризует в основном протеолитический этап свертывания, на 62,9 % ($p < 0,05$) превышала контрольные значения. На значительную интенсификацию полимеризационного этапа свертывания крови указывают повышенные амплитуда полимеризации сгустка (АПС), ее интенсивность (ИПС) и максимальная амплитуда сгустка (МА): на 84,9 % ($p < 0,01$), 43,5 % ($p < 0,05$) и 23,7 % ($p < 0,05$) соответственно (табл. 3).

При использовании сходного метода оценки состояния системы гемостаза (ротационной тромбоэластографии) у пациентов с COVID-19 M. G. Gönenli et al. [21] пришли к выводу о том, что тромбоэластограмма позволяет выявить коагулопатию, даже если рутинными тестами она не обнаруживается. В их исследовании выявлена корреляция параметров тромбоэластографии с другими показателями (уровнем фибриногена, D-димера, количеством тромбоцитов), изменения параметров тромбоэластографии нарастали по мере усиления тяжести течения заболевания: у пациентов с тяжелой формой COVID-19 было сокращено время формирования сгустка и повышена его максимальная устойчивость.

Показатель интенсивности лизиса и ретракции сгустка (ИЛРС) у обследуемых нами пациентов был на 23,7 % ($p < 0,05$) выше, чем в контроле (табл. 3), что в определенном смысле противоречит полученным нами данным по оценке фибринолитической активности плазмы (табл. 2). Возможно, такое противоречие обусловлено тем, что оценка фибринолитической активности плазмы включала в себя только XIIa-зависимый фибринолиз. Кроме того, на процессы лизиса и ретракции сгустка в цельной крови могут оказывать влияние клеточные элементы крови. Литическая активность в исследуемой пробе крови представляет собой интегративную составляющую плазмину, лейкоцитарных протеаз (гранулоцитарной эластазы, катепсина G, моноцитарного катепсина D, комплемента), находящуюся в данном объеме крови [16]. При определенных условиях существенное влияние на механические и физико-химические свойства сгустка могут оказывать эритроциты, изменяя структуру и свойства нитей фибрина, делая сгусток пористым, что облегчает доступ лизирующим агентам [29].

Парадоксальное ингибирование фибринолитической активности плазмы при ее изолированной оценке по тесту XIIa-зависимого фибринолиза свидетельствует о комплексном характере патогенетических механизмов коагулопатии при инфицировании SARS-CoV-2, вовлеченности клеточных компонентов

крови и сосудистой стенки в процесс патологического тромбообразования.

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование, несмотря на небольшую выборку включенных в него пациентов, продемонстрировало выраженные изменения состояния системы гемостаза у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Среди наиболее значимых отклонений от нормы нами отмечен значительный рост уровня D-димера, который, в соответствии с опубликованными данными, коррелирует с вероятностью тромботических событий, с тяжестью заболевания и со смертностью пациентов. Однако сложно судить, является такая корреляция специфической и значимой именно для COVID-19, поскольку ранее аналогичная взаимосвязь была зафиксирована и для пациентов с иными заболеваниями в критическом состоянии.

Отдельные аспекты состояния системы гемостаза, оцениваемые с использованием изолированных тестов на образцах плазмы крови, не всегда отражают реальные процессы, происходящие в цельной крови, показатели процесса свертывания цельной крови, несомненно, в большей мере отражают комплекс сложных патологических изменений и возможных компенсаторных механизмов в системе гемостаза при инфицировании SARS-CoV-2, имеющих место *in vivo*. Проблема специфической коагулопатии при COVID-19 требует дальнейшего изучения и выяснения ее механизмов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. *Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 13.1. – 2021. – С. 236. [Interim guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19). Version 13.1. 2021;236. (In Russ.)].*
2. *COVID-19 и сосудистые нарушения (обзор литературы) / Н. Н. Петрищев, О. В. Халепо, Ю. А. Вавиленкова, Т. Д. Власов // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2020;19(3):90–98. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-3-90-98. [Petrishchev NN, Khalepo OV, Vavilenkova YA, Vlasov TD. COVID-19 and vascular disorders (literature review) // Regional blood circulation and microcirculation. 2020;19(3):90–98. (In Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-3-90-98.*
3. *Shan A, Donovan K, MacHugh A, Pandey M, Aaron L, Bradbury CA, Stanworth SJ, Alikhan R, Von Kier S, Maher K, Curry N, Shapiro S, Rowland MJ, Thomas M, Mason R, Holland M, Holmes T, Ware M, Gurney S, McKechnie SR. Thrombotic and hemorrhagic complications in critically ill patients with COVID-19: a multicenter observational study // Crit Care. 2020;24(1):561. Doi: 10.1186/s13054-020-03260-3.*
4. *Ahmed S, Zimba O, Gasparyan AY. Thrombosis in Coronavirus disease 2019 (COVID-19) through the prism of Virchow's triad // Clin Rheumatol. 2020;(11):1–15. Doi: 10.1007/s10067-020-05275-1.*
5. *Giannis D, Ziogas IA, Gianni P. Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1,*

MERS-CoV and lessons from the past // *J Clin Virol.* 2020; (127):104362. Doi: 10.1016/j.jcv.2020.104362.

6. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases // *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057. Doi: 10.7150/ijbs.7502.

7. Singhania N, Bansal S, Nimmatoori DP, Ejaz AA, McCullough PA, Singhania G. Current overview on hypercoagulability in COVID-19 // *Am J Cardiovasc Drugs.* 2020; 20(5):393–403. Doi: 10.1007/s40256-020-00431-z.

8. Labò N, Ohnuki H, Tosato G. Vasculopathy and coagulopathy associated with SARS-CoV-2 infection // *Cells.* 2020; 9(7):1583. Doi: 10.3390/cells9071583.

9. Maier CL, Truong AD, Auld SC, Polly DM, Tanksley CL, Duncan A. COVID-19-associated hyperviscosity: a link between inflammation and thrombophilia? // *Lancet.* 2020;395(10239):1758–1759. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)31209-5.

10. Miesbach W, Makris M. COVID-19: Coagulopathy, Risk of Thrombosis, and the Rationale for Anticoagulation // *Clin Appl Thromb Hemost.* 2020;(26):1–7. Doi: 10.1177/1076029620938149.

11. Salamanna F, Maglio M, Landini MP, Fini M. Platelet functions and activities as potential hematologic parameters related to Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) // *Platelets.* 2020;31(5): 627–632. Doi: 10.1080/09537104.2020.1762852.

12. Kipshidze N, Dangas G, White CJ, Kipshidze N, Siddiqui F, Lattimer CR, Carter CA, Fareed J. Viral Coagulopathy in Patients With COVID-19: Treatment and Care // *Clin Appl Thromb Hemost.* 2020;(26):1–7. Doi: 10.1177/1076029620936776.

13. Chérif F, Laraba-Djebari F. Bioactive Molecules Derived from Snake Venoms with Therapeutic Potential for the Treatment of Thrombo Cardiovascular Disorders Associated with COVID 19 // *The Protein Journal.* 2021;(9):1–43. Doi: 10.1007/s10930-021-10019-4.

14. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19 // *Thromb Haemost.* 2020;(18):2103–2109. Doi: 10.1111/jth.14975.

15. COVID-19 coagulopathy: an evolving story // *Lancet Haematol.* 2020;7(6):E425. Doi: 10.1016/S2352-3026(20)30151-4.

16. Тютрин И. И., Удут В. В. Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. – Томск, 2016. – С. 170. [Tyutrin I, Udut V. Low-frequency piezothromboelastography of whole blood: algorithms of diagnostics and corrections of hemostasiological disorders. Tomsk, 2016;170. (In Russ.)].

17. Габбасов З. А., Попов Е. Г., Гаврилов И. Ю. и др. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // *Лабораторное дело.* – 1989. – Т. 10. – С. 15–18. [Gabbasov Z, Popov E, Gavrilov I et al. New high sensitive method of analysis of platelet aggregation // *Laboratornoe delo.* 1989;(10):15–18. (In Russ.)].

18. Levi M, Thachil J. Coronavirus Disease 2019 Coagulopathy: Disseminated Intravascular Coagulation and Thrombotic Microangiopathy – Either, Neither, or Both // *Semin Thromb Hemost.* 2020;46(7):781–784. Doi: 10.1055/s-0040-1712156.

19. Del Sole F, Farcomeni A, Loffredo L, Carnevale R, Menichelli D, Vicario T, Pignatelli P, Pastori D. Features of severe COVID-19: A systematic review and meta-analysis // *Eur J Clin Invest.* 2020;50(10):E13378. Doi: 10.1111/eci.13378.

20. Xu P, Zhou Q, Xu J. Mechanism of thrombocytopenia in COVID-19 patients // *Ann Hematol.* 2020;99(6):1205–12508. Doi: 10.1007/s00277-020-04019-0.

21. Gönenli MG, Komesli Z, İncir S, Yalçın Ö, Akay OM. Rotational Thromboelastometry Reveals Distinct Coagulation Profiles for Patients With COVID-19 Depending on Disease Severity // *Clin Appl Thromb Hemost.* 2021;(27):1–7. Doi: 10.1177/10760296211027653.

22. Shen S, Zhang J, Fang Y et al. (2021) SARS-CoV-2 interacts with platelets and megakaryocytes via ACE2-independent mechanism // *J Hematol Oncol.* 2021;(14):72. Doi: 10.1186/s13045-021-01082-6.

23. Thachil J, Tang N, Gando S et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19 // *J Thromb Hemost.* 2020;18(5):1023–1026. Doi: 10.1111/jth.14810.

24. Al-Kuraishy HM, Hussien NR, Al-Naimi MS, Al-Buhadily AK, Al-Gareeb AI Lungnier C. Renin–angiotensin system and fibrinolytic pathway in COVID-19: One-way skepticism // *Biomed Biotechnol Res J* 2020;(4):S33–40. Doi: 10.4103/bbrj.bbrj_105_20.

25. Wright FL, Vogler TO, Moore EE, Moore HB, Wohlauer MV, Urban S, Nydam TL, Moore PK, McIntyre Jr RC. Fibrinolysis shutdown correlates to thromboembolic events in severe COVID-19 infection // *J Am Coll Surg.* 2020;231(2):193–203. Doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2020.05.007.

26. Ibañez C, Perdomo J, Calvo A, Ferrando C, Reverter JC, Tassies D, Blas A. High D dimers and low global fibrinolysis coexist in COVID19 patients: what is going on in there? // *J Thromb Thrombolysis.* 2020:1–5. Doi: 10.1007/s11239-020-02226-0.

27. Moore HB, Barrett CD, Moore EE, McIntyre RC, Moore PK, Talmor DS et al. Is there a role for tissue plasminogen activator (tPA) as a novel treatment for refractory COVID-19 associated acute respiratory distress syndrome (ARDS)? // *J Trauma Acute Care Surg.* 2020;(20):13–19. Doi: 10.1097/TA.0000000000002694.

28. Schultz MJ, Determann RM, Royakkers AA, Wolthuis EK, Korevaar JC, Levi MM. Bronchoalveolar activation of coagulation and inhibition of fibrinolysis during ventilator-associated lung injury // *Crit Care Res Prac.* 2012;(2012):8. Doi: 10.1155/2012/961784. Article ID: 961784.

29. Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis // *J Thromb Haemost.* 2019. Doi: 10.1111/jth.14360.

Информация об авторах

Тихомирова Ирина Александровна – д-р биол. наук, профессор, зав. кафедрой медицины ФГБОУ ВО «Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского», г. Ярославль, Россия, e-mail: tikhom-irina@yandex.ru.

Рябов Михаил Михайлович – канд. мед. наук, ассистент кафедры общей хирургии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, г. Ярославль, Россия, e-mail: mihail_ryabov@mail.ru.

Authors information

Tikhomirova Irina A. – Sc. D., Professor, Head of Medicine Department, Yaroslavl State Pedagogical University named after K. D. Ushinsky, Yaroslavl, Russia, e-mail: tikhom-irina@yandex.ru.

Ryabov Mikhail M. – M. D., Ph. D., assistant at the General Surgery Department of Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia, e-mail: mihail_ryabov@mail.ru.