

На правах рукописи

Грачева Елена Сергеевна

**РОЛЬ МИКРОВЕЗИКУЛ
В РАЗВИТИИ КОАГУЛОПАТИИ ПРИ COVID-19**

3.3.3. – Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Казань – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Мустафин Ильшат Ганиевич**

Официальные оппоненты:

Брындина Ирина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ижевский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Самородов Александр Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «02» июня 2026 года в 10:00 на заседании диссертационного совета 21.2.012.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: Россия, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49) и на сайте (<https://kazangmu.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «___» _____ 202 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.012.02,

доктор медицинских наук, доцент

Радченко Ольга Рафаиловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

COVID-19 представляет собой проблему здравоохранения, одной из ключевых патогенетических особенностей которой выступает нарушение системы гемостаза в контексте концепции «иммунотромбоза», или «тромбовоспаления» (Datla U. S. et al., 2024). COVID-ассоциированная коагулопатия формируется в результате сложного взаимодействия эндотелиальной дисфункции, активации тромбоцитов, системного воспалительного ответа и образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) (M. Levi M. et al., 2023). Существенную роль в данном взаимодействии играют микровезикулы (МВ). Экспрессируя фосфатидилсерин (ФС), МВ формируют прокоагулянтную поверхность, катализируя коагуляционный каскад. (Матвиенко О.Ю. с соавт., 2024). Полученные в модели инсульта данные (Gao X. et al., 2021) позволяют предположить, что опосредованная тромбоцитарными МВ индукция НВЛ — универсальный механизм усиления тромбогенеза, который может лежать в основе коагулопатии у пациентов с COVID-19.

Несмотря на прогресс, остаются нерешёнными ключевые аспекты: количество МВ при COVID-19 в зависимости от тяжести течения, детали их взаимодействия с НВЛ, а также патогенетический вклад этих процессов в развитие как гиперкоагуляции, так и коагулопатии потребления. Разработка комплексных диагностических алгоритмов, учитывающих не только традиционные маркеры коагуляции, но и параметры микровезикуляционного звена, является насущной задачей для улучшения стратификации риска и оптимизации антикоагулянтной терапии.

Степень разработанности темы

В литературе накоплены сведения о нарушениях системы гемостаза при COVID-19, включая активацию тромбоцитарного и эндотелиального звеньев (Levi M. et al., 2023), дисфункцию фибринолиза (Whyte C.S. et al., 2022) и роль НВЛ в патогенезе иммунотромбоза (Middleton et al., 2020). МВ тромбоцитарного, лейкоцитарного и эндотелиального происхождения обладают выраженной прокоагулянтной активностью благодаря экспрессии тканевого фактора и ФС, существенно влияя на гиперкоагуляцию при COVID-19 (Guervilly C. et al., 2021).

Однако взаимосвязь количества и фенотипа МВ с параметрами гемостаза и процессом нетоза при COVID-19 изучена недостаточно. Отсутствуют клинические алгоритмы, позволяющие использовать параметры микровезикулярного пула для персонализации антикоагулянтной терапии при COVID-19. Указанные пробелы определили цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Определить роль микровезикул в развитии коагулопатии при COVID-19.

Задачи исследования

1. Провести комплексный анализ основных биохимических, коагулологических и гематологических показателей у пациентов с COVID-19 с

последующим установлением корреляций между количеством циркулирующих микровезикул и лабораторными параметрами.

2. Изучить процесс полимеризации фибрина в бестромбоцитарной плазме пациентов с COVID-19 методом динамической турбидиметрии для оценки коагулопатии.

3. Определить абсолютное количество циркулирующих микровезикул в периферической крови у пациентов с COVID-19.

4. Оценить фенотипический профиль (клеточное происхождение) микровезикул в периферической крови пациентов с COVID-19.

5. Исследовать *in vitro* параметры плазменного гемостаза методом тромбозластографии с оценкой влияния микровезикул на процесс коагуляции у пациентов с COVID-19.

6. Определить значение микровезикул в процессах тромбообразования, связанных с высвобождением нейтрофильных внеклеточных ловушек, используя методы проточной цитометрии и конфокальной микроскопии.

Научная новизна работы

Проведенная работа вносит значимый вклад в изучение патогенеза коагулопатий, ассоциированных с COVID-19 различной степени тяжести. Впервые установлена взаимосвязь тяжести течения COVID-19 и характеристики свертывающей системы пациентов: фаза гиперкоагуляции при среднетяжелом течении (укорочение лаг-фазы, ускорение полимеризации фибрина) и гипокоагуляции с коагулопатией потребления при тяжелом течении заболевания. Впервые была показана взаимосвязь МВ и НВЛ при COVID-19 - установлено, что МВ (CD15⁺, CD61⁺) инкорпорируются в структуры НВЛ, вероятно, усиливая их тромбогенный потенциал. Впервые выявлена корреляционная зависимость между уровнем циркулирующих МВ и маркерами воспаления (СРБ, ферритин) и коагуляции (Д-димер), что подтверждает их роль в патогенезе тромбовоспаления. Разработана и научно обоснована концепция «МВ-опосредованного тромбогенеза», интегрирующая ключевые патологические процессы развития коагулопатии при COVID-19. Предложены новые диагностические маркеры тромбогенного риска (МВ CD15⁺PI⁺ как маркер нетоза), создающие основу для персонализированного подхода к ведению пациентов с COVID-ассоциированными коагулопатиями.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость данного исследования заключается в существенном углублении представлений о патофизиологии нарушений гемостаза при COVID-19. Полученные результаты позволяют преодолеть упрощенное противопоставление «гипер-» и «гипокоагуляции», демонстрируя комплексный и динамический характер дисфункции системы свертывания крови. Установление закономерностей формирования парадоксального состояния, интегрирующего прокоагулянтные и геморрагические проявления, вносит вклад в развитие концепции тромбгеморрагического синдрома при тяжелых формах COVID-19. Выявленные специфические маркеры нарушений, ассоциированные с различной степенью тяжести заболевания, формируют

новую теоретическую базу для стратификации риска и прогнозирования исходов. Таким образом, работа вносит существенный вклад в развитие клинической патофизиологии, открывая перспективы для разработки более точных диагностических алгоритмов и обоснования патогенетически ориентированной терапии.

Практическая значимость работы определяется ее непосредственной направленностью на совершенствование медицинской помощи. Результаты исследования позволяют усовершенствовать алгоритм лабораторного мониторинга пациентов с COVID-19 за счет идентификации ключевых прогностических маркеров риска тромбгеморрагических осложнений. Разработанные на основе полученных данных критерии стратификации пациентов с COVID-19 создают предпосылки для персонализации антикоагулянтной терапии, позволяя дифференцированно подходить к ее назначению и дозированию в зависимости от индивидуального профиля риска. Это способствует оптимизации лечебно-профилактических мероприятий, снижению частоты тромбозных и геморрагических событий и, как следствие, улучшению клинических исходов и прогноза у данной категории пациентов. Материалы исследования имеют высокую практическую значимость и могут служить основой для доработки клинических рекомендаций по ведению пациентов с COVID-19, в частности разделов, касающихся лабораторного мониторинга коагулопатии и оценки тромботического риска, а также для создания учебно-методических материалов для образовательных циклов последипломного образования врачей по специальностям «Инфекционные болезни», «Анестезиология-реаниматология» и «Клиническая лабораторная диагностика».

Методология и методы исследования

Методологическая основа настоящего исследования базируется на применении комплекса взаимодополняющих методов, включающих клинико-лабораторное обследование, оценку параметров системы гемостаза, проточную цитофлуориметрию, динамическую турбидиметрию, тромбоэластографию (ТЭГ) и флуоресцентную лазерную сканирующую конфокальную микроскопию. В рамках реализации поставленной цели и задач был разработан пошаговый план исследования, определены объекты изучения и сформирован необходимый методический инструментарий. Интерпретация результатов осуществлена с использованием стандартных статистических методов в русле принципов доказательной медицины.

Положения, выносимые на защиту

1. Уровень циркулирующих в периферической крови микровезикул у пациентов с COVID-19 коррелирует с тяжестью течения заболевания, с маркерами воспаления, тромбообразования и может служить независимым предиктором тромботических осложнений.
2. Микровезикулы тромбоцитарного и лейкоцитарного происхождения инкорпорируются в нейтрофильные внеклеточные ловушки, увеличивая их тромбогенный потенциал.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов подтверждается репрезентативным объемом выборки (213 пациентов с COVID-19 и 20 здоровых доноров), применением современных высокоточных лабораторных методов, использованием стандартных статистических методов обработки данных с достижением уровня значимости $p < 0,05$.

Основные положения работы представлены на конференциях: Актуальные проблемы биомедицины-2023. XXIX всероссийская конференция молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 2023); Российская научно-практическая конференция «Зубаировские чтения: новое в коагулологии». «Медицинская биохимия: достижения и перспективы», посвященная 160-летию образования кафедры биохимии Казанского ГМУ (Казань, 2023); X, XII Международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы» (Казань, 2023, 2025).

Результаты исследования и практические рекомендации внедрены и используются в качестве алгоритмов и критериев в лабораторной диагностике пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом на базе ГАУЗ «РКБ МЗ РТ». Основные положения и выводы диссертационной работы используются в педагогической и научной деятельности на кафедре биохимии и клинической лабораторной диагностики, общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Публикации по теме исследования

По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов диссертационных исследований, получены 2 патента на изобретение и 4 свидетельства о государственной регистрации баз данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах печатного текста и содержит: введение, обзор литературы, главу материал и методы исследования, представление и обсуждение результатов, заключение. Работа содержит 8 таблиц и 16 рисунков, 6 приложений. Библиографический список включает 27 отечественных и 218 зарубежных источников.

Личное участие автора

Автором поставлены цель и задачи, осуществлён сбор биоматериала (венозная кровь) у пациентов, проведение всего комплекса лабораторных исследований, статистическая обработка данных и их интерпретация. Систематический анализ литературы, обобщение результатов, формулировка выводов, разработка рекомендаций и написание текстов работы выполнены самостоятельно. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол №2 от 16.02.2021), все пациенты подписали информированное согласие на участие в данной работе.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Основную когорту составили 213 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом COVID-19 (метод ПЦР), разделенных на группы по тяжести течения: среднетяжелое ($n=138$) и тяжелое ($n=75$; внутри группы дополнительно выделена подгруппа пациентов, не получавших гепаринотерапию - группа 2Нер, $n=15$). Группу контроля сформировали 20 условно здоровых доноров.

Клинико-лабораторные показатели исследованы с использованием автоматизированного оборудования: биохимия — Roche Cobas C311, гематология — Sysmex XN-1000, гемостаз — Sysmex CA-1500.

Получение бестромбоцитарной плазмы крови (БТП). Венозную кровь стабилизировали 3,2% цитратом натрия и центрифугировали дважды при 1500g 15 минут и далее при 10000g 5 минут для осаждения тромбоцитов и получения БТП.

Динамическая турбидиметрия. Для изучения параметров полимеризации фибрина использовали метод динамической турбидиметрии на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия). В кювете смешивали 400 мкл БТП и 400 мкл 0,025М раствора $CaCl_2$, инициируя процесс свертывания. Изменение оптической плотности регистрировали при длине волны 340 нм в течение 60 минут. На кинетической кривой анализировали лаг-период (Lag) — время от активации до начала роста оптической плотности, скорость полимеризации (V) — тангенс угла наклона линейного участка кривой, и максимальную оптическую плотность (Amax) в точке плато.

Тромбоэластография. Оценку влияния МВ на параметры плазменного гемостаза *in vitro* выполняли методом ТЭГ на анализаторе TEG 5000 («Haemonetics», США). В модельном эксперименте сравнивали показатели коагуляции в парных образцах: нативная БТП (контроль) и БТП того же пациента с добавлением ресуспендированных МВ (опыт). Для активации свертывания в образцы вносили 0,2 М раствор $CaCl_2$. Для нейтрализации гепарина применяли кюветы с иммобилизованной гепариназой. Анализировали параметры, отражающие исключительно плазменную коагуляцию: время реакции (R, инициация свертывания), угол α (кинетика полимеризации фибрина) и время кинетики (K, скорость формирования сгустка).

Проточно-цитометрический анализ МВ. Подсчет абсолютного количества и фенотипирование МВ проводили методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе BD FACSCanto II («BD Biosciences», США) по модифицированной методике (Iversen L.V., 2013). Популяцию МВ выделяли на основе анализа распределения частиц по прямому (FSC, размер) и боковому (SSC, гранулярность) светорассеянию в логарифмическом масштабе. Иммунофенотипирование МВ проводили с использованием панели моноклональных антител (МКАТ), меченных различными флуорохромами: CD61 (тромбоцитарные), CD15 (нейтрофильные), CD14 (моноцитарные), CD3/CD4 (Т-лимфоцитарные), CD45 (пан-лейкоцитарные) и CD62 (P-селектин).

Для выявления МВ, ассоциированных с внеклеточной ДНК, использовали двойное окрашивание с интеркалирующим красителем пропидий йодидом (PI). Обработку данных проводили в программных пакетах FACSDiva и FCS Express Research Edition.

Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

Для визуализации взаимодействия МВ с НВЛ применяли метод флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии на системе Leica TCS SP5 («Leica Microsystems», Германия). Образцы БТП окрашивали набором: ДНК-сети НВЛ визуализировали ядерным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI), а ассоциированные МВ – антителами, мечеными флуорохромами флуоресцеин изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE) и алофикоцианин (APC). Изображения получали с использованием иммерсионного объектива 20×/1.0, анализировали и обрабатывали в программном обеспечении Leica Las AF.

Методы статистического анализа. Обработка данных выполнена с применением пакетов StatTech v.4.7.2 и OriginLab 2021. Характер распределения количественных показателей оценивали с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Данные с нормальным распределением представлены как $M \pm SD$, остальные — как $Me (Q_1-Q_3)$. Для сравнения независимых групп использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни в зависимости от распределения. Связь между параметрами в группах разной степени тяжести COVID-19 анализировали с помощью непараметрического коэффициента корреляции Спирмена (ρ). Статистическую значимость устанавливали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты лабораторных исследований. В исследовании проведена оценка показателей гемостаза, гематологических и биохимических параметров с учетом тяжести течения заболевания. Установлены статистически значимые различия в показателях коагулограммы между группами пациентов и контрольной группой. У пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 по сравнению с контрольной группой здоровых доноров были выявлены статистически значимые признаки гиперкоагуляции: достоверно повышенный уровень фибриногена (медиана 4,80 г/л, межквартильный размах [IQR] 4,00–5,60; $p < 0,001$), более высокий протромбиновый индекс (ПТИ) (102,00%, IQR 88,00–113,00; $p < 0,001$) и укороченное активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) (23,50 с, IQR 22,00–25,40; $p < 0,001$). В группе с тяжелым течением заболевания, напротив, преобладали признаки гипокоагуляции: значительное снижение ПТИ (73,70%, IQR 66,50–80,75; $p < 0,001$), удлинение АЧТВ (57,15 с., IQR 40,00–86,12; $p < 0,001$), а также повышение международное нормализованное отношение (МНО) (2,60, IQR 2,32–3,58; $p < 0,001$).

Выявлены выраженные изменения воспалительных маркеров и маркера фибринолиза, нараставшие с увеличением тяжести заболевания. Уровень с-реактивного белка (СРБ) значимо повышался: в группе со среднетяжелым течением медиана составила 26,20 мг/л (IQR 11,33–62,63), а в группе с тяжелым течением — 87,40 мг/л (IQR 56,50–99,10) ($p < 0,001$). Аналогичная динамика

наблюдалась для ферритина: 225,20 нг/мл (IQR 118,25–366,52) при среднетяжелом и 315,07 нг/мл (IQR 172,00–427,82) при тяжелом течении ($p < 0,001$). Концентрация Д-димера также достоверно повышалась, достигая максимума в группе с тяжелым течением COVID-19: 0,78 мг/л (IQR 0,30–1,28) против 2,27 мг/л (IQR 1,65–5,23) ($p < 0,001$ по сравнению с контролем и между группами). Уровень лейкоцитов прогрессивно увеличивался: при среднетяжелом течении медиана $8,59 \times 10^9/\text{л}$ (IQR 5,50–11,80; $p=0,014$), а при тяжелом — $11,80 \times 10^9/\text{л}$ (IQR 9,75–16,20; $p=0,001$). Количество тромбоцитов, напротив, значимо снижалось при тяжелом течении: с $207,00 \times 10^9/\text{л}$ (IQR 178,00–298,00) в 1 группе до $139,50 \times 10^9/\text{л}$ (IQR 104,25–177,75) во 2 группе ($p < 0,001$).

Таким образом, лабораторные данные свидетельствуют о дисрегуляции системы гемостаза, которая характеризуется переходом от признаков гиперкоагуляции при среднетяжелом течении к гипокоагуляции и выраженной активации фибринолиза при тяжелых формах заболевания. Выявленные изменения коррелируют с интенсивностью системного воспалительного ответа, что подчеркивает взаимосвязь между коагулопатией и иммунными нарушениями при COVID-19.

Изучение процесса полимеризации фибрина в БТП пациентов с COVID-19. Методом динамической турбидиметрии установлено, что при среднетяжелом течении присутствуют статистически значимое сокращение лаг-периода ($3,8 \pm 1,1$ мин. против $6,2 \pm 1,2$ мин. в контроле, $p=0,0004$), увеличение скорости полимеризации фибрина ($5,44 \pm 2,47$ ед. ОП/с против $3,93 \pm 2,3$, $p=0,0013$) и снижение A_{\max} ($1,412 \pm 0,351$ ед. ОП против $1,625 \pm 0,433$, $p=0,0007$), что свидетельствует об ускоренном формировании менее плотных сгустков и повышенном тромбогенном потенциале. В группе тяжелого течения, включая пациентов без гепаринотерапии, регистрируется резкое удлинение лаг-периода ($9,4 \pm 0,8$ мин., $p < 0,0001$), снижение скорости полимеризации ($1,12 \pm 0,71$ ед. ОП/с, $p < 0,0001$) и максимальной плотности сгустка ($0,576 \pm 0,17$ ед. ОП, $p < 0,0001$), что отражает процесс нарушения фибринообразования с формированием структурно неполноценных сгустков (рисунок 1).

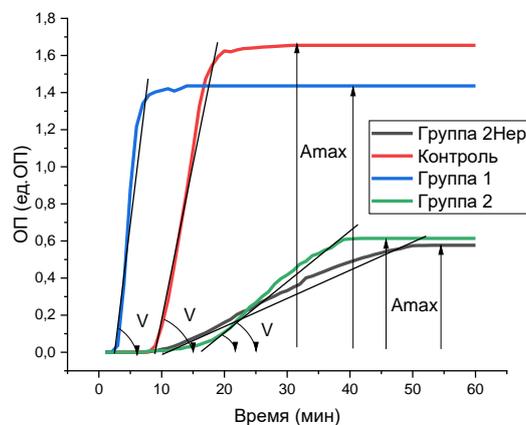


Рисунок 1 – Типичные турбидиметрические кривые, регистрирующие свертывание рекальцифицированной плазмы; группа 1 — среднетяжёлое течение; группа 2 — тяжёлое течение, пациенты отделения реанимации и

интенсивной терапии; группа 2Нер — пациенты с тяжёлым течением, не получавшие гепаринотерапию.

Полученные данные демонстрируют бифазный характер коагулопатии при COVID-19. Среднетяжелая форма характеризуется гиперкоагуляционным сдвигом, лежащим в основе высокого риска тромботических осложнений. Тяжелое течение сопровождается состоянием гипокоагуляции с нарушением полимеризации фибрина, что создает предпосылки для развития тромбогеморрагического синдрома.

Характеристика плазменного гемостаза с участием МВ пациентов с COVID-19. С помощью метода ТЭГ сравнивались показатели коагуляции в БТП нативных образцов и тех же образцов, после добавления МВ (рисунок 2).

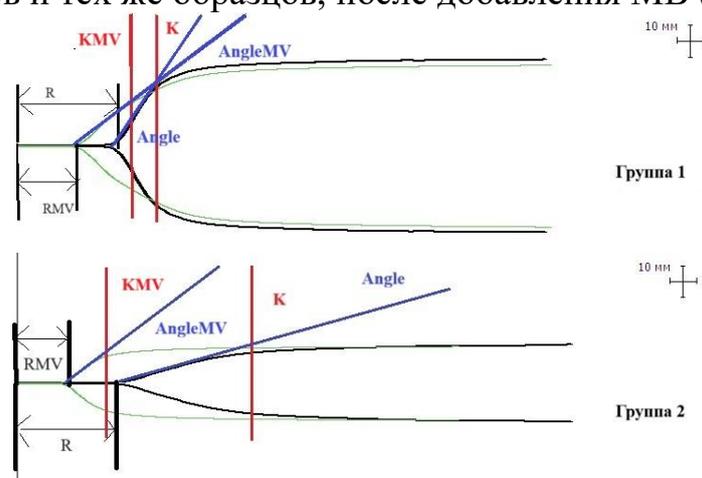


Рисунок 2 – Тромбоэластограммы, демонстрирующие влияние МВ на параметры коагуляции, типичные для каждой из исследуемых групп; Группа 1 – среднетяжелое течение COVID-19; Группа 2 – тяжелое течение COVID-19; R — время активации коагуляции нативного образца; RMV — время активации коагуляции после внесения МВ; Angle – угол альфа нативного образца, AngleMV – угол альфа после внесения МВ; K – время формирования сгустка нативного образца, KMV - время формирования сгустка после внесения МВ.

В группе пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 в нативной плазме время активации коагуляции (R) составляло $9,4 \pm 2,1$ мин (норма: 9-27 мин), что соответствует нижней границе нормы, время формирования сгустка (K) было достоверно укорочено — $1,4 \pm 0,4$ мин, а угол альфа (α), отражающий скорость полимеризации фибрина, — повышен до $68,2 \pm 4,2$. В группе пациентов с тяжелым течением в нативной плазме регистрировались выраженные признаки гипокоагуляции. Параметр R был резко удлинен до $39,3 \pm 4,5$ мин ($p < 0,05$ по сравнению с первой группой), K увеличен до $23,6 \pm 3,8$ мин, а α снижен до $12,1 \pm 1,9$.

Эксперимент по добавлению ресуспензированных МВ продемонстрировал их статистически значимый прокоагулянтный эффект в обеих группах. В группе среднетяжелого течения добавление МВ привело к укорочению R до $8,6 \pm 1,7$ мин, увеличению K до $5,2 \pm 1,3$ мин и снижению угла α до $39,7 \pm 3,5^\circ$. Наиболее выраженный корригирующий эффект наблюдался в группе тяжелого течения: после добавления МВ параметр R достоверно сократился до $13,7 \pm 1,5$ мин, K —

до $10,8 \pm 2,2$ мин, а угол α возрос до $29,4 \pm 3,4$, что существенно приблизило показатели к диапазону нормальных значений. Таким образом, выраженность прокоагулянтного действия МВ была обратно пропорциональна исходной активности плазменного гемостаза и достигала максимума в условиях исходной гипокоагуляции.

Подсчет абсолютного количества и фенотипирование МВ.

Методом проточной цитометрии установлено статистически значимое снижение общего количества МВ у пациентов с тяжелым течением COVID-19 ($3,00 \times 10^6/\text{мл}$ (IQR 1,79–4,78) по сравнению как с группой контроля ($11,17 \times 10^6/\text{мл}$ (IQR 3,62–17,19; $p=0,006$), так и с пациентами со среднетяжелым течением ($13,15 \times 10^6/\text{мл}$ (IQR 8,06–18,12; $p<0,001$).

На рисунке 3 продемонстрированы точечные диаграммы, полученные на проточном цитометре, характерные для каждой из исследуемых групп.

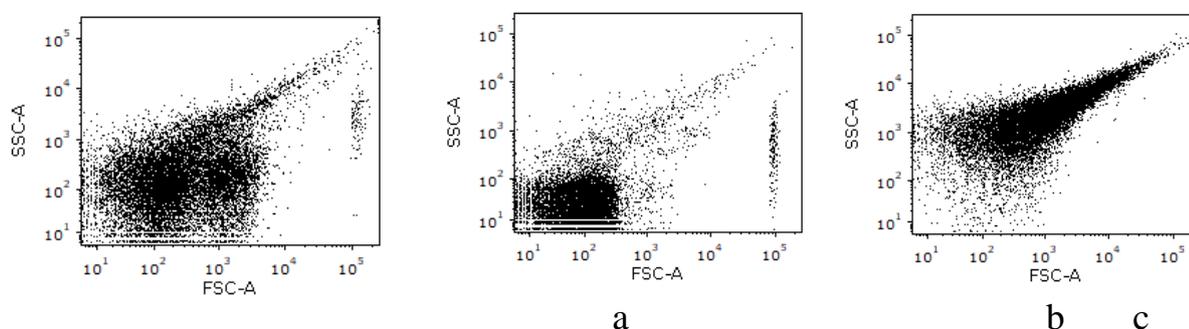


Рисунок 3 – Точечные диаграммы, типичные для каждой из исследуемых групп (а – среднетяжелое течение COVID-19, б – тяжелое течение COVID-19, в – контроль)

При анализе точечных диаграмм рассеяния в образцах был идентифицирован гейт с образованиями, не характерными для образцов здоровых доноров (рисунки 4, 5). По характеристикам светорассеяния (FSC/SSC) эти образования не соответствовали МВ, представляя собой более крупные агрегаты микрочастиц. Дальнейший фенотипический анализ проводился в пределах выделенного гейта, что позволило охарактеризовать клеточное происхождение и специфические маркеры обнаруженных агрегатов.

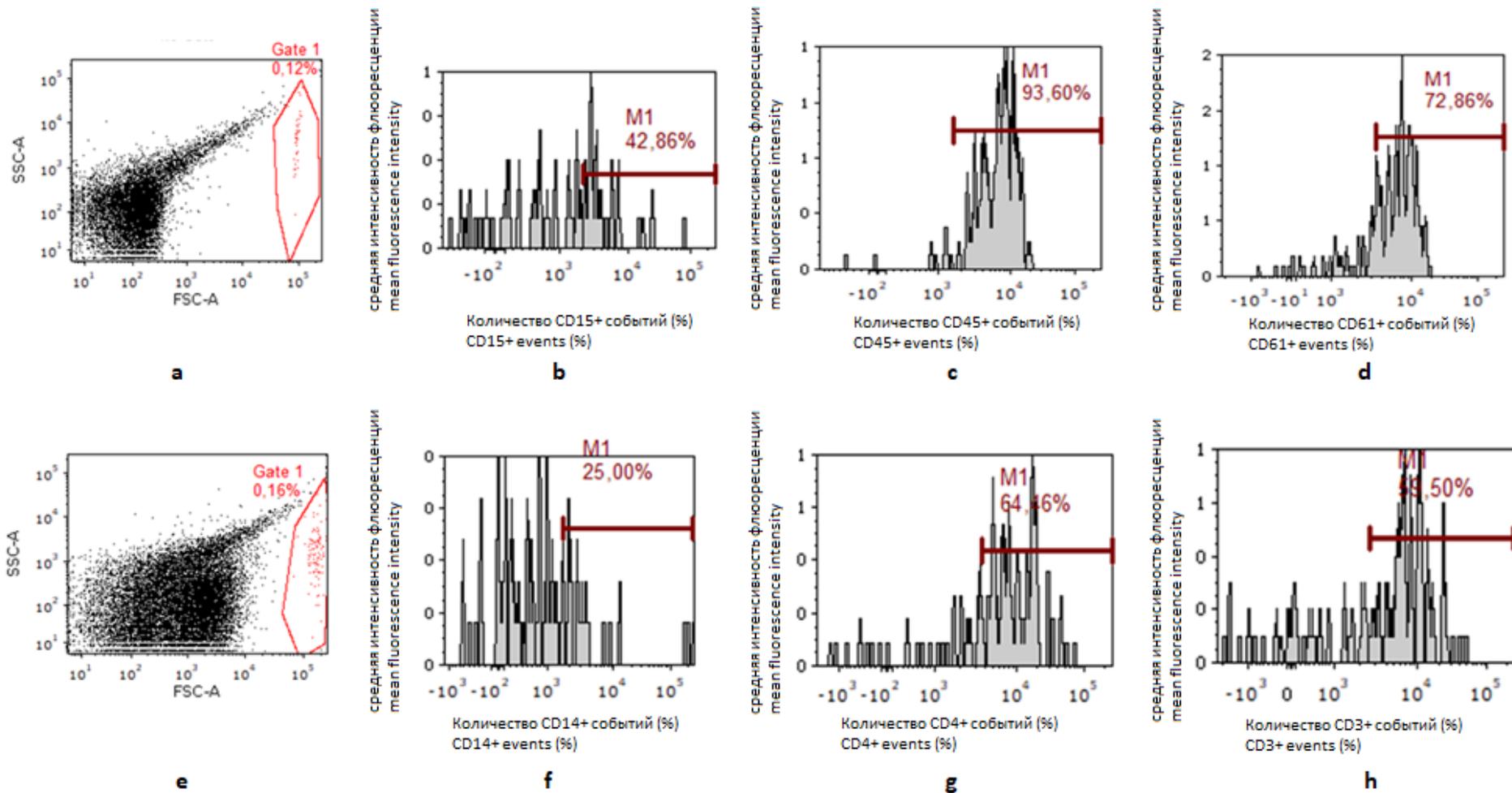


Рисунок 4 – Фенотипический профиль MB типичных для пациентов со среднетяжелым течением COVID-19: а, е — точечные диаграммы рассеяния (FSC/SSC) с наложенным аналитическим гейтом, выделяющим популяцию MB в агрегатах, цитофлюорограммы: b — маркер CD15, с — маркер CD45, d — маркер CD61, f — маркер CD14, g — маркер CD4, h — маркер CD3

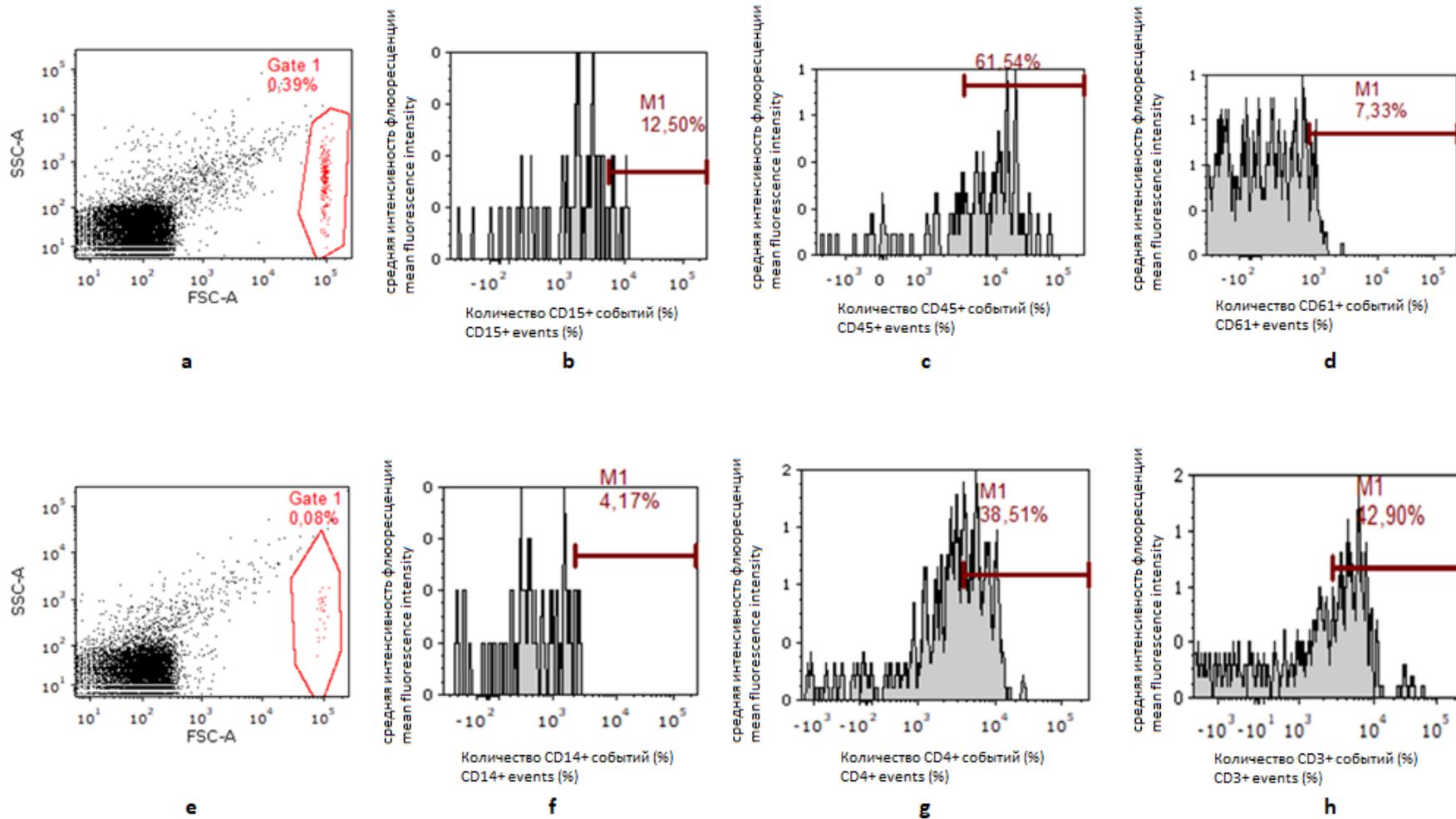


Рисунок 5 – Фенотипический профиль МВ типичных для пациентов с тяжелым течением COVID-19: а, е — точечные диаграммы рассеяния (FSC/SSC) с наложенным аналитическим гейтом, выделяющим популяцию МВ в агрегатах, цитофлюорограммы: б — маркер CD15, с — маркер CD45, д — маркер CD61, ф — маркер CD14, г — маркер CD4, h — маркер CD3

Фенотипирование с использованием панели МКАТ выявило значимые различия в клеточном происхождении МВ между группами. У пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 в агрегатах достоверно преобладали МВ, экспрессирующие маркеры: CD45⁺ (70,67±9,82%), CD15⁺ (53,34±6,92%), CD14⁺ (27,12±3,09%), CD61⁺ (59,74±11,22%) и CD62⁺ (55,98±10,11%). У пациентов с тяжелым течением отмечалось статистически значимое снижение относительного содержания агрегатов, в которых обнаруживались МВ следующих популяций: CD15⁺ (10,32 ± 4,29%), CD14⁺ (2,17 ± 1,53%), CD61⁺ (0,90 ± 6,01%) и CD62⁺ (27,26 ± 5,24%) по сравнению со среднетяжелой группой.

Относительное содержание МВ, экспрессирующих Т-лимфоцитарный маркер CD3⁺, оставалось стабильно высоким как при среднетяжелом (64,74 ± 11,24%), так и при тяжелом течении (63,33 ± 17,08%; p=0,869). На фоне общего снижения пула МВ это указывает на интенсивное образование данной субпопуляции, что согласуется с активацией апоптоза в лимфоидной ткани при COVID-19.

При двойном мечении образцов БТП МКАТ и интеркалирующим красителем PI выявлен пул частиц, несущих нуклеиновые кислоты (ДНК). Установлено, что такие ДНК-содержащие частицы имеют лимфоцитарное (CD3⁺PI⁺), тромбоцитарное (CD61⁺PI⁺) и нейтрофильное (CD15⁺PI⁺) происхождение. Их содержание было достоверно ниже в группе тяжелого течения по сравнению со среднетяжелым. Так, уровень частиц CD3⁺PI⁺ снизился с 41,67 ± 5,14% до 20,03 ± 8,21% (p=0,018). Более выраженное снижение наблюдалось для CD61⁺PI⁺: с 70,57 ± 8,49% до 19,43 ± 4,07% (p<0,001), и для CD15⁺PI⁺ МВ: с 20,33 ± 1,53% до 9,23 ± 1,07% (p<0,001).

Количественный и фенотипический анализ МВ выявил зависимость их параметров от степени тяжести заболевания. Установлено значительное снижение общего количества циркулирующих МВ у пациентов с тяжёлым течением по сравнению как со здоровыми донорами, так и с пациентами со среднетяжёлой формой. Фенотипический профиль МВ изменяется за счёт существенного уменьшения доли МВ тромбоцитарного, нейтрофильного и моноцитарного происхождения. Важным результатом является идентификация и характеристика ДНК-содержащих образований с двойной флуоресценцией (CD3⁺PI⁺, CD61⁺PI⁺, CD15⁺PI⁺), количество которых обратно коррелирует с тяжестью течения COVID-19.

Корреляционный анализ взаимосвязи абсолютного количества МВ с лабораторными показателями. Проведен корреляционный анализ для оценки взаимосвязи между количеством циркулирующих МВ и маркерами воспаления и фибринолиза. Для анализа использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена и строили линейные регрессионные модели.

При среднетяжелом течении COVID-19 выявлены статистически значимые прямые корреляции между уровнем МВ и исследуемыми маркерами:

Д-димер: обнаружена высокая прямая корреляция (ρ=0,882; p<0,001) (рисунок 6). Уравнение регрессии: $Y = 0,044X + 0,592$ (R²=0,525).

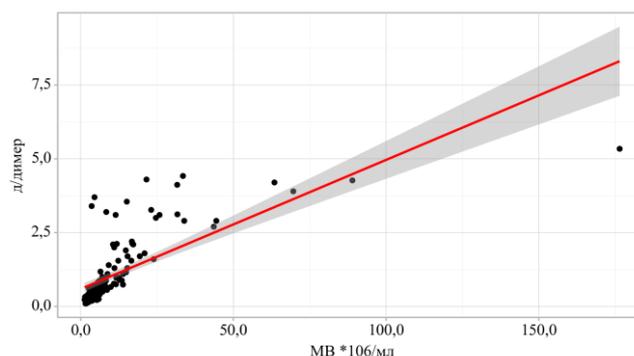


Рисунок 6 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации Д-димера у пациентов со средним течением COVID-19

СРБ: выявлена заметная прямая корреляция ($\rho=0,589$; $p<0,001$) (рисунок 7).
Уравнение регрессии: $Y = 4,97X + 56,559$ ($R^2=0,434$).

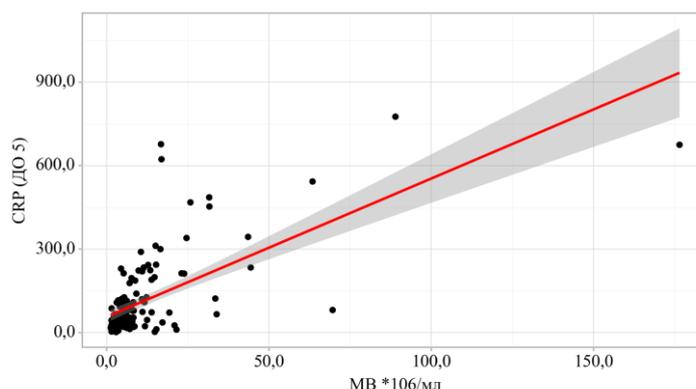


Рисунок 7 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость СРБ от абсолютного количества МВ

Ферритин: установлена умеренная прямая корреляция ($\rho=0,459$; $p<0,001$) (рисунок 8). Уравнение регрессии: $Y = 3,972X + 418,419$ ($R^2=0,102$).

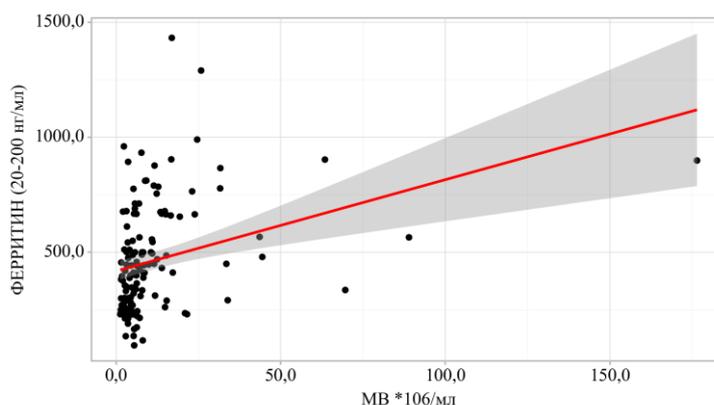


Рисунок 8 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость ферритина от абсолютного количества МВ

Таким образом, при среднетяжелом течении COVID-19 рост концентрации циркулирующих МВ ассоциирован с повышением уровней маркеров воспаления и фибринолиза.

При тяжелом течении COVID-19 обнаружены статистически значимые обратные корреляции между количеством МВ и лабораторными показателями:

Д-димер: высокая обратная корреляция ($\rho=-0,769$; $p<0,001$) (рисунок 9).
Уравнение регрессии: $Y = -0,629X + 5,777$ ($R^2=0,213$).

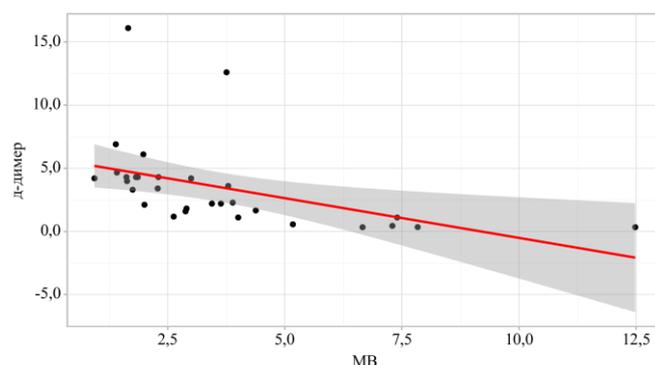


Рисунок 9 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации Д-димера у пациентов с тяжелым течением COVID-19

СРБ: высокая обратная корреляция ($\rho=-0,708$; $p<0,001$) (рисунок 10).
Уравнение регрессии: $Y = -36,665X + 320,191$ ($R^2=0,380$).

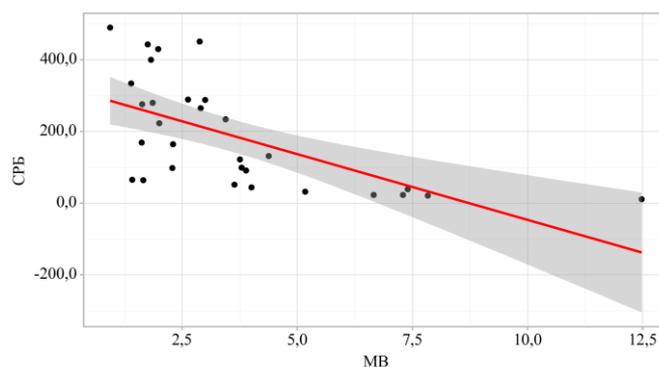


Рисунок 10 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации СРБ у пациентов с тяжелым течением COVID-19

Ферритин: заметная обратная корреляция ($\rho=-0,558$; $p=0,001$) (рисунок 11).
Уравнение регрессии: $Y = -39,687X + 468,898$ ($R^2=0,311$).

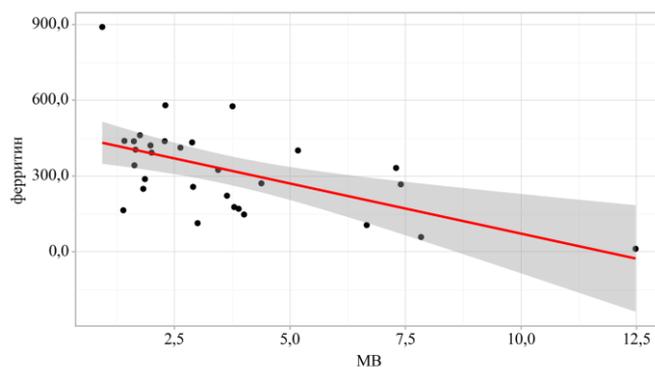


Рисунок 11 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации ферритина у пациентов с тяжелым течением COVID-19

Направление корреляционной связи между количеством МВ и основными лабораторными маркерами зависит от степени тяжести COVID-19. При среднетяжелом течении наблюдаются прямые зависимости, что может указывать на активацию микровезикулярных, воспалительных и коагуляционных процессов. При тяжелом течении, характеризующимся значительным снижением количества МВ, регистрируются обратные корреляции, что подчеркивает глубокое истощение системного пула МВ и возможное смещение патогенетических механизмов.

Визуализация структурной организации МВ и НВЛ в бестромбоцитарной плазме методом конфокальной микроскопии. У пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 обнаружены фрагменты нитеобразных структур DAPI⁺, на которых экспрессируются МВ CD15⁺ и CD13⁺ (рисунок 12). С помощью лазера, флуоресцирующего по CD62 зафиксированы скопления микрочастиц размером около 15 мкм.

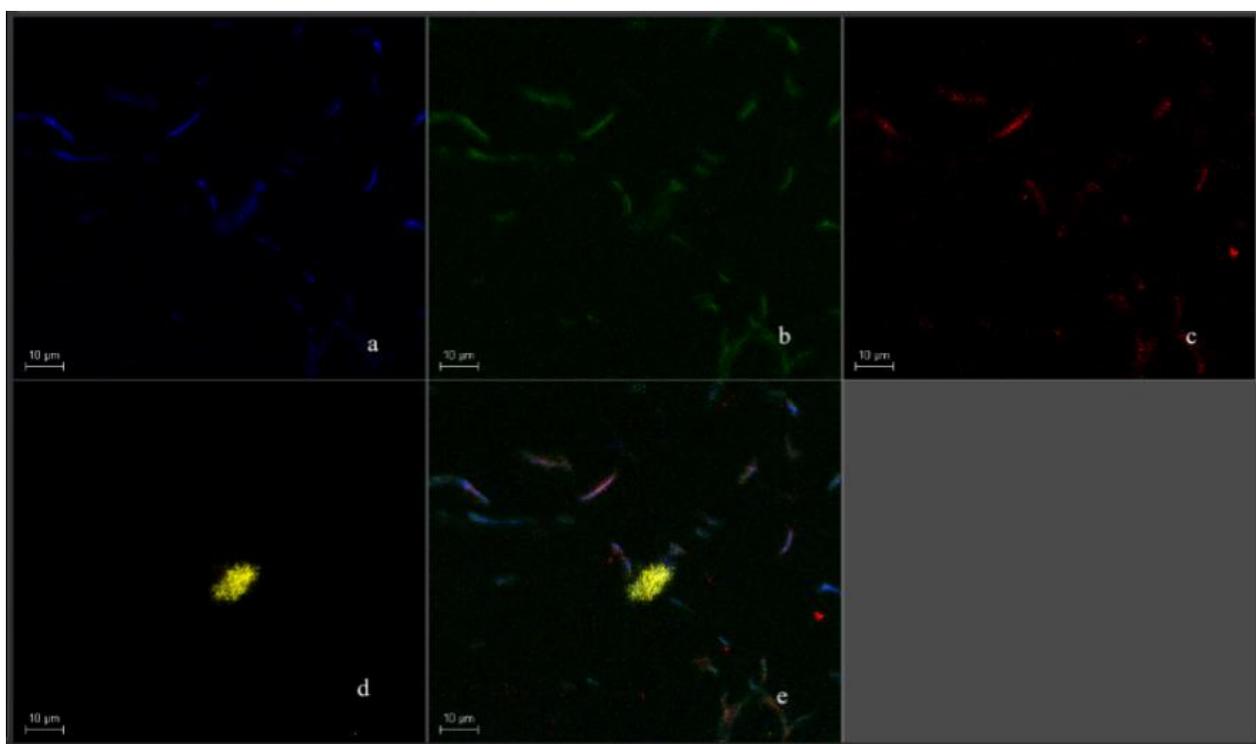


Рисунок 12 – Флуоресценция фрагментов ДНК и МВ в БТП пациентов со средним течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК DAPI⁺, b - МВ, позитивные по CD15⁺FITC, с - МВ, позитивные по CD13⁺PE, d – скопление микрочастиц, позитивных по CD62⁺APC, e – наложение четырех каналов красителей

Анализируя образцы БТП пациентов с тяжелым течением COVID-19 подобные нитеобразные структуры обнаружены в значительно меньшем количестве. В то же время, зафиксировано небольшое количество отдельно флуоресцирующих микрочастиц CD13⁺, CD15⁺ и агрегаты, одновременно флуоресцирующие по DAPI, CD13⁺, CD15⁺, CD62⁺ размером до 28 мкм (рисунок 13).

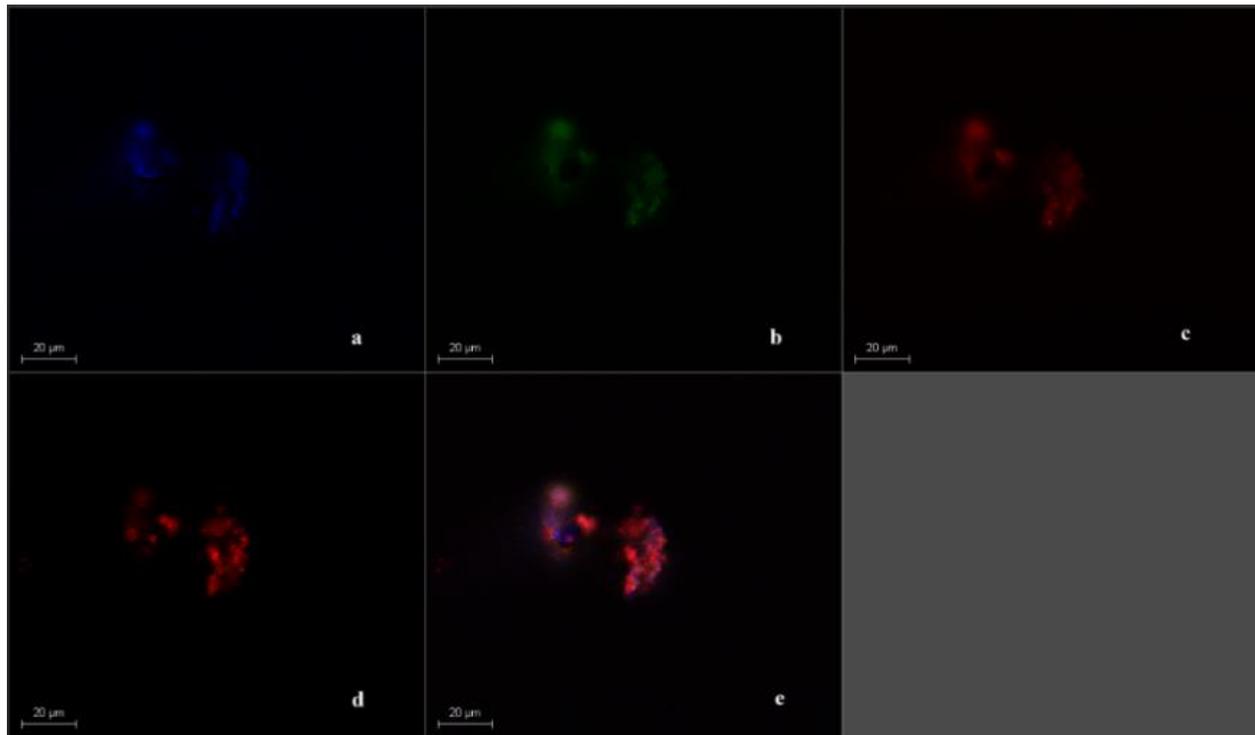


Рисунок 13 – Флуоресценция фрагментов ДНК и МВ в БТП пациентов с тяжелым течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК, окрашенные DAPI⁺, б - МВ, позитивные по CD15⁺FITC, с - МВ, позитивные по CD13⁺PE, d – скопление МВ, позитивных по CD62⁺APC, е – наложение четырех каналов красителей)

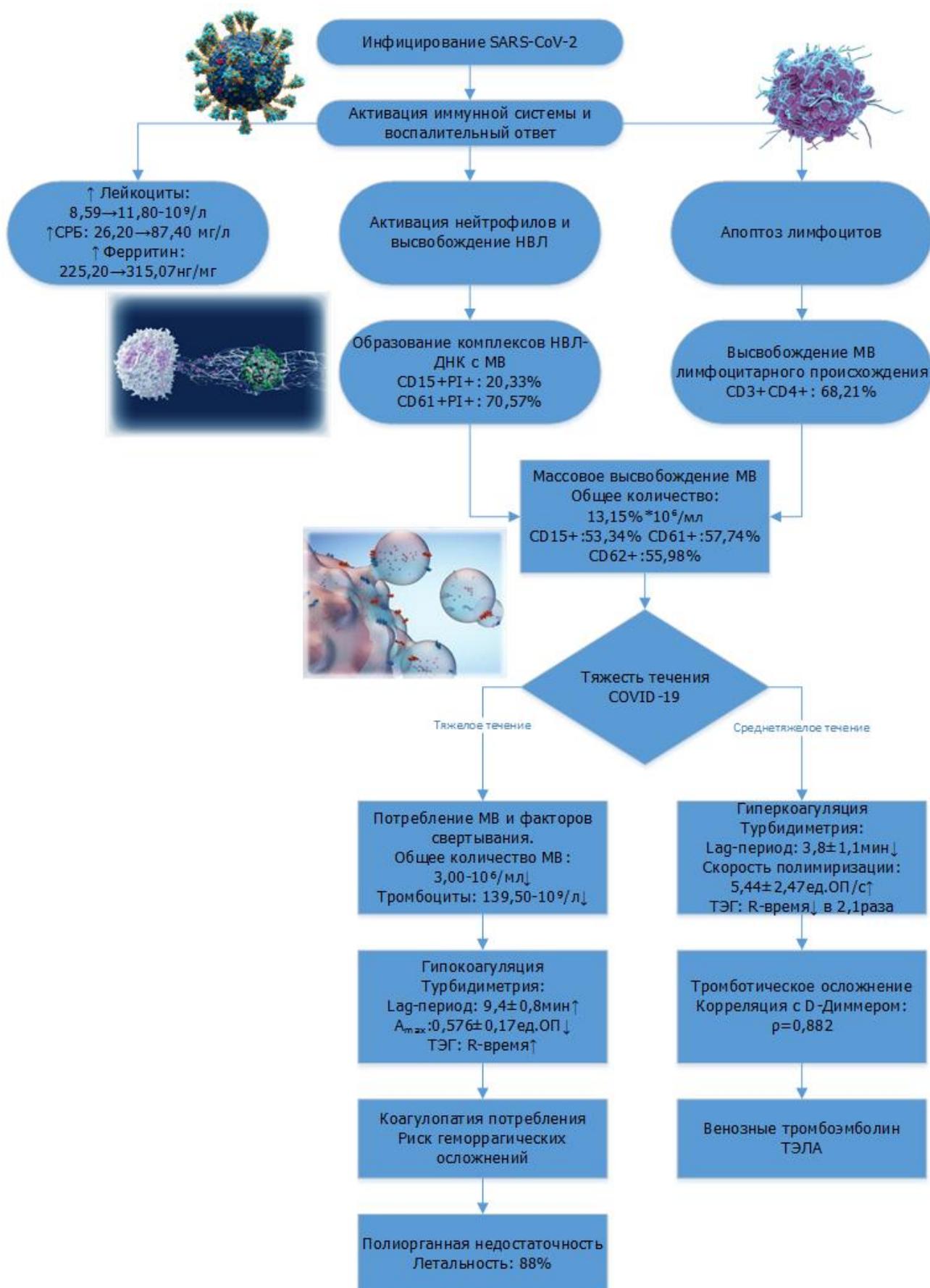


Рисунок 14 – Схема патогенеза свертывающей системы крови пациентов с COVID-19 различной степени тяжести

На основании проведенного комплексного исследования нами предложена схема патогенеза, представленная на рисунке 14, где показана зависимость и характер коагулопатии от тяжести течения COVID-19. Среднетяжелая форма заболевания ассоциирована с признаками гиперкоагуляции, характеризующимся значительным увеличением общего количества циркулирующих МВ, преимущественно тромбоцитарного (CD61⁺) и нейтрофильного (CD15⁺) происхождения, укорочением времени активации коагуляции и ускорением полимеризации фибрина. При тяжелом течении развивается коагулопатия потребления, проявляющаяся значительным снижением пула МВ, гипокоагуляцией, нарушением фибринообразования и тромбоцитопенией. Ключевым патогенетическим механизмом является интеграция прокоагулянтных МВ в структуры НВЛ с образованием комплексных агрегатов (CD61⁺PI⁺, CD15⁺PI⁺), что усиливает тромбогенный потенциал нетоза и лежит в основе иммунотромбоза. Полученные данные обосновывают необходимость дифференцированного лабораторного мониторинга параметров микровезикуляционного звена для стратификации тромботического риска и персонализации антикоагулянтной терапии у пациентов с COVID-19.

Выводы.

1. Комплексный анализ лабораторных показателей выявил наличие статистически значимых корреляционных взаимосвязей между количеством циркулирующих микровезикул и маркерами коагуляции и воспаления, что подтверждает интегральную роль микровезикул в патогенезе COVID-ассоциированных коагулопатий и системного воспалительного ответа.

2. Исследование процесса полимеризации фибрина в бестромбоцитарной плазме методом динамической турбидиметрии выявило признаки гиперкоагуляции при среднетяжелом течении COVID-19, проявляющиеся укорочением лаг-периода и увеличением скорости полимеризации, и признаки гипокоагуляции при тяжелом течении, характеризующиеся удлинением лаг-периода и снижением максимальной оптической плотности сгустка.

3. Количественный состав микровезикул в периферической крови у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 характеризуется достоверным увеличением общего количества относительно контрольной группы. При тяжелом течении COVID-19 наблюдается значительное снижение количества микровезикул, что свидетельствует об их активном потреблении в патологических процессах.

4. Преобладание частиц, позитивных по CD61 и CD15 в циркулирующем пуле, характерном для пациентов с COVID-19 является маркером активации соответствующих клеток и подтверждает роль микровезикуляции в генезе коагулопатии.

5. Оценка параметров плазменного гемостаза методом тромбоэластографии *in vitro* подтвердила прокоагулянтную активность микровезикул, проявляющуюся достоверным сокращением времени активации

коагуляции после их внесения в образцы плазмы. Данное влияние было наиболее выраженным у пациентов с исходными признаками гипокоагуляции.

6. Значение микровезикул в процессах тромбообразования, связанных с нетозом, заключается в их активной интеграции в структуры НВЛ с формированием комплексных конгломератов ДНК-PI⁺ с микровезикулами CD15⁺ и CD61⁺, что визуализировано методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии и подтверждает их участие в механизмах нетоз-ассоциированного иммунотромбоза. При тяжелом течении COVID-19 наблюдалось снижение количества таких комплексов, что может свидетельствовать об их потреблении в процессе тромбообразования.

Практические рекомендации

1. Диагностические алгоритмы.

Рекомендуется комплексный протокол оценки гемостаза при COVID-19, объединяющий: проточную цитометрию (для количественного и фенотипического анализа циркулирующих МВ, включая CD15⁺, CD61⁺ и ДНК-ассоциированные формы, динамическую турбидиметрию, стандартную коагулограмму. Интеграция этих методов обеспечивает многомерную диагностику и точную стратификацию тромботического риска.

2. Тактика ведения пациентов.

При среднетяжелой форме: мониторинг уровня и фенотипа МВ методом проточной цитометрии. Концентрация МВ $>12 \times 10^6$ /мкл или наличие ДНК-МВ комплексов указывает на высокий тромботический риск и обосновывает рассмотрение профилактической антикоагулянтной терапии.

При тяжелой форме: Ежедневный контроль динамики МВ (проточная цитометрия), маркеров коагулопатии потребления и полиорганной дисфункции. Антикоагулянтная терапия должна подбираться индивидуально на основе данных проточной цитометрии, турбидиметрии, и воспалительных маркеров для балансировки тромбогеморрагических рисков.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в ходе исследования данные о роли МВ в патогенезе COVID-ассоциированного иммунотромбоза открывают несколько фундаментальных направлений для дальнейших научных исследований. Перспективным представляется углубленное изучение долговременной динамики микровезикулярного профиля у пациентов в постковидном периоде, что позволит установить корреляцию между персистенцией изменений в системе гемостаза и отдаленным тромбогенным риском.

Особый научный и практический интерес представляет разработка таргетных терапевтических подходов, направленных на модуляцию функциональной активности МВ и их взаимодействия с НВЛ, включая оценку эффективности ингибиторов микровезикуляции, блокаторов мембранных рецепторов и ферментативных систем, регулирующих нетоз.

Важным направлением является создание интегрированной прогностической модели стратификации риска тромботических осложнений на основе комплексного анализа количества и фенотипического состава

циркулирующих МВ в сочетании с традиционными биомаркерами коагулопатии.

Перспективно внедрение результатов в персонализацию антикоагулянтной терапии с учетом микровезикулярного профиля пациента. Сравнительный анализ роли МВ при других вирус-ассоциированных коагулопатиях позволит выявить универсальные и специфические механизмы патогенеза.

Реализация этих направлений будет способствовать не только углублению понимания фундаментальных основ нарушений гемостаза при COVID-19, но и разработке новых диагностических, прогностических и терапевтических стратегий для управления тромботическими рисками.

Основные публикации по теме диссертации

1. **База данных лабораторных исследований крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2** : свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021622762 Рос. Федерация : № 2021622724 ; заявл. 25.11.2021 ; опубл. 02.12.2021 / **Е. С. Грачева**. – 1 с.

2. **База данных основных лабораторных показателей крови пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2** : свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022621506 Рос. Федерация : № 2022621350 ; заявл. 09.06.2022 ; опубл. 24.06.2022 / **Е. С. Грачева**, И. Г. Мустафин, Д. И. Абдулганиева, А. Ж. Баялиева. – 1 с.

3. **База данных проточно-цитометрического определения абсолютного количества микровезикул в бестромбоцитарной плазме у пациентов с коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2** : свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023621981 Рос. Федерация : № 2023621758 ; заявл. 09.06.2023 ; опубл. 19.06.2023 / **Е. С. Грачева**, И. Г. Мустафин. – 1 с.

4. **База данных параметров турбидиметрической кривой при исследовании полимеризации фибрина у пациентов с коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2** : свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2023620455 Рос. Федерация : № 2023620168 ; заявл. 25.01.2023 ; опубл. 02.02.2023 / **Е. С. Грачева**, И. Г. Мустафин, Ю. А. Тюрин. – 1 с.

5. **Способ оценки плазменного гемостаза** : пат. 2816538 Рос. Федерация : № 2023135671/14 ; заявл. 28.12.2023 ; опубл. 01.04.2024 / **Е. С. Грачева**, И. Г. Мустафин, Р. М. Набиуллина. – 1 с.

6. Анализ плазменного гемостаза и роли микровезикул в процессе коагуляции у пациентов с COVID-19 / **Е. С. Грачева**, Р. Р. Абдуллина, И. Г. Мустафин, Д. И. Абдулганиева // **Казанский медицинский журнал**. – 2024. – Т. 105, № 6. – С. 917–925.

7. Роль микровезикул и нетоза при коагулопатиях у пациентов с COVID-19: рандомизированное клиническое исследование / **Е. С. Грачева**, И. Г. Мустафин, Д. В. Самигуллин, Д. И. Абдулганиева // **Казанский медицинский журнал**. – 2025. – Т. 106, № 5. – С. 693–706.

8. **Способ выбора тактики ведения пациентов с COVID-19 для снижения риска тромботических осложнений** : пат. заявка № 2025116745 Рос. Федерация : № 2025116745/14 ; заявл. 18.06.2025 / **Е. С. Грачева, И. Г. Мустафин, Д. И. Абдулганиева.** – 1 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

БТП – бестромбоцитарная плазма

МВ – микровезикулы

НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки

СРБ – С-реактивный белок

ФС – фосфатидилсерин

АРС – алофикоцианин

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол (флуоресцентный краситель)

FITC – флуоресцеин изотиоцианат (флуорохром)

PE – фикоэритрин (флуорохром)

PI – пропидий йодид (интеркалирующий краситель)