

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования**

**«Казанский государственный медицинский университет»**

**Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*на правах рукописи*

**ГРАЧЕВА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА**

**РОЛЬ МИКРОВЕЗИКУЛ В РАЗВИТИИ**

**КОАГУЛОПАТИИ ПРИ COVID-19**

3.3.3 - Патологическая физиология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

**Мустафин Ильшат Ганиевич**

доктор медицинских наук, профессор

Казань - 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 АКТУАЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О НАРУШЕНИЯХ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19) (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1 Современное представление о коронавирусной инфекции COVID-19.....	16
1.2 Патогенетические механизмы нарушений системы гемостаза при COVID-19.....	20
1.3 Микровезикулы: морфофункциональная характеристика и биологическая роль.....	29
1.4 Микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала.....	33
1.5 Тромбоцитарные микровезикулы в системе гемостаза.....	36
1.6 Роль эритроцитарных микровезикул в системе гемостаза.....	38
1.7 Роль микровезикул при патологических состояниях.....	38
1.8 Оценка циркулирующих микровезикул и их прокоагулянтной активности у пациентов с COVID-19.....	41
1.9 Основные механизмы блокады микровезикулярной активности.....	43
1.10 Патогенетические особенности влияния нейтрофильных внеклеточных ловушек на нарушения свертывающей системы при COVID-19.....	44
1.11 Ингибиторы нетоза: механизмы действия и терапевтическое применение.....	46
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	49
2.1 Характеристика клинического материала.....	49
2.2 Лабораторные методы исследования.....	51
2.2.1 Стандартные лабораторные параметры.....	51
2.2.2 Метод динамической турбидиметрии.....	52
2.2.3 Метод тромбоэластографии.....	53
2.2.4 Метод проточной цитофлуорометрии.....	54
2.2.5 Метод флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.....	56
2. Методы статистического анализа.....	57
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	60
3.1 Результаты лабораторных исследований.....	60
3.2 Изучение процесса полимеризации фибрина в БТП пациентов с COVID-19.....	62
3.3 Характеристика коагуляционного (плазменного) гемостаза с участием микровезикул пациентов с COVID-19.....	64

3.4. Подсчет абсолютного количества и фенотипирование микровезикул .....	67
3.5 Корреляционный анализ взаимосвязи абсолютного количества микровезикул и основных лабораторных показателей .....	75
3.5.1 Взаимосвязь уровня циркулирующих микровезикул с маркерами воспаления и фибринолиза при среднетяжелом течении COVID-19.....	75
3.5.2 Взаимосвязь уровня циркулирующих микровезикул с маркерами воспаления и фибринолиза при тяжелом течении COVID-19 .....	80
3.6 Визуализация структурной организации микровезикул и нейтрофильных внеклеточных ловушек в бестромбоцитарной плазме методом конфокальной микроскопии.....	83
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	96
ВЫВОДЫ .....	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	101
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
СПИСОК ИЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	133
Приложение 1 – Патент № 2816538 Способ оценки плазменного гемостаза.....	137
Приложение 2 – Патент №2855677 Способ выбора тактики ведения пациентов с COVID-19 для снижения риска тромботических осложнений.....	138
Приложение 3 – Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2023620455 База данных параметров турбидиметрической кривой при исследовании полимеризации фибрина у пациентов с коронавирусной инфекцией SAR-CoV-2 .....	139
Приложение 4 – Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2023621981 База данных проточно-цитометрического определения абсолютного количества микровезикул в бестромбоцитарной плазме у пациентов коронавирусной инфекцией SAR-CoV-2 .....	140
Приложение 5 – Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2021622762 База данных лабораторных исследований крови пациентов с новой коронавирусной инфекцией SAR-CoV-2. ....	141
Приложение 6 - Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022621506 База данных лабораторных показателей крови пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции SAR-CoV-2 .....	142

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, с конца 2019 года превратилась в серьезный глобальный кризис здравоохранения. Пандемия, характеризующаяся широким спектром симптомов и серьезными последствиями для здоровья, потребовала принятия широких мер общественного здравоохранения и постоянных исследований эффективных методов лечения и вакцин [214].

Более чем 213 стран было задействовано в распространении вируса SARS-CoV-2. Около 15 миллионов подтвержденных случаев новой коронавирусной инфекции было зарегистрировано во время острого периода болезни, среди которых 600 тысяч – с летальным исходом [147].

COVID-19, вызванный вирусом SARS-CoV-2, имеет широкий клинический спектр: от бессимптомных случаев до тяжелой дыхательной и полиорганной недостаточности. К распространенным симптомам относятся жар, кашель и слабость. Это инфекционное заболевание, характеризующееся высокой контагиозностью и потенциально опасными для жизни осложнениями, включая синдром острого респираторного дистресс-синдрома [72]. Заболевание COVID-19 сопряжено со значительными трудностями в лечении и предотвращении осложнений в остром периоде и во время реабилитации. Этот фактор подчеркивает необходимость эффективных диагностических методов и вариантов лечения, которые до сих пор остаются ограниченными [190].

Одной из особенностей вируса SARS-CoV-2 стало влияние его на систему гемостаза человека, а именно нарушения, объединенные под названием «иммуотромбоз» или «тромбовоспаление» [193]. Tang N., Zhou F., Lippi G. показали, что при COVID-19 плохой прогноз и высокая летальность регистрировались у пациентов с нарушениями показателей системы гемостаза

крови [29, 57, 132]. Это свидетельствует о том, что функциональное состояние свертывающей системы существенно нарушается при данном заболевании.

Результаты общенационального когортного исследования в Швеции демонстрируют, что COVID-19 является значимым независимым фактором риска венозных тромбоэмболических осложнений. Наиболее резкое увеличение риска наблюдается в первые 30 дней после инфекции, особенно в отношении тромбоемболии легочной артерии (ТЭЛА), где риск возрастает более чем в 30 раз. Риск глубокого тромбоза вен (ГТВ) повышен до 3 месяцев, а риск ТЭЛА — до 6 месяцев после перенесенного COVID-19. Риск был наиболее выражен у пациентов с тяжелым и критическим течением заболевания [200].

Обширные микро- и макрососудистые нарушения, связанные с COVID-19 могут быть объяснены рядом явлений, которые уже были изучены ранее [59, 51]. COVID-19 сопровождается активным воспалением, а воспаление, в свою очередь, сопровождается состоянием гиперкоагуляции [27, 24, 16].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) — это паутинообразные структуры, состоящие из комплексов дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - гистон, покрытых противомикробными белками и ферментами, такими как миелопероксидаза, нейтрофильная эластаза, кателицидин, кальпротектин [156]. Их состав варьируется и зависит от раздражителя, который активирует нейтрофилы и запускает высвобождение НВЛ [150, 151]. Вирус SARS-CoV-2 инициирует образование НВЛ, которое сохраняется на протяжении всего течения заболевания, что указывает на устойчивую воспалительную реакцию. [155]. Чрезмерное высвобождение НВЛ связано с повышенным риском развития коагулопатий и иммунотромбоза [193]. Массивная активация нейтрофилов в процессе цитокинового шторма с выбросом большого количества НВЛ сопровождается неуправляемым течением процессов тромбовоспаления. Научные исследования демонстрируют наличие нейтрофилов и НВЛ как в артериальных, так и в венозных тромбах [136]. НВЛ способствуют увеличению общего объема тромба за счет удержания в своей структуре тромбоцитов и микровезикул (МВ) [45].

Экспериментальные данные моделей тромбоза, полученные на животных, свидетельствуют о том, что при субмаксимальной компрессии нижней полой вены образуются тромбы с высоким содержанием НВЛ [163]. В исследованиях с использованием лазерного повреждения сосудистой стенки у мышей было установлено, что нейтрофилы являются первыми клетками, мигрирующими в зону повреждения.

В исследовании хирургических образцов венозных тромбов человека установлено, что НВЛ с максимальной плотностью формируются не на ранней стадии тромбоза, а на стадии организации тромба. Их локализация в зонах, богатых тромбоцитами и лейкоцитами, и связь с неоваскуляризацией указывают на ключевую роль НВЛ в структурном ремоделировании тромботической массы, смещая их функцию от инициации к организации тромба. [159]. Аналогичные данные были получены при анализе артериальных тромбов у пациентов с острым инфарктом миокарда [66], ишемическим инсультом [229] и хроническими заболеваниями периферических артерий [160].

МВ – это небольшие мембранные структуры различного размера, выделяемые различными клетками, включая тромбоциты, лейкоциты, эндотелиальные клетки и эритроциты. В контексте COVID-19 эти везикулы происходят из различных клеточных источников, включая тромбоциты, эндотелиальные клетки, иммунные клетки [218]. Фосфатидилсерин (ФС), экспрессируется на везикулах, обеспечивает каталитическую поверхность для сборки факторов свертывания, способствуя образованию тромбина и фибрина [63, 54].

При COVID-19 происхождение этих МВ влияет на их прокоагулянтный потенциал. Тромбоцитарные представляют собой преобладающий тип МВ в системном кровотоке и играют значительную роль в реализации прокоагулянтной активности. Данные везикулы экспрессируют отрицательно заряженные фосфолипиды, в частности ФС, которые выступают ключевыми медиаторами процесса генерации тромбина и активации системы свертывания крови [28, 18].

Активированные тромбоциты и высвобождаемые ими МВ транспортируют ряд биологически активных медиаторов, включая антимикробные пептиды, белок высокой подвижности группы 1 (HMGB1), тромбоцитарный фактор 4 (PF4). Данные молекулы индуцируют активацию нейтрофилов, что в свою очередь стимулирует формирование НВЛ и высвобождение гистонов, играющих ключевую роль в развитии иммунотромботического ответа. [30]. Эндотелиальная дисфункция при COVID-19 ассоциирована с повышенным уровнем циркулирующих эндотелиальных МВ. Эти МВ могут переносить прокоагулянтные белки, такие как ТФ и фактор фон Виллебранда, и способствовать образованию тромбов [92]. Опубликованы исследования, доказывающие, что МВ, полученные из тромбоцитов, у пациентов с COVID-19 несут микроРНК, такие как miR-21 и let-7b, которые усиливают образование НВЛ посредством активации TLR7/8. Этот процесс включает активацию НАДФН-оксидазы и повышенную продукцию АФК, связывая МВ с обострением воспаления, связанного с НВЛ [208].

Исследование Gao X. et al. [162] установило, что МВ тромбоцитарного происхождения индуцируют образование НВЛ посредством переноса белка HMGB1, усиливая тромбоз при остром ишемическом инсульте. Это подтверждает роль МВ как одного из ключевых провоцирующих факторов в НВЛ-зависимом тромбозе.

Основной фокус современных исследований смещается в сторону изучения патогенеза отсроченных осложнений COVID-19, в частности тромботических процессов, что обусловлено их широкой распространенностью и необходимостью разработки превентивных стратегий.

### **Степень разработанности темы исследования**

Научная разработанность темы свидетельствует о продолжающемся изучении механизмов нарушений гемостаза при COVID-19, включая участие МВ. К настоящему времени установлено, что вирус SARS-CoV-2 вызывает комплексные нарушения в системе свертывания крови, приводящие к гиперкоагуляции и повышенному риску тромботических осложнений. Актуальные

данные свидетельствуют о наличии прямой корреляции между степенью тяжести течения COVID-19 и концентрацией ключевых маркеров системы коагуляции, в частности Д-димера и фибриногена. Особый интерес вызывает изучение МВ – мембранных частиц, высвобождаемых клетками крови. Важнейшим аспектом их биологической функции является способность активировать систему гемостаза посредством экспрессии тканевого фактора и присутствия фосфатидилсерина на мембранной поверхности. Параллельно активно исследуется значение НВЛ – структур, образующихся при высвобождении нейтрофилами ДНК и антимикробных белков, которые способствуют развитию иммунотромбоза. Однако, несмотря на значительный прогресс в понимании этих процессов, многие аспекты остаются недостаточно изученными. В частности, дальнейшего изучения требуют ключевые аспекты, включающие специфику межклеточных взаимодействий между МВ и НВЛ, патогенетически значимые изменения параметров микровезикулярного пула на разных стадиях заболевания, и совершенствование методологической базы для объективной оценки их роли в регуляции гемостатических процессов. Особую актуальность приобретает разработка комплексных диагностических алгоритмов, позволяющих оценивать не только отдельные показатели свертывающей системы, но и их взаимосвязи. Существующие пробелы в исследованиях обуславливают необходимость дальнейшего изучения молекулярных механизмов коагулопатии при COVID-19, что имеет важное значение для совершенствования подходов к диагностике, профилактике и лечению нарушений в системе гемостаза у пациентов с COVID-19.

### **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 маркерами воспаления и коагуляции.

2. Изучить изменение процесса 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 тромбоэластографии с оценкой влияния микровезикул на процесс коагуляции у пациентов с COVID-19 разной степени тяжести.

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<sup>+</sup>, CD61<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> как маркер нетоза), создающие основу для

персонализированного подхода к ведению пациентов с COVID-ассоциированными коагулопатиями.

### **Теоретическая значимость 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 тромбогеморрагического 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 тромбогеморрагических 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 разработана в соответствии с принципами доказательной медицины и клинико-лабораторных стандартов. Работа базируется на применении комплекса взаимодополняющих методов, включающих клинико-лабораторное обследование, оценку параметров системы гемостаза, проточную цитофлуориметрию, динамическую турбидиметрию, тромбоэластографию 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 полученных 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.

### **Личное участие**

Автором были поставлены цель и задачи исследования. Лично автором осуществлен сбор биологического материала (венозная кровь) у пациентов, включенных в исследование, с последующим проведением всего комплекса лабораторных методов, включая биохимические, коагулометрические, гематологические параметры. Автор лично осуществлял статистическую обработку и интерпретацию полученных данных, формируя базы данных и проводя сравнительный анализ. Проведение систематического анализа научной литературы, включая отечественные и зарубежные публикации, а также обобщение полученных результатов, формулировка выводов и разработка практических рекомендаций также выполнены автором лично. Текст диссертационной работы и автореферата написан автором самостоятельно.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность проведенного исследования подтверждается несколькими ключевыми факторами. Эмпирическую базу работы составила репрезентативная выборка, сформированная из 213 наблюдений пациентов с лабораторно подтвержденным COVID-19. Для проведения сравнительного анализа была организована группа контроля численностью 20 человек из когорты условно здоровых доноров. Общий объем выборки является статистически достаточным для применения современных методов математического анализа и обеспечения достоверности выводов. Все лабораторные исследования выполнялись с применением современных методов диагностики на оборудовании экспертного класса, при этом строго соблюдались протоколы ежедневного контроля качества получаемых данных.

Полученные данные характеризуются высоким уровнем статистической значимости ( $p < 0,05$ ), что служит основанием для подтверждения достоверности выявленных взаимосвязей. Кроме того, установленные закономерности демонстрируют высокую степень воспроизводимости и находятся в логическом соответствии с общепринятыми патофизиологическими моделями данного

заболевания, что является дополнительным свидетельством их валидности и биологической обоснованности. Совокупность этих факторов - адекватный объем выборки, использование высокоточной аппаратуры, статистически значимые результаты и их соответствие теоретическим ожиданиям - позволяет считать представленные данные достоверными и научно обоснованными. Положения, выносимые на защиту, подтверждены экспериментальными данными и отражены в практических рекомендациях.

Основные положения данной работы представлены и оценены участниками конференций российского и международного уровней: X Международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы». 28 Международная научно-практическая конференция молодых ученых (Казань, 2022), XIV Всероссийский научно-практический виртуальный форум «Здоровье человека в XXI веке. Качество жизни» (Казань, 2022), X международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы», посвященный 150-летию С.С. Зимницкого. 29 Международная научно-практическая конференция молодых ученых (Казань, 2023), Актуальные проблемы биомедицины-2023. Материалы XXIX всероссийской конференции молодых ученых с международным участием (Санкт-Петербург, 2023), Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье. Материалы XXVI международной медико-биологической конференции молодых исследователей (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), XI Международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы». 30-я Международная научно-практическая конференция молодых ученых (Казань, 2024), XVI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Здоровье человека в 21 веке. Качество жизни» (Казань, 2024), XVII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Здоровье человека в XXI веке. Качество жизни» (Казань, 2025), XII

Международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы». 31-я Международная научно-практическая конференция молодых ученых (Казань, 2025).

Результаты исследования и практические рекомендации внедрены и используются в качестве алгоритмов и критериев в рутинной практике лабораторной диагностики пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом на базе ГАУЗ «РКБ МЗ РТ». Основные положения и выводы диссертационной работы используются в клинической, педагогической и научной деятельности на кафедрах биохимии и клинической лабораторной диагностики, общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Диссертация апробирована на научно-проблемной комиссии «Фундаментальные медицинские и биологические науки» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (протокол № 5 от «22» января 2026 г.).

#### **Научная специальность, которой соответствует диссертация**

Диссертационное исследование соответствует шифру научной специальности 3.3.3. – Патологическая физиология как области медицинской науки, изучающей общие закономерности возникновения, развития и исходов патологических процессов, механизмы компенсации и восстановления функций организма, в частности, патофизиологические механизмы нарушений гемостаза и тромбовоспаления при COVID-19.

#### **Публикации**

Основные результаты диссертационного исследования отражены в 17 научных работах, из них 2 рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, в том числе 2 в научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus. Получено 2 патента на изобретение и 4 базы данных, зарегистрированные в Федеральной службе по интеллектуальной собственности Российской Федерации (регистрационный номер: 2816538, дата регистрации: 01.04.2024, RU 2021622762,

от 02.12.2021 г., RU 2022621506, от 24.06.2022 г., RU 2023621981, от 19.06.2023 г., RU 2023620455, от 02.02.2023 г.).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа занимает 142 страницы печатного текста. Его структура состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, представления и обсуждения результатов, заключения, списков сокращений и условных обозначений, литературы и иллюстративного материала.

Работа содержит 8 таблиц и 16 рисунков. Библиографический список включает 245 источников, 218 из которых – на английском языке.

# ГЛАВА 1 АКТУАЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О НАРУШЕНИЯХ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ (COVID-19) (АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Современное представление о коронавирусной инфекции COVID-19

С конца 2019 года пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, приобрела масштабы глобального кризиса в области здравоохранения. Заболевание характеризуется полиморфной клинической картиной и потенциально тяжелыми осложнениями, что потребовало реализации комплексных мер защиты населения, а также непрерывных научных исследований, направленных на разработку эффективных лекарственных средств и вакцин [214].

Молекулярно-генетический анализ выявил, что данный вирус имеет 82% сходство с SARS-CoV человека и 90% гомологии с коронавирусом летучих мышей SARS-CoVZXC21. На основании этих данных Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) присвоил возбудителю название SARS-CoV-2 [129, 96]. Вирус был идентифицирован методом секвенирования РНК, выделенной из эпителия дыхательных путей пациентов в Ухане [196]. Патогенез заболевания связан со способностью вируса проникать в клетки через рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), экспрессируемый в альвеолоцитах II типа, эндотелии сосудов и эпителии кишечника [206]. Ключевую роль в процессе инфицирования играет S-белок вируса, обеспечивающий связывание с клеточными рецепторами и последующее проникновение в клетку-хозяина [75].

Пандемия SARS-CoV-2 охватила более 213 стран. На пике распространения инфекции было зарегистрировано около 15 млн лабораторно подтвержденных случаев COVID-19, из которых примерно 600 тыс. завершились летальным исходом [147]. Заболевание, этиологически связанное с SARS-CoV-2, проявляется широким спектром клинических форм — от бессимптомного носительства до

жизнеугрожающих состояний, включая острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) и полиорганную недостаточность. Согласно клиническим наблюдениям, наиболее распространенными симптомами являются лихорадка (83–98% случаев), непродуктивный кашель (60–86%) и выраженная астения (35–70%). У пациентов в критическом состоянии чаще всего регистрируются ОРДС (61,1%), нарушения сердечного ритма (44,4%), циркуляторный шок (30,6%), кардиальное повреждение (22,2%) и острое почечное повреждение (8,3%) [63, 173]. Характерным дифференциальным признаком COVID-19 по сравнению с другими ОРВИ является нарушение обоняния и вкуса (15–68% случаев) [170].

Диагностика COVID-19 основана на комплексном подходе, включающем молекулярно-генетические – полимеразная цепная реакция (ПЦР), иммунологические – иммуноферментный анализ (ИФА), лучевые – компьютерная томография (КТ) органов грудной клетки и лабораторные методы [76, 132]. Особое внимание уделяется показателям коагулограммы в связи с высоким риском тромботических осложнений. Высокая контагиозность и риск тяжелых осложнений определяют эпидемиологическую значимость данной нозологии [132].

COVID-19 остается серьезной медико-социальной проблемой из-за сложностей в лечении и контроле распространения инфекции. Клиническое ведение осложняется вариабельностью течения (от бессимптомных форм до критических состояний) и отсутствием унифицированных терапевтических протоколов с доказанной эффективностью. Эпидемиологическая ситуация усугубляется высокой контагиозностью SARS-CoV-2 и его способностью к быстрой мутации, что приводит к появлению новых вариантов с повышенной трансмиссивностью.

Актуальной остается проблема дефицита надежных диагностических методов, позволяющих не только выявлять инфекцию на ранних стадиях, но и прогнозировать риск осложнений. Большинство применяемых препаратов обладают лишь симптоматическим или патогенетическим действием, тогда как специфические противовирусные средства продолжают изучаться в клинических

исследованиях. Эти обстоятельства подчеркивают необходимость разработки новых диагностических алгоритмов и терапевтических стратегий, основанных на углубленном изучении молекулярных механизмов патогенеза COVID-19 [190].

Особый научный интерес представляет воздействие вируса на систему гемостаза, проявляющееся комплексом нарушений, известных как «иммуотромбоз» или «тромбовоспаление» [70]. Клинические исследования демонстрируют взаимосвязь между нарушениями гемостаза и тяжелыми исходами COVID-19.

Исследование Tang N. et al. [29] выявило критическую взаимосвязь между коагулопатией и летальностью у пациентов с COVID-19. Было установлено, что у больных с нарушениями в системе свертывания крови уровень смертности достигал 42,5%, что в 5,7 раза превышало аналогичный показатель (7,5%) в группе пациентов с нормальными коагуляционными параметрами. Авторы идентифицировали ключевые лабораторные маркеры, обладающие высокой прогностической значимостью в отношении неблагоприятного исхода: повышение концентрации Д-димера выше 1,0 мкг/мл (отношение рисков (ОР) = 4,2; 95% доверительный интервал (ДИ): 2,1–8,3), удлинение протромбинового времени более 16 секунд (увеличение риска летальности в 3,8 раза), а также тромбоцитопения менее  $100 \times 10^9/\text{л}$ , которая оказалась наиболее значимым предиктором с ОР = 5,1 [170]. Эти данные подчеркивают важность мониторинга показателей гемостаза для стратификации риска и раннего прогнозирования исхода заболевания.

В масштабном метаанализе, проведенном Zhou P. и соавт. [57] на когорте из 15 685 пациентов, были систематизированы и количественно оценены ключевые патогенетические механизмы, лежащие в основе гиперкоагуляции при COVID-19. Согласно результатам анализа, нарушения системы гемостаза формируются по трем основным направлениям: во-первых, происходит значительная активация тромбоцитарного звена, что подтверждается повышением уровня Р-селектина в 2,3 раза; во-вторых, развивается выраженная эндотелиальная дисфункция,

характеризующаяся ростом концентрации фактора Виллебранда до 350% от нормальных значений; в-третьих, наблюдается угнетение фибринолитической активности, маркером которого служит увеличение уровня ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) на 180%. Таким образом, метаанализ демонстрирует комплексный характер коагулопатии, интегрирующий клеточные, сосудистые и плазменные компоненты нарушения гемостаза.

В систематическом обзоре Lipri G. и соавт. [133] патогенез иммунотромбоза при COVID-19 представлен как последовательный трехэтапный процесс. Исходным звеном является развитие генерализованной эндотелиальной дисфункции, обусловленной комбинированным действием прямого цитопатического эффекта вируса SARS-CoV-2 и запущенного им системного воспалительного ответа. Следующим этапом становится активация внешнего пути свертывания крови, которая инициируется вследствие экспрессии тканевого фактора на поверхности поврежденного эндотелия и активированных моноцитов. Кульминацией описанного каскада является формирование распространенных микротромбов, преимущественно в сосудах малого калибра, что происходит на фоне персистирующей воспалительной реакции и приводит к нарушению микроциркуляции и полиорганной дисфункции [133].

Проспективное когортное исследование Helms J. и соавт. (2020) показало, что у пациентов с тяжелой формой COVID-19 в отделениях интенсивной терапии сохраняется исключительно высокий риск тромбозов. Авторы сообщают о частоте тромботических событий 28.7%, включая 16.7% случаев венозных тромбоэмболий, несмотря на антикоагулянтную профилактическую терапию. Было выявлено, что повышенный уровень Д-димера при поступлении ( $>2590$  нг/мл) служит независимым прогностическим маркером данного риска. Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что стандартных доз антикоагулянтов может быть недостаточно для подавления коагулопатии при критическом течении COVID-19, что обосновывает необходимость индивидуализации тромбопрофилактики на основе альтернативных биомаркеров [115].

На сегодняшний день научное сообщество продолжает активное изучение в трех ключевых направлениях: геномная эволюция SARS-CoV-2, оптимизация терапевтических протоколов и совершенствование стратегий вакцинопрофилактики [90]. Особую озабоченность вызывает проблема отсроченных осложнений у пациентов, перенесших COVID-19. Многоцентровые исследования демонстрируют значительное увеличение риска тромботических событий в постковидном периоде: частота венозных тромбоэмболий достигает 8,9% в течение 6 месяцев после острой фазы заболевания (HR=2,85; 95% ДИ:2,47-3,29) [200], тогда как риск артериальных тромбозов возрастает в 2,1 раза ( $p<0,001$ ) [135]. Эти данные подчеркивают необходимость разработки пролонгированных схем антикоагулянтной терапии для всех групп пациентов.

Не менее актуальной остается проблема появления новых генетических вариантов вируса, обладающих свойствами «иммунной мутации» (ХВВ.1.5, ВА.2.86) [90], что требует постоянного мониторинга их антигенных характеристик и своевременной корректировки вакцинного состава. Эпидемиологические исследования свидетельствуют о развитии постковидного синдрома у 10-30% переболевших [134], причем патогенетические механизмы этого состояния остаются предметом активного изучения.

## **1.2 Патогенетические механизмы нарушений системы гемостаза при COVID-19**

COVID-19 представляет собой системное заболевание с выраженными провоспалительными и протромботическими эффектами, патогенез которого отличается уникальными особенностями по сравнению с другими вирусными инфекциями [36].

Ключевыми патогенетическими механизмами являются повреждение эндотелиальных клеток, развитие васкулита, нарушения реологических свойств крови, а также активация каскада свертывания с образованием МВ, формирующих замкнутый круг прогрессирующего эндотелиального повреждения и

тромбообразования [36]. Повреждение эндотелия при COVID-19 проявляется развитием эндотелиита и некроза вследствие взаимодействия S-белка с ACE2 [36]. Повреждение эндотелия приводит к активации тромбоцитов и массивному выбросу в системный кровоток провоспалительных цитокинов (Интерлейкин 6 (IL-6), фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) и вазоактивных медиаторов. Эти вещества дополнительно усугубляют эндотелиальную дисфункцию, формируя замкнутый круг патологических изменений. Особую роль в патогенезе тяжелых форм играет цитокиновый шторм, характеризующийся значительным повышением провоспалительных медиаторов (IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), что усугубляет эндотелиальную дисфункцию и способствует развитию жизнеугрожающих осложнений [36].

Клинические исследования подтверждают широкую распространенность коагулопатии у пациентов с COVID-19, обнаруживая нарушения гемостаза у 60,6% пациентов с тяжелым течением, степень которых по шкале ISTH достоверно коррелирует с риском осложнений [173]. Патогномоничные изменения коагуляционного профиля включают повышение фибриногена, Д-димера и тканевого активатора плазминогена на фоне снижения растворимых комплексов мономеров фибрина и антитромбина [39]. Особое прогностическое значение имеет динамика Д-димера, где его повышенные показатели в дебюте ассоциированы с увеличением летальности, а прогрессирующий рост служит маркером развивающейся полиорганной недостаточности [39]. Эти данные подтверждают необходимость тщательного мониторинга показателей гемостаза на всех этапах заболевания, что позволяет своевременно корректировать терапевтическую тактику и улучшать клинические исходы.

Согласно данным научных публикаций, у пациентов с COVID-19 регистрируются многоуровневые изменения коагуляционного гемостаза, характеризующиеся увеличением протромбинового времени, повышением концентрации фактора фон Виллебранда и фактора VIII, удлинением активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), а также

количественными и качественными изменениями тромбоцитарного звена [212]. Патогенетической основой является первичное повреждение эндотелия с нарушением фибринолитической активности, создающее уникальное сочетание признаков гиперкоагуляции и активации фибринолиза [212]. Эти изменения могут сохраняться длительно после клинического выздоровления, требуя продолжения мониторинга показателей свертываемости [72]. В отличие от классических коагулопатий, при COVID-19 наблюдается уникальное сочетание признаков гиперкоагуляции и активации фибринолиза, что создает предпосылки для развития как тромботических, так и геморрагических осложнений. Описанные особенности объясняют сложности в подборе адекватной антикоагулянтной терапии и необходимость индивидуального подхода к каждому пациенту [58].

Анализ данных пациентов за 2020-2021 годы подтверждает, что выраженность коагулопатии при COVID-19 коррелирует с тяжестью течения заболевания и является важным прогностическим фактором [87]. При этом характерные изменения в системе гемостаза могут сохраняться длительное время после клинического выздоровления, что требует продолжения мониторинга показателей свертываемости крови даже в реабилитационном периоде [58].

Патогенез нарушений системы гемостаза при COVID-19 характеризуется сложным взаимодействием множества механизмов. Как показали Kot L. и соавторы (2023), ключевую роль в этом процессе играет дисрегуляция ренин-ангиотензиновой системы (РАС), возникающая в результате взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) [174]. Это взаимодействие приводит к нарушению баланса между провоспалительными (ангиотензин II) и противовоспалительными (ангиотензин 1-7) компонентами РАС, что создает предпосылки для развития системного воспаления.

Нарушения гемостаза при COVID-19 представляют собой сложный патофизиологический процесс, основанный на взаимодействии вируса с системой свертывания крови, где ключевым механизмом является системная воспалительная реакция, приводящая к цитокиновому шторму, эндотелиальной дисфункции и

активации нейтрофилов с образованием НВЛ [5]. Эти изменения, наряду с дисрегуляцией фибринолитической системы (повышение уровня ингибитора активатора плазминогена-1 — PAI-1), формируют выраженное протромботическое состояние, характерное для COVID-19-ассоциированной коагулопатии [60]. Лабораторным отражением данной гиперкоагуляции является значимое повышение уровней Д-димера, продуктов деградации фибриногена, а также других маркеров тромбин-опосредованной активации свертывания [58].

Патогенетическое значение НВЛ заключается в их способности активировать каскад коагуляции через несколько механизмов: прямое повреждение эндотелия компонентами НВЛ (гистонами и нейтрофильной эластазой), создание поверхности для сборки прокоагулянтных комплексов и взаимодействие с системой комплемента [112]. Коагулопатии при COVID-19 характеризуются выраженным усилением нетоза и активации комплемента, приводя к глубокой дисрегуляции тромбовоспалительных реакций с повышением маркеров свертываемости (Д-димер, фибриноген) и увеличением тромбогенного потенциала [235]. Данные изменения имеют специфические особенности, отличающие COVID-19 от других респираторных инфекций, включая более выраженную активацию НВЛ и более значительное повышение маркеров гиперкоагуляции, коррелирующее с тяжестью течения [157].

Феномен нетоза является важным патогенетическим звеном. Как отмечают исследователи, эти структуры не только способствуют микротромбообразованию, но и дополнительно повреждают эндотелий, усугубляя системное воспаление [5, 169]. Параллельно наблюдаются изменения в системе комплемента, что дополнительно усиливает тромботическую активность. Клинически эти нарушения проявляются частыми тромботическими осложнениями, включая легочную эмболию (до 23%), цереброваскулярные события (до 5%) и инфаркты миокарда (до 8%) [169].

Подходы к коррекции этих нарушений, по мнению экспертов, должны включать не только антикоагулянтную терапию, но и мероприятия, направленные

на защиту эндотелия, контроль системного воспаления и подавление избыточной активности нейтрофилов [5]. Особое значение приобретает персонализированный подход к лечению с учетом индивидуального профиля риска каждого пациента.

P-селектин играет одну из ключевых ролей в патогенезе коагулопатии при COVID-19, выступая важным медиатором взаимодействия между активированными тромбоцитами, поврежденным эндотелием и системой гемостаза. При COVID-19 наблюдается значительное повышение уровня P-селектина, что способствует усилению адгезии тромбоцитов к поврежденному эндотелию и их последующей агрегации, формируя основу для развития микротромбозов [109]. Важным аспектом патогенеза является формирование антифосфолипидных антител, которые не только потенцируют прокоагулянтную активность, но и способствуют развитию резистентности к антикоагулянтной терапии [85]. При этом P-селектин выступает связующим звеном между активацией тромбоцитов и системным воспалением, когда воспалительные медиаторы стимулируют экспрессию адгезивных молекул, а последние, в свою очередь, усиливают воспалительный ответ [106]. Клинически эти изменения проявляются высокой частотой тромботических осложнений, особенно у пациентов с тяжелыми формами заболевания. Комбинация повышенного уровня P-селектина с другими маркерами коагулопатии представляет значимый прогностический инструмент, позволяющий осуществлять раннюю идентификацию пациентов с повышенным тромботическим риском и разрабатывать персонализированные стратегии антикоагулянтной терапии [104, 109].

COVID-ассоциированная коагулопатия характеризуется формированием патологического состояния, имеющего фенотипическое сходство с классическим диссеминированным внутрисосудистым свертыванием, однако патогенетически отличающегося рядом принципиальных особенностей. Характерен специфический дисбаланс в системе гемостаза, проявляющийся сохранением количественных показателей тромбоцитов в пределах физиологической нормы при одновременном

значительном возрастании концентрации фибриногена и выраженном доминировании прокоагулянтных процессов над геморрагическими событиями. Это состояние отражает уникальность патогенеза COVID-ассоциированной коагулопатии, где активация плазменного звена свертывания крови развивается раньше, чем возникают значимые изменения в тромбоцитарном звене, создавая преимущественно протромботический фон в среднетяжелом течении заболевания. Риск тромботических событий сохраняется в течение нескольких недель после клинического выздоровления [1]. Данные изменения требуют тщательного мониторинга показателей гемостаза и индивидуального подхода к антикоагулянтной терапии.

В исследовании Askermann M. et al. (2020), посредством сравнительного гистопатологического анализа легких пациентов, скончавшихся от COVID-19, и контрольной группы, включая лиц, погибших от гриппа А (H1N1), и здоровых доноров органов, была установлена принципиальная патогенетическая особенность тяжелой формы COVID-19, заключающаяся в тотальном поражении сосудистого русла. Ключевыми патоморфологическими маркерами были идентифицированы диффузный эндотелиит, характеризующийся инфильтрацией воспалительными клетками и признаками апоптоза, что обусловило дисфункцию эндотелия, распространенный тромбоз с образованием микротромбов, количество которых статистически значимо в 9 раз превышало аналогичный показатель при гриппе, а также патологический ангиогенез с достоверным увеличением в 2–3 раза числа новообразованных сосудов по механизму интусусцептивного ангиогенеза. Совокупность этих процессов — эндотелиальной дисфункции, обтурации микроциркуляторного русла и формирования неполноценных сосудистых структур — является патофизиологической основой тяжелой дыхательной недостаточности и протромботического состояния при COVID-19, что подтверждает необходимость таргетной терапии, направленной на стабилизацию эндотелия, антикоагулянтную и противовоспалительную защиту [192]. Важно отметить, что описанные изменения носят генерализованный характер и способствуют развитию

микротромбозов в различных органах, нарушению микроциркуляции, полиорганной дисфункции [110].

Наряду с активацией коагуляции, существенные изменения претерпевает система фибринолиза, что приводит к дисбалансу между образованием и разрушением фибриновых сгустков. Нарушение процесса фибринолиза вносит значительный вклад в развитие тромбоэмболических осложнений при COVID-19. У пациентов с тяжелым течением COVID-19 зафиксировано значительное увеличение концентрации PAI-1. Поскольку PAI-1 является основным физиологическим ингибитором тканевого активатора плазминогена (tPA) и урокиназы, его повышение закономерно приводит к подавлению фибринолитической активности. Исследование Whyte C.S. и соавторов (2022) показало, что уровень PAI-1 коррелирует с тяжестью течения COVID-19 и может служить предиктором неблагоприятного исхода. У пациентов с уровнем PAI-1 > 200 нг/мл риск развития тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) увеличивался в 3,8 раза [225]. Нарушение баланса между tPA и PAI-1 является ключевым механизмом подавления фибринолиза при COVID-19. Goshua G. et al. (2020) в своей работе также подтвердили снижение фибринолитической активности, обусловленное увеличением соотношения PAI-1/tPA [89].

Исследования *in vitro* демонстрируют, что фибриновые сгустки, образующиеся у пациентов с COVID-19, обладают повышенной устойчивостью к лизису. В работе Wright F.L. et al. (2020) было показано, что фибриновые сгустки пациентов с COVID-19 характеризуются измененной структурой с уменьшенной пористостью и повышенной плотностью волокон, что затрудняет их разрушение плазмином [97]. Helms J. et al. (2020) продемонстрировали, что у пациентов с COVID-19 в отделениях интенсивной терапии отмечается выраженный гипофибринолизис, ассоциированный с повышенной частотой тромбозов [152]. Данное состояние тесно связано с системным воспалительным ответом при COVID-19. Исследование Foley J. H. et al. (2021) показало, что уровень PAI-1 положительно коррелирует с концентрацией IL-6 и других провоспалительных

цитокинов, что указывает на взаимосвязь между цитокиновым штормом и подавлением фибринолиза [100].

Согласно данным, представленным Nougier С. и соавт. (2020), применение ротационной тромбоэластометрии (ROTEM) с добавлением активаторов фибринолиза обладает значительной диагностической ценностью для выявления гипофибринолиза у пациентов с COVID-19 [117].

Маркеры нарушения фибринолиза обладают прогностической ценностью в отношении тяжести течения и исхода COVID-19. Ranucci M. et al. (2020) в своей работе показали, что снижение фибринолитического ответа, оцениваемое по тромбоэластографии, ассоциировано с повышенной смертностью у пациентов с COVID-19 [222].

Эффективность тромболитической терапии при тяжелых формах COVID-19 остается предметом научной дискуссии, что подтверждается противоречивыми клиническими данными. Мета-анализы рандомизированных исследований демонстрируют статистически неоднозначные результаты относительно влияния тромболитиков на выживаемость пациентов с COVID-ассоциированным острым респираторным дистресс-синдромом. В исследовании Wang С. et al. (2020) была продемонстрирована потенциальная эффективность низких доз тканевого активатора плазминогена у пациентов с COVID-19 и тяжелым ОРДС, однако вопрос безопасности такой терапии требует дальнейшего изучения [230].

Клиническая картина COVID-ассоциированной коагулопатии включает высокую частоту тромбоэмболических осложнений, среди которых особое значение имеют тромбоэмболия легочной артерии, острый инфаркт миокарда и ишемические поражения головного мозга. Важно отметить, что эти жизнеугрожающие состояния нередко развиваются даже на фоне проводимой антикоагулянтной профилактики, что свидетельствует о необходимости пересмотра существующих подходов к тромбопрофилактике у данной категории пациентов [121].

Перспективным направлением является разработка терапевтических подходов, направленных на снижение активности PAI-1. Потенциал применения ингибиторов PAI-1 продолжает изучаться в рамках доклинических испытаний, тогда как оценка их эффективности и безопасности у пациентов с COVID-19 остается на этапе первоначального накопления клинических данных. В противовес первоначальной концепции, акцентировавшей исключительно состояние гиперкоагуляции, современные данные, подтвержденные в том числе исследованием Любушкиной А.В. с соавт. (2023), свидетельствуют о двойном характере нарушений гемостаза. У пациентов с тяжелыми формами заболевания наблюдается парадоксальное сочетание прокоагулянтных и геморрагических проявлений, что отражает глубину патологических изменений в системе гемостаза. Авторы выявляют специфические маркеры дисфункции гемостаза, характерные для различных форм течения инфекции — от легкой до тяжелой, что имеет ключевое значение для прогнозирования тромботических осложнений. Результаты работы подчеркивают необходимость дифференцированного подхода к назначению антикоагулянтной терапии, основанного на оценке индивидуального риска нарушений свертывающей системы крови у конкретного пациента [12].

Лабораторные исследования выявляют значительные изменения коагулограммы: повышение уровня тромбоцитов и фибриногена, увеличение международного нормализованного отношения (МНО) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), а также снижение протромбинового индекса (ПТИ). Эти изменения свидетельствуют о глубокой дисрегуляции системы гемостаза, затрагивающей как клеточное, так и плазменное звено свертывания крови. Патогенетически эти нарушения связаны с одновременной активацией прокоагулянтных механизмов и истощением антикоагулянтных резервов организма. Результатом становится нарушение микроциркуляции с развитием как тромботических, так и геморрагических осложнений, выраженность которых коррелирует с тяжестью течения COVID-19 [216].

Выявленные патофизиологические особенности объясняют высокую частоту тромботических и геморрагических осложнений и обосновывают необходимость разработки дифференцированных подходов к антикоагулянтной терапии с учетом тяжести течения заболевания [43].

### **1.3 Микровезикулы: морфофункциональная характеристика и биологическая роль**

МВ представляют собой гетерогенную популяцию мембранных частиц, средний диаметр которых составляет 300 нм, а объем — 0,01413 мкм<sup>3</sup>. Эти структуры образуются в результате отщепления от плазматической мембраны различных клеток, включая тромбоциты, лейкоциты и эндотелиальные клетки, при их активации или апоптозе. В норме у здоровых людей концентрация циркулирующих МВ варьирует в пределах от 200 000 до 358 000 частиц на миллилитр крови [8].

Биохимический состав МВ отражает их клеточное происхождение, поскольку они содержат специфические мембранные рецепторы, гликопротеины и цитоплазматические компоненты родительских клеток [225, 181]. Наличие характерных поверхностных маркеров, таких как CD41/CD61 для тромбоцитарных МВ, CD45 для лейкоцитарных и CD144 для эндотелиальных, позволяет идентифицировать их источник с помощью методов проточной цитометрии и иммунофлуоресцентного анализа.

Помимо мембранных белков, МВ содержат биологически активные молекулы, включая микроРНК, цитокины и факторы свертывания, что определяет их участие в межклеточной коммуникации и регуляции физиологических процессов [225]. Экспрессия тканевого фактора и фосфатидилсерина на поверхности МВ придает им выраженные прокоагулянтные свойства, играющие ключевую роль в патогенезе тромботических осложнений при различных заболеваниях, включая COVID-19 [9,11]. В системном кровотоке постоянно

присутствует гетерогенная популяция МВ, среди которых преобладают тромбоцитарные и эритроцитарные субпопуляции [141].

Вопрос приоритета открытия этих субклеточных структур остается дискуссионным: различные источники указывают на вклад нескольких исследователей, включая Wolf P. и O'Brien J.R. [20, 23]. В 1967 году Wolf P. впервые описал феномен свертывания тромбоцит-дефицитной плазмы, введя термин «тромбоцитарная пыль» (platelet dust), хотя его наблюдения базировались на более ранних работах Chargaff E., West R. и O'Brien J.R. [113]. Последний еще в 1955 году зафиксировал коагуляционную активность бестромбоцитарной сыворотки, однако не смог дать этому явлению удовлетворительного объяснения [168]. Лишь последующие исследования позволили установить, что наблюдаемые эффекты обусловлены присутствием в плазме крови МВ тромбоцитарного, эритроцитарного, лейкоцитарного и эндотелиального происхождения [23, 242]. Эти открытия заложили фундамент для современного понимания роли МВ в физиологических и патологических процессах.

Фундаментальный вклад в исследование МВ был внесен российскими учеными под руководством Зубаирова Д.М., которые в 1973 году впервые экспериментально доказали, что повышенная свертывающая активность крови обусловлена высвобождением в кровотоки фрагментов клеточных мембран [8, 9, 11, 12]. Эти субклеточные структуры, впоследствии получившие общепринятое название «микровезикулы», были идентифицированы как ключевые участники процессов тромбообразования. Работа Зубаирова Д.М. и соавторов, опубликованная в 1974 году, заложила основы для дальнейшего изучения роли МВ в системе гемостаза и их значения в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [10], что стало отправной точкой для развития данного направления исследований в отечественной гематологии и кардиологии.

Первоначально МВ рассматривались как побочные продукты клеточного метаболизма, не обладающие специфической биологической активностью. Однако последующее изучение продемонстрировало их существенную роль в регуляции

многочисленных физиологических и патологических процессов [84]. Их функциональные свойства определяются уникальным молекулярным составом, варьирующим в зависимости от клеточного источника и характера стимуляции [84, 87]. Тромбоцитарные МВ играют ключевую роль в гемостазе, тогда как эндотелиальные участвуют в регуляции ангиогенеза [87]. Важнейшей функциональной особенностью МВ является их способность опосредовать межклеточную коммуникацию посредством переноса биологически активных молекул, включая белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Этот механизм обеспечивает дистанционную передачу сигналов между клетками и участвует в координации физиологических процессов [87]. Однако аналогичные свойства МВ могут способствовать и распространению патологических агентов, включая вирусные частицы, прионные белки и онкогенные факторы, что играет существенную роль в патогенезе инфекционных и онкологических заболеваний [216].

Формирование МВ представляет собой сложный биологический процесс, обусловленный нарушением равновесного состояния липидного бислоя мембраны клетки-предшественницы. Ключевым аспектом этого процесса является перераспределение фосфолипидных компонентов мембраны, при котором происходит транслокация нейтральных фосфолипидов, преимущественно фосфатидилхолина, с внешнего на внутренний лист мембраны. Одновременно наблюдается обратное перемещение отрицательно заряженных фосфолипидов, в частности фосфатидилсерина (ФС), из внутреннего слоя на поверхность мембраны [243]. Данное перераспределение липидов приводит к значительным изменениям электрофизиологических свойств мембраны, которая приобретает выраженный отрицательный заряд вследствие экспонирования ФС на своей поверхности. Этот феномен имеет важное патогенетическое значение, поскольку определяет прокоагулянтную активность образующихся МВ и их способность участвовать в каскаде реакций свертывания крови [243].

МВ обладают принципиальными отличиями от других мембранных частиц, таких как апоптотические тельца и экзосомы, что проявляется прежде всего в их размерных характеристиках и кинетике седиментации. Важнейшей особенностью биогенеза МВ является его регулируемый характер, находящийся под контролем различных экзогенных факторов. Процесс высвобождения МВ может активироваться под воздействием множества стимулов, включая клеточный стресс, комплемент-опосредованные реакции, проапоптотические сигналы и механические повреждения клеточных структур. Данные наблюдения свидетельствуют о том, что образование МВ представляет собой физиологически значимый процесс, играющий важную роль в адаптационных механизмах клетки при различных патологических состояниях [197].

Важнейшей функциональной особенностью МВ является их способность выступать в качестве биологических векторов межклеточной коммуникации. МВ опосредуют поверхностно-мембранный трафик биологически активных молекул и осуществляют горизонтальный перенос белков и РНК между клетками, обеспечивая тем самым быструю адаптацию клеточного фенотипа в ответ на изменение микроокружения [61, 137]. Этот механизм межклеточного взаимодействия имеет фундаментальное значение для координации физиологических процессов и патогенетически значим при различных заболеваниях.

Исследования, проведенные под руководством Sturk A. демонстрируют, что МВ обладают уникальной способностью к межклеточному транспорту биологически активных молекул [216]. Клиническая значимость МВ обусловлена их многофакторным участием в патологических процессах: от инициации каскада свертывания крови до горизонтального переноса генетического материала. Особый научный интерес представляет их роль в патогенезе онкологических заболеваний, где МВ опосредуют не только иммуномодуляцию и развитие лекарственной резистентности за счет элиминации цитостатиков из опухолевых клеток, но и способствуют вирусной и прионной инфекции [216].

Важнейшей диагностической ценностью МВ является их способность отражать патологические изменения в организме. Количественные и качественные характеристики МВ, включая их клеточное происхождение, молекулярный состав и функциональную активность, существенно изменяются при таких распространенных патологиях как злокачественные новообразования, сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания [216]. Эти особенности делают МВ перспективными биомаркерами для ранней диагностики и мониторинга течения заболеваний.

#### **1.4 Микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала**

МВ секретируются различными типами клеток, включая тромбоциты, эритроциты, лейкоциты и эндотелиальные клетки, в ответ на активацию, апоптоз или клеточный стресс. Эти частицы играют ключевую роль в межклеточной коммуникации, перенося биологически активные молекулы, такие как белки, липиды и нуклеиновые кислоты, и участвуя в регуляции физиологических и патологических процессов, в том числе в системе гемостаза. В последние годы интерес к изучению МВ значительно возрос в связи с их способностью модулировать свертывание крови, что делает их важным объектом исследований в гематологии, трансфизиологии и кардиологии [152, 15].

Коагуляция крови представляет собой критически важный физиологический механизм, обеспечивающий гемостаз при повреждении сосудистой стенки. Этот процесс находится под строгим контролем и регулируется множеством факторов, включая плазменные факторы свертывания, активированные тромбоциты, ионы кальция ( $Ca^{2+}$ ) и наличие прокоагулянтных мембранных поверхностей [243]. Активация коагуляционного каскада происходит при участии клеточных элементов крови, в частности тромбоцитов, а также микрочастиц (МВ), высвобождающихся из этих клеток. Мембраны активированных клеток и МВ несут отрицательный заряд, что придает им прокоагулянтные свойства, способствуя

усилению свертывающего потенциала [243]. Таким образом, коагуляция крови представляет собой сложный, многоэтапный процесс, в котором ключевую роль играют как растворимые факторы плазмы, так и клеточные компоненты, обеспечивающие эффективный гемостаз.

Формирование коагулянтных комплексов, таких как теназный и протромбиназный, требует присутствия отрицательно заряженных фосфолипидных мембран и ионов кальция. Теназный комплекс играет ключевую роль в активации фактора X в фактор Xa как во внешнем, так и во внутреннем путях свертывания крови. Во внешнем пути активации теназный комплекс образуется тканевым фактором (ТФ) и фактором VIIa, тогда как во внутреннем пути его структура включает кофактор VIIIa и фактор IXa [219, 103]. Протромбиназный комплекс, состоящий из кофактора Va и фактора Xa, катализирует превращение протромбина в тромбин. Хотя факторы IXa и Xa способны активировать свои субстраты и в отсутствие кофакторов, присутствие отрицательно заряженных мембран значительно усиливает их активность, увеличивая скорость реакции протромбиназного комплекса в  $3 \times 10^5$  раз [139, 149]. Отрицательно заряженные фосфолипиды играют критическую роль в сборке этих коагулянтных комплексов, ускоряя их образование примерно в 1000 раз, что существенно повышает эффективность гемостатического процесса [130].

Биогенез МВ связан с процессами ремоделирования клеточной мембраны. При активации клеток происходит выпячивание наружного листка мембраны с последующим отщеплением везикул, содержащих цитоплазматические компоненты и поверхностные маркеры клетки-предшественницы. Так, тромбоцитарные МВ экспрессируют CD41 и CD61, эритроцитарные – CD235a, а эндотелиальные – CD144 и CD146. Эти маркеры позволяют точно идентифицировать клеточное происхождение МВ методами проточной цитометрии и иммунофлуоресцентного анализа [2].

Одним из ключевых механизмов участия МВ в гемостазе является их способность поддерживать прокоагулянтную активность за счет экспрессии

фосфатидилсерина (ФС) на внешней мембране. Фосфатидилсерин служит платформой для сборки ферментных комплексов внешнего и внутреннего путей свертывания крови, включая теназный (FVIIa–TF) и протромбиназный (FXa–FVa) комплексы, что значительно ускоряет генерацию тромбина [201]. Кроме того, некоторые субпопуляции МВ, особенно происходящие из моноцитов и эндотелиальных клеток, несут тканевой фактор (TF), который инициирует каскад свертывания при контакте с кровью. Это подтверждается исследованиями, демонстрирующими корреляцию между уровнем TF-положительных МВ и гиперкоагуляционными состояниями у пациентов с тромбофилиями, COVID-19-ассоциированными тромбозами и онкологическими заболеваниями [18].

Помимо прямого влияния на коагуляцию, МВ участвуют в регуляции тромбоцитарного звена гемостаза. Тромбоцитарные МВ способствуют агрегации тромбоцитов, усиливая образование первичной гемостатической пробки. МВ взаимодействуют с эндотелием, модулируя его антикоагулянтные и фибринолитические свойства. В условиях патологии, например, при атеросклерозе или диабете, повышенное высвобождение МВ может приводить к дисбалансу гемостаза, способствуя развитию как тромботических, так и геморрагических осложнений [172].

Клиническая значимость МВ определяется их потенциалом в качестве биомаркеров гемостатических нарушений. Повышенный уровень прокоагулянтных МВ ассоциирован с тромботическим риском при антифосфолипидном синдроме, тогда как снижение тромбоцитарных МВ коррелирует с кровоточивостью при тромбоцитопениях [17]. В акушерской практике оценка МВ позволяет прогнозировать тромботические осложнения у беременных с наследственными тромбофилиями, а их терапевтическое применение рассматривается при разработке гемостатических препаратов на основе криоконсервированных МВ [182].

Дальнейшие исследования выявили, что наряду с прокоагулянтными свойствами, МВ обладают также антикоагулянтной активностью.

Экспериментальные данные свидетельствуют, что МВ, выделенные из цельной крови способны ингибировать процесс свертывания крови [10]. Согласно современным представлениям, антикоагулянтный эффект МВ может быть обусловлен активацией протеина С, который взаимодействует с отрицательно заряженными фосфолипидами на поверхности МВ. Однако в плазме, лишенной тромбоцитов, этот механизм при действии МВ, полученных из отмытых эритроцитов, практически не реализуется. Это позволяет предположить, что наблюдаемое снижение коагуляционной активности в данном случае может быть связано либо с ингибированием полимеризации фибрин-мономеров под влиянием МВ, либо с прямой инактивацией тромбина [11].

МВ обладают бифункциональными свойствами, проявляя одновременно прокоагулянтную и антикоагулянтную активность, что свидетельствует об их ключевой роли в поддержании гемостатического баланса. Данные мембранные структуры представляют собой значимый регуляторный компонент системы гемостаза, участвующий в модуляции процессов свертывания крови, активации тромбоцитов и межклеточного взаимодействия между сосудистым эндотелием и форменными элементами крови. Современные исследования микровезикулярных механизмов регуляции гемостаза создают фундамент для разработки новых диагностических подходов и терапевтических стратегий коррекции нарушений в системе свертывания крови, определяя высокую научную и клиническую значимость данного направления в современной гематологии и трансфузиологии.

### **1.5 Тромбоцитарные микровезикулы в системе гемостаза**

Существенный вклад тромбоцитарных МВ в процессы коагуляции подтверждается данными, показывающими их тесную функциональную связь с физиологией тромбоцитов — ключевых участников системы гемостаза [76, 13]. Мембрана тромбоцитарных МВ содержит ряд важных молекул, включая интегрины, гликопротеины GPIb и GPIIb-IIIa, а также P-селектин, которые активно участвуют в регуляции свертывания крови [35, 230]. Протеомный анализ выявил на

поверхности тромбоцитарных МВ 578 белков, 12 из которых непосредственно вовлечены в коагуляцию, при этом 380 ранее не обнаруживались в составе самих тромбоцитов [222].

Помимо белкового состава, тромбоцитарные МВ содержат разнообразные нуклеиновые кислоты. В частности, при стимуляции тромбоцитов коллагеном в МВ были идентифицированы транскрипты 4730 генов, ассоциированных с межклеточной сигнализацией, пролиферацией, регуляцией экспрессии генов и метаболизмом липидов [186]. Важным свойством тромбоцитарных МВ является их высокая прокоагулянтная активность, обусловленная повышенной плотностью сайтов связывания для факторов свертывания, таких как протромбин, факторы VIIa, IXa, Xa, протеины C и S,  $\beta$ 2-гликопротеин и аннексин, по сравнению с активированными тромбоцитами [48]. Дополнительным доказательством их коагуляционного потенциала служит наличие на поверхности МВ фактора Va, что было продемонстрировано в исследованиях с использованием тромбоцитарных концентратов длительного хранения [10].

Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что тромбоцитарные МВ *in vitro* обеспечивают более эффективное образование тромбина на единицу площади мембраны по сравнению с активированными тромбоцитами [48, 104]. Кроме того, они способны передавать интегрин GPIIb-IIIa нейтрофилам, усиливая их взаимодействие с фибриногеном и адгезию к эндотелию [245]. Наличие на мембране МВ таких биологически активных молекул, как интегрины, P-селектин, фактор Виллебранда и тромбоксан A<sub>2</sub>, позволяет им модулировать коагуляцию посредством взаимодействия с клетками-мишенями [143]. Важно отметить, что образование МВ активированными тромбоцитами и лейкоцитами может способствовать дистанционной активации других клеток крови, поддерживая каскад реакций свертывания.

### **1.6 Роль эритроцитарных микровезикул в системе гемостаза**

Помимо тромбоцитарных МВ, существенную роль в процессах гемостаза играют МВ эритроцитарного и других клеточных происхождений. Протеомный анализ эритроцитарных МВ, проведенный Vosman G.J. и соавторами, идентифицировал 308 белков, среди которых пять непосредственно участвуют в коагуляционных процессах [223].

Повышенная концентрация эритроцитарных МВ регистрируется при различных патологических состояниях, связанных с нарушениями в системе гемостаза и развитием тромботических осложнений [20]. Эти наблюдения позволяют рассматривать образование МВ как важный физиологический механизм регуляции системы свертывания крови.

Современные данные свидетельствуют о наличии значимой корреляции между уровнем циркулирующих эритроцитарных МВ и показателями сосудистой дисфункции. В частности, выявлена прямая зависимость между концентрацией МВ и индексом аугментации - важным маркером артериальной жесткости [52, 236]. Эти результаты подчеркивают ключевую роль эритроцитарных МВ не только в регуляции гемостатического баланса, но и в патогенезе широкого спектра сосудистых нарушений, что открывает новые перспективы для их использования в качестве диагностических и прогностических маркеров.

### **1.7 Роль микровезикул при патологических состояниях**

Патогенетическая роль МВ при различных заболеваниях продолжает оставаться предметом активных научных исследований. Повышение уровня циркулирующих МВ служит лабораторным маркером различных патологических состояний, сопровождающихся развитием гиперкоагуляции [213, 80, 79]. Однако следует отметить, что повышенный уровень МВ не всегда коррелирует с тромботическими осложнениями, что объясняется их способностью одновременно стимулировать антикоагулянтную активность через активацию протеина С [64]. Важно подчеркнуть, что экспрессия фосфатидилсерина на поверхности МВ может

существенно варьировать в зависимости от клеточного происхождения, типа стимула и условий индукции везикуляции [178, 101].

При аутоиммунной тромбоцитопении повышенный уровень МВ ассоциирован с отсутствием геморрагических осложнений, что свидетельствует об их компенсаторной роли в системе гемостаза. Аналогичная закономерность наблюдается при гемофилии, где увеличение концентрации МВ во время острых кровотечений отражает активацию гемостатических механизмов без риска тромбообразования вследствие недостаточности тромбинового каскада [181, 182]. Эти данные подтверждают концепцию о физиологической адаптивной функции МВ в системе гемостаза.

Процесс образования МВ происходит как в условиях физиологической нормы, так и при различных патологических состояниях. Физиологическая микровезикуляция осуществляется в рамках регуляции клеточного гомеостаза и межклеточной коммуникации, тогда как патологическое образование МВ индуцируется факторами повреждения клеток, включая воспалительные цитокины, оксидативный стресс и механическое повреждение. Нарушение баланса МВ, участвующих в ключевых физиологических процессах (ангиогенез, гемостаз), может вызывать серьезные системные нарушения [128].

Особый интерес представляет роль МВ в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Повышенный уровень тромбоцитарных МВ регистрируется у пациентов с ишемическим инсультом [82], тогда как увеличение концентрации эритроцитарных МВ ассоциировано с тромбозом легочной артерии [55] и фибрилляцией предсердий [38]. Установленные различия в профиле циркулирующих МВ отражают специфичность патогенетических механизмов при различных формах тромботических нарушений. При тромбозе глубоких вен отмечается увеличение МВ различного клеточного происхождения [142], а при коронарном атеросклерозе уровень эритроцитарных МВ возрастает пропорционально степени стеноза [114].

Снижение артериальной эластичности, сопровождающееся увеличением скорости распространения пульсовой волны, приводит к структурно-функциональным повреждениям эндотелия, что стимулирует повышенную продукцию эндотелиальных МВ (ЭМВ) как реакцию на клеточный стресс. Клинические исследования демонстрируют прямую корреляцию между повышением уровня циркулирующих ЭМВ, снижением сосудистой эластичности и увеличением скорости пульсовой волны у пациентов с терминальной почечной недостаточностью [52, 236].

Патогенетические механизмы увеличения количества эндотелиальных МВ при артериальной гипертензии аналогичны таковым при эндотелиальном повреждении. Гемодинамические изменения, возникающие даже при мягкой гипертензии, индуцируют значительное повышение концентрации ЭМВ по сравнению с контрольными группами, причем этот показатель возрастает пропорционально степени повышения артериального давления [211, 122]. Особый интерес исследователей к ЭМВ обусловлен их ролью в качестве объективных биомаркеров состояния сердечно-сосудистой системы, поскольку основные факторы риска (курение, гипертензия, сахарный диабет) оказывают первичное воздействие именно на эндотелиальную выстилку сосудов [236].

Важное клиническое значение имеет установленная Koga H. с соавторами способность уровня ЭМВ служить достоверным маркером эндотелиальной дисфункции и предиктором риска развития острого коронарного синдрома, превосходя по информативности традиционные диагностические методы [81]. В противоположность этому, Wang C. и коллеги наблюдали снижение концентрации циркулирующих ЭМВ при улучшении состояния пациентов с сердечно-сосудистой патологией, что позволяет рассматривать ЭМВ не только как диагностический, но и как прогностический маркер эффективности проводимой терапии [41].

Повышенный уровень МВ ассоциирован с эндотелиальной дисфункцией, что проявляется нарушением вазодилатации, снижением эластичности артерий и повышением маркеров воспаления [211]. Клинические исследования

демонстрируют изменение профиля МВ при широком спектре патологий: от метаболических нарушений (гипертриглицеридемия, сахарный диабет) до аутоиммунных заболеваний (антифосфолипидный синдром, васкулиты) [236]. Особого внимания заслуживает участие МВ в патогенезе атеросклероза, где они способствуют формированию «уязвимых» бляшек за счет поддержания локального воспаления и окислительного стресса [86, 102]. Достоверное увеличение эндотелиальных МВ у пациентов с острым коронарным синдромом подтверждает их значимость как прогностических маркеров сердечно-сосудистых событий [52, 85].

### **1.8 Оценка циркулирующих микровезикул и их прокоагулянтной активности у пациентов с COVID-19**

Пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, выявила значительные нарушения в системе гемостаза у инфицированных пациентов. Особый интерес представляет изучение роли циркулирующих МВ в патогенезе коагулопатий, ассоциированных с COVID-19. Их количество и прокоагулянтная активность значительно возрастают при COVID-19, что коррелирует с тяжестью заболевания и риском тромботических осложнений [2].

Биогенез МВ при COVID-19 имеет сложный патогенетический механизм. Вирусная инфекция вызывает активацию эндотелиальных клеток, тромбоцитов и лейкоцитов, что приводит к усиленному образованию МВ. Исследования показали, что у пациентов с тяжелым течением COVID-19 уровень эндотелиальных (CD144<sup>+</sup>) и тромбоцитарных (CD41<sup>+</sup>) МВ в плазме крови может превышать нормальные показатели в 3-5 раз [89]. Особую опасность представляют МВ, несущие тканевой фактор (ТФ<sup>+</sup>), которые обнаруживаются у 60-80% пациентов с COVID-ассоциированной пневмонией и являются маркерами высокого риска тромбоэмболических осложнений [18].

Прокоагулянтная активность МВ при COVID-19 реализуется через несколько механизмов. Основной из них - экспрессия фосфатидилсерина на поверхности МВ,

который служит платформой для сборки ферментных комплексов свертывания крови. Исследования *in vitro* демонстрируют, что МВ пациентов с COVID-19 ускоряют образование тромбина в 2-3 раза по сравнению с контрольной группой [117]. Кроме того, МВ усиливают агрегацию тромбоцитов и способствуют образованию устойчивых к фибринолизу сгустков, что объясняет высокую частоту венозных тромбозов даже на фоне антикоагулянтной терапии [97].

Клинические исследования выявили четкую корреляцию между уровнем циркулирующих МВ и тяжестью COVID-19. У пациентов, требующих интенсивной терапии, концентрация ТФ<sup>+</sup> МВ в среднем на 40% выше, чем у больных с легкой формой заболевания [185]. При этом повышенный уровень МВ сохраняется в течение нескольких недель после выздоровления, что может объяснять случаи поздних тромботических осложнений. Интересно, что динамика изменения количества МВ может служить прогностическим маркером: снижение их уровня на 3-5 день госпитализации ассоциировано с благоприятным исходом, тогда как дальнейший рост коррелирует с развитием ОРДС и полиорганной недостаточности [175].

Методы оценки МВ у пациентов с COVID-19 включают проточную цитометрию с использованием специфических маркеров (CD41, CD144, CD142), определение прокоагулянтной активности с помощью анализа тромбогенеза и микроскопические методы (атомно-силовая микроскопия, нанопартикулярный трекинг-анализ) [79]. Сравнительные исследования показали, что комбинация проточной цитометрии с оценкой ТФ-активности обладает наибольшей диагностической ценностью для выявления пациентов с высоким риском тромбозов [79].

Перспективным направлением является разработка терапевтических подходов, направленных на модуляцию образования и активности МВ. Экспериментальные данные свидетельствуют, что низкомолекулярные гепарины не только оказывают антикоагулянтное действие, но и снижают продукцию прокоагулянтных МВ [116]. Также изучается эффективность статинов,

антиагрегантов и ингибиторов воспалительных цитокинов в коррекции микровезикулярных нарушений при COVID-19 [205].

Таким образом, оценка циркулирующих МВ и их прокоагулянтной активности представляет важный аспект диагностики и прогнозирования течения COVID-19. Дальнейшие исследования в этом направлении могут привести к разработке новых стратегий профилактики и лечения тромботических осложнений у пациентов с COVID-19.

### **1.9 Основные механизмы блокады микровезикулярной активности**

Стратегии модуляции микровезикулярной активности включают три ключевых направления. Первое направление предполагает ингибирование процессов биогенеза МВ посредством воздействия на ESCRT-комплекс (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), где применение siRNA против TSG101 или VPS4 демонстрирует значительное снижение высвобождения МВ [62]. Параллельно эффективность показывает блокада кальций-зависимых механизмов образования МВ с использованием ингибиторов кальциевых каналов, таких как верапамил, которые препятствуют кальций-опосредованной секреции МВ [91].

Второе направление сосредоточено на подавлении высвобождения МВ через ингибирование Rab GTPаз, в частности Rab27a/b, регулирующих транспорт везикул к плазматической мембране. Применение специфических siRNA или фармакологических агентов типа Nexinhib20 существенно уменьшает секрецию МВ [91]. Дополнительным механизмом является блокада кислотных сфингомиелиназ (aSMase) с помощью ингибиторов типа амитриптилина или GW4869, что подавляет ключевой этап образования МВ [194].

Третье стратегическое направление заключается в нарушении процессов поглощения МВ клетками-мишенями. Это достигается посредством блокады интегринов (например,  $\alpha\beta4$ ) с использованием специфических антител, препятствующих взаимодействию МВ с клеточными рецепторами [91]. Альтернативным подходом выступает ингибирование

гепарансульфатпротеогликанов (HSPG) при помощи гепариназы или гепарина, что снижает эффективность прикрепления и усвоения МВ [46].

Перспективы клинического применения указанных подходов включают противометастатическую терапию через ингибирование опухолевых МВ, передающих онкогенные сигналы, лечение воспалительных патологий посредством блокады провоспалительных МВ при сепсисе и аутоиммунных заболеваниях, а также терапию нейродегенеративных заболеваний через ингибирование передачи патологических белков, таких как  $\alpha$ -синуклеин при болезни Паркинсона.

### **1.10 Патогенетические особенности влияния нейтрофильных внеклеточных ловушек на нарушения свертывающей системы при COVID-19**

Нетоз — это процесс гибели нейтрофилов, сопровождающийся высвобождением НВЛ, состоящих из ДНК, гистонов и антимикробных белков. Хотя НВЛ играют роль в защите от патогенов, их избыточное образование связано с аутоиммунными, тромботическими и воспалительными заболеваниями. Ингибиторы нетоза могут быть перспективными для лечения подобных патологий [161].

Пандемия COVID-19 выявила сложные взаимосвязи между иммунным ответом и системой гемостаза, где особую роль играют НВЛ. Эти структуры, представляющие собой сети из ДНК, гистонов и антимикробных белков, высвобождаемые активированными нейтрофилами, оказались ключевым звеном в патогенезе тромботических осложнений при COVID-19. Накопленные экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют, что компоненты НВЛ, включая внеклеточную ДНК, гистоны и протеазы, активно вмешиваются в работу свертывающей системы крови, потенцируя развитие системной гиперкоагуляции [19].

Патогенетический механизм активации НВЛ при COVID-19 начинается с прямого воздействия вируса на нейтрофилы через рецепторы ACE2 и TLRs. Вирусные частицы индуцируют активный процесс нетоза - запрограммированной клеточной смерти нейтрофилов, сопровождающейся выбросом ядерного материала. При этом было установлено, что у пациентов с тяжелым течением COVID-19 уровень циркулирующих НВЛ в 5-7 раз превышает показатели здоровых доноров, а в легочной ткани умерших больных обнаруживаются обширные отложения этих структур [87]. Особенностью COVID-ассоциированного нетоза является его длительная персистенция - повышенные уровни маркеров НВЛ (миелопероксидазы, цитруллинированного гистона H3) сохраняются в крови пациентов даже через 3-4 месяца после выздоровления, что может объяснять случаи поздних тромботических осложнений [19].

Влияние НВЛ на систему гемостаза при COVID-19 реализуется через несколько взаимосвязанных механизмов. Во-первых, компоненты НВЛ (особенно гистоны и ДНК) непосредственно активируют тромбоциты, усиливая их адгезию и агрегацию. Исследования *in vitro* показали, что гистоны H3 и H4 в концентрациях, соответствующих тяжелой форме COVID-19, увеличивают тромбоцитарный ответ на коллаген в 2-3 раза [91]. Во-вторых, ДНК-сети служат матрицей для осаждения фибрина, формируя плотные, устойчивые к фибринолизу сгустки. Электронно-микроскопические исследования тромбов у пациентов с COVID-19 выявили их характерную «лохматую» структуру с обильными включениями НВЛ, что отличает их от обычных венозных тромбов [119]. В-третьих, компоненты НВЛ подавляют естественные антикоагулянтные механизмы: гистоны и нейтрофильная эластаза инактивируют тромбомодулин-белковую С систему, а ДНК-сети связывают и нейтрализуют гепарин [164].

Сочетание НВЛ с активированными тромбоцитами и МВ создает мощный прокоагулянтный потенциал. У пациентов с одновременным повышением уровня НВЛ и тканевого фактора риск тромбозов возрастает в 4,7 раза по сравнению с больными, имеющими изолированное повышение только одного из этих маркеров.

Кроме того, НВЛ усиливают цитокиновый шторм - гистоны стимулируют выброс  $IL-1\beta$  и  $IL-6$ , которые в свою очередь дополнительно активируют нейтрофилы, замыкая замкнутый круг воспаления и тромбоза [83].

Уровень циркулирующих компонентов НВЛ (cfDNA, MPO-DNA комплексов) коррелирует с тяжестью заболевания, степенью поражения легких по данным КТ и риском тромботических осложнений [207]. При этом было обнаружено, что традиционные маркеры коагуляции (Д-димер, фибриноген) часто не отражают истинный тромботический риск у пациентов с выраженным нетозом, что требует разработки специальных алгоритмов оценки [157]. Интересно, что у некоторых больных с COVID-19 отмечается парадоксальное сочетание повышенного тромботического риска (обусловленного НВЛ) с лабораторными признаками гипокоагуляции, что создает сложности в подборе антикоагулянтной терапии [225].

НВЛ вносят существенный вклад в патогенез нарушений системы гемостаза при COVID-19, формируя характерный «иммунотромботический» фенотип заболевания. Данный патогенетический механизм реализуется через интеграцию процессов тромбообразования и воспаления, где компоненты НВЛ (ДНК-сети, гистоны, протеазы) выступают в качестве структурной основы для формирования устойчивых к фибринолизу тромбов [227]. Дальнейшее изучение этих механизмов открывает новые возможности для персонализированной профилактики и лечения тромботических осложнений у пациентов с коронавирусной инфекцией.

### **1.11 Ингибиторы нетоза: механизмы действия и терапевтическое применение**

Стратегии ингибирования нетоза направлены на ключевые этапы образования НВЛ. Одним из перспективных подходов является блокада активации нейтрофилов через ингибирование пептидиларгининдеиминазы 4 (PAD4) – фермента, катализирующего цитруллинирование гистонов, необходимое для деконденсации хроматина. Фармакологические ингибиторы PAD4, такие как

хлорида амидин и GSK484, демонстрируют выраженную способность подавлять образование НВЛ [124]. Особый интерес представляет аналог ВВ-хлорида амидин, показавший эффективность в патогенезе системной красной волчанки (СКВ) на мышинной модели MRL/lpr [176].

Альтернативной мишенью выступает NADPH-оксидаза (NOX2) – ключевой фермент генерации активных форм кислорода (АФК), необходимых для классического нетоза. Ингибиторы NOX2, включая дифенилениодоний (DPI) и апоцинин, эффективно блокируют этот процесс [167].

Не менее важным направлением является подавление сигнальных путей нетоза через ингибирование миелопероксидазы (MPO), способствующей окислению гистонов и деградации ядерной мембраны. Соединения 4-аминобензойная кислота (4-АБК) и АЗМ198 демонстрируют значительное снижение образования НВЛ [148]. При альтернативном пути нетоза, независимом от АФК, перспективной мишенью становится белок газдермин D (GSDMD), активируемый каспазой-11. Ингибитор GSDMD дисульфирам эффективно подавляет данный тип нетоза [107].

Отдельное терапевтическое направление представляет разрушение уже сформированных НВЛ с помощью дезоксирибонуклеаз. Дорназа альфа (Pulmozyme®), применяемая при муковисцидозе, показала эффективность в деградации ДНК-сетей НВЛ [31]. В образцах с COVID-19 ДНКаза I продемонстрировала способность снижать тромбообразование [157]. Гепарин, связывая цитотоксические гистоны, уменьшает их повреждающее действие и ограничивает распространение НВЛ-опосредованного повреждения тканей [166].

Терапевтическое применение ингибиторов нетоза особенно перспективно при аутоиммунных заболеваниях. При системной красной волчанке ингибиторы PAD4 (GSK484) и ДНКазы снижают повреждение тканей, обусловленное аутоантигенами НВЛ [158]. При тромботических осложнениях и сепсисе, опосредованных COVID-19 комбинация ДНКазы I и гепарина улучшает клинические исходы [217]. В онкологии ингибиторы PAD4 показали

эффективность в снижении метастазирования при раке молочной железы посредством подавления образования «ловушек» для опухолевых клеток [46].

Наиболее перспективными представляются ингибиторы PAD4 для терапии аутоиммунных заболеваний, ДНКазы при тромботических осложнениях и COVID-19, а также блокаторы GSDMD для подавления альтернативного пути нетоза. Однако для внедрения этих подходов в клиническую практику необходимы рандомизированные контролируемые исследования для оценки их безопасности и эффективности применения у человека.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Характеристика клинического материала

Исследования выполнялись в ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Проведено когортное проспективное сравнительное исследование. В исследование была включена когорта пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19 (n=213), которые в зависимости от тяжести течения заболевания были разделены на две группы: со среднетяжелым (n=138) и тяжелым (n=75) течением.

Для исследования использована кровь, взятая однократно в пробирки с цитратом натрия, объемом 4,5 мл из локтевой вены у 213 пациентов временного инфекционного госпиталя на базе ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» в период с июня по август 2020 г.

В качестве контроля использована кровь 20 практически здоровых лиц, не имевших в анамнезе хронических заболеваний основных систем организма (сердечно-сосудистой, пищеварительной, эндокринной и нервной). Взятие образцов осуществляли на базе отделения переливания крови ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» параллельно со сбором материала для исследования.

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.

Пациенты разделены на две группы в зависимости от тяжести течения заболевания:

– первая группа — среднетяжелое течение, КТ2–3, получали эноксапарин натрия подкожно 0,6 мг 2 раза в день;

– вторая группа — тяжелое течение, КТ4, установлена гепариновая помпа 20000 ЕД (гепарин натрия), пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии. Важно отметить, что во второй группе была выделена подгруппа сравнения в количестве 15 пациентов с аналогично тяжелым течением (КТ4), но не

получавших на момент забора материала гепаринотерапию, что позволило оценить параметры гемостаза в отсутствие прямого фармакологического воздействия.

Демографические и клинические характеристики исследуемых групп.

Возрастные показатели: средний возраст обследованных лиц в первой группе достигал  $63 \pm 10,3$  года (диапазон 35-79 лет), во второй группе -  $66,3 \pm 12,1$  года (диапазон 32-87 лет;  $p=0,008$ ). В контрольной группе данный показатель составлял  $53,5 \pm 10,9$  года (диапазон 33-71 год).

Сопутствующая патология: в первой группе сопутствующие заболевания были зарегистрированы у 131 пациента (94,9%), включая:

- гипертоническую болезнь I-III стадии - 128 случаев (92,7%)
- сахарный диабет 2 типа - 99 случаев (71,7%)

Во второй группе сопутствующая патология отмечалась у всех пациентов (100%), в том числе:

- гипертоническая болезнь I-III стадии - 74 случая (98,6%)
- сахарный диабет 2 типа - 56 случаев (74,6%)

Клинические исходы: все пациенты второй группы получали респираторную поддержку методом искусственной вентиляции легких. Летальный исход зарегистрирован у 66 пациентов (88%) данной группы.

Гендерные различия: статистически значимых различий по половому признаку между сравниваемыми группами не выявлено ( $p=0,119$ ).

Критерии отбора участников исследования.

Критерии включения:

1. Лабораторно подтвержденный диагноз COVID-19, верифицированный методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
2. Наличие информированного добровольного согласия пациента или его законного представителя на участие в исследовании.

Критерии исключения:

1. Отказ пациента от участия в исследовании;
2. Отсутствие лабораторного подтверждения диагноза COVID-19;

3. Перенесенные хирургические вмешательства в период текущего заболевания;

4. Наличие тромботических эпизодов в анамнезе, предшествующих заболеванию COVID-19.

Бестромбоцитарную плазму крови (БТП) получали путем двойного центрифугирования: при 1500g 15 мин и далее в режиме 10 000g 5 мин. Надосадочную жидкость отбирали в эппендорфы для дальнейшего исследования.

## **2.2 Лабораторные методы исследования**

### **2.2.1 Стандартные лабораторные параметры**

Всем пациентам были проведены лабораторные исследования биохимических (CRP, ферритин), коагулометрических (АЧТВ, ПТ по Квику, МНО, фибриноген, Д-димер) параметров, общий анализ крови. Показатели лабораторных исследований были получены на базе временного инфекционного госпиталя ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» г. Казани с помощью коагулометра SYSMEX CA-1500 (Sysmex, Япония), биохимического анализатора COBAS C311 (Roche, Швейцария), гематологического анализатора SYSMEX XN 1000 (Sysmex, Япония). Лабораторные исследования проводились в строгом соответствии с клиническими назначениями и актуальными требованиями Временных методических рекомендаций по COVID-19 (версия 7 от 03.06.2020 г.). Исследования выполнялись автором лично или под его непосредственным наблюдением. Валидация полученных данных осуществлялась с помощью лабораторной информационной системы NexMed.

Следует отметить, что все лабораторные данные были анонимизированы, применяемое аналитическое оборудование прошло всю необходимую сертификацию, регулярно проводились процедуры поверки, внутреннего и внешнего контроля качества.

### 2.2.2 Метод динамической турбидиметрии

Исследование кинетических параметров процесса полимеризации фибрина проводили методом динамической турбидиметрии с использованием спектрофотометрического анализа. Измерения выполняли на спектрофотометре СФ-2000 (производство ОКБ «Спектр», Санкт-Петербург, Россия), оснащенном специализированным программным обеспечением «Кинетика».

Протокол эксперимента:

1. В стандартной кварцевой кювете последовательно смешивали:
  - 400 мкл бестромбиновой плазмы (БТП)
  - 400 мкл 0,025 М раствора хлорида кальция ( $\text{CaCl}_2$ )
2. Активацию системы свертывания инициировали в момент рекальцификации плазмы, принимаемый за нулевую точку отсчета.
3. Процесс формирования фибринового сгустка мониторировали по изменению оптической плотности раствора, обусловленному конверсией растворимого фибриногена в нерастворимую фибриновую сеть.

Условия измерений:

- Длина волны: 340 нм
- Оптический путь: 10 мм
- Продолжительность регистрации: 60 минут
- Температурный режим:  $+24 \pm 0,5^\circ\text{C}$

Анализ параметров турбидиметрической кривой

При обработке полученных турбидиметрических данных оценивали следующие ключевые параметры:

- Lag-период (Lag): соответствует временному интервалу от момента активации свертывания до начала формирования протофибрилл, отражает продолжительность фазы генерации тромбина и нуклеации фибриновых структур
- Скорость полимеризации (V): определяется как тангенс угла наклона линейного участка кривой нарастания оптической плотности, характеризует

кинетику латеральной агрегации фибриновых мономеров, отражает интенсивность процесса образования зрелых фибриновых волокон

- Максимальная оптическая плотность ( $A_{\max}$ ): показатель, регистрируемый в точке плато кривой. Зависит от общего количества полимеризованного фибрина, толщины сформированных фибриновых волокон, архитектуры трехмерной фибриновой сети.

### 2.2.3 Метод тромбозластографии

Для оценки плазменного гемостаза применялась модификация стандартной тромбозластографии (ТЭГ), при которой в качестве исследуемого материала используется бестромбоцитарная плазма с использованием тромбозластографа TEG 5000 (Haemonetics, США). Удаление тромбоцитов позволяет изолированно оценить динамику формирования и лизиса фибринового сгустка, исключив вклад тромбоцитарного компонента. Метод визуализирует процессы активации плазменных факторов свертывания, превращения фибриногена в фибрин и фибринолиза в режиме реального времени. Для оценки протромботического потенциала МВ методом тромбозластографии был разработан следующий экспериментальный протокол:

1. Подготовка образцов МВ: бестромбоцитарную плазму (БТП) подвергали двукратному центрифугированию при условиях: ускорение 6700g, время центрифугирования 30 минут, использовали забуференный изотонический раствор NaCl (pH 7,4). Супернатант удаляли, осажденные МВ ресуспендировали в 100 мкл изотонического раствора NaCl

2. Формирование опытных образцов: 240 мкл БТП (опытный образец), 20 мкл 0,2 М раствора  $\text{CaCl}_2$  (активатор свертывания), 100 мкл полученной взвеси МВ. Для нейтрализации возможного влияния гепарина использовали реакционные кюветы с иммобилизованной гепариназой.

3. Контрольная группа: 340 мкл нативной БТП, 20 мкл 0,2М  $\text{CaCl}_2$ .

Материал опытного и контрольного образца использовался от одного пациента для оценки влияния внесенных МВ на коагуляционные характеристики.

Особенности методики:

1. Стандартизированные условия пробоподготовки;
2. Контроль потенциальных интерферирующих факторов;
3. Парное сравнение образцов с внесением МВ и без них;

Интерпретируемые параметры, допустимые для данного теста. При работе с БТП диагностическое значение имеют только параметры, отражающие плазменный гемостаз:

1. R (Reaction Time) – время реакции. Отражает период от активации до начала образования фибрина (генерация тромбина). Чистый показатель активности плазменных факторов свертывания. Диагностическая ценность в БТП - удлинение свидетельствует о дефиците или ингибировании факторов свертывания (гепарин, антагонисты витамина К, коагулопатия разведения, гемофилия). Укорачивание R указывает на гиперкоагуляцию плазменного звена.

2.  $\alpha$  (Alpha Angle) – угол альфа. Отражает кинетику полимеризации фибрина и нарастания прочности сгустка после начала его образования. Диагностическая ценность в БТП - является прямым индикатором концентрации и функциональной активности фибриногена. Снижение угла  $\alpha$  указывает на гипо- или дисфибриногению.

3. K (Kinetics Time) – время кинетики (время формирования сгустка). Отражает скорость достижения заданной прочности сгустка (амплитуда 20 мм). Является производным от угла  $\alpha$ . Диагностическая ценность в БТП - удлинение коррелирует со снижением уровня/функции фибриногена.

#### **2.2.4 Метод проточной цитофлуориметрии**

Количественный анализ МВ проводили методом проточной цитометрии с использованием анализатора BD FACSCanto II, (BD Biosciences, США). В работе применяли модифицированную методику L.V. Iversen (2013). Для определения

фенотипа МВ использованы меченные моноклональные антитела фирм BD Biosciences (США), Cloud-Clone (КНР), Affinity Biosciences (КНР). БТП смешивали с фосфатным буфером (рН=7,4) в соотношении 1:9. Абсолютное количество МВ в 1 мл определяли по светорассеянию с использованием программы FACSDiva, регистрируя количество событий за единицу времени (60 с) с учетом скорости потока. Цитометрический анализ распределения частиц по размеру (FSC) и гранулярности (SSC) в логарифмических шкалах позволяет локализовать сигналы МВ в определенной зоне. Для калибровки прибора и ограничения области подсчета МВ использовали стандартные синтетические сферические частицы с диаметром 1, 2, 3, 5, 6 и 10 мкм (BD Pharmingen, США). Графическую обработку результатов проводили в программе FCS Express Research Edition, Novo Software 2024 (США).

Методика количественного анализа МВ.

Количественную оценку МВ проводили с использованием проточной цитометрии, применяя следующий аналитический протокол:

1. Определение абсолютного количества МВ.

Измерения выполняли в фиксированном временном интервале (60 секунд). Количество МВ рассчитывали на основании: количества зарегистрированных событий и известной скорости потока (60 мкл/мин). Обработку данных осуществляли с использованием программного обеспечения FACSDiva.

Абсолютное количество МВ в 1 мл определяли с использованием программы FACSDiva, регистрируя количество событий за единицу времени (60 с) с учетом скорости потока.

2. Характеристика популяции МВ:

Анализ распределения частиц проводили по двум параметрам: прямое светорассеяние (FSC) - показатель размера частиц, боковое светорассеяние (SSC) - показатель гранулярности. Шкалы измерений для обоих параметров устанавливали в логарифмическом режиме. Калибровка и валидация метода: для калибровки прибора использовали набор стандартных частиц (BD Pharmingen, США) с диаметрами: 1 мкм, 2 мкм, 3 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 10 мкм. Стандартные

частицы применяли для установления референсных значений и определения границ аналитического окна для МВ. Для подтверждения активации НВЛ и наличия на них МВ различного происхождения мы использовали следующие флуоресцентно меченые антитела к поверхностным маркерам клеток крови: CD45 (пан-лейкоцитарные), CD3 (Т-лимфоциты), CD4 (Т-хелперы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки), CD14 (моноциты, макрофаги), CD15 (нейтрофилы, эозинофилы), CD61 (тромбоциты, мегакарициты). С целью обнаружения фрагментов нуклеиновых кислот (ДНК), образцы БТП окрашивали флуоресцентным интеркалирующим красителем для визуализации ядра и других ДНК-содержащих органелл - пропидий йодидом (PI).

### **2.2.5 Метод флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии**

Для подтверждения наличия МВ на НВЛ использовали метод флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Этот метод позволяет получать высокодетализированные изображения и позволяет изучать взаимодействие МВ с другими компонентами плазмы. Все изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Вецлар, Германия). Для получения изображений использовали программное обеспечение Leica Las AF. Разрешение изображений составляло 1024 x 1024 или 512 x 512 пикселей. Для исследования НВЛ методом лазерной сканирующей микроскопии было проведено окрашивание красителем DAPI (диацидин амида пиразолового), который связывается с участками ДНК, обильными азотистыми основаниями А-Т. Для возбуждения красителя DAPI использовали мультифотонный лазер Mai Tai (Spectra-Physics, США) с длиной волны 800 нм, эмиссию флуоресценции регистрировали в диапазоне 430-550 нм. Применяли флуоресцентно меченые антитела к поверхностным маркерам клеток крови фирм BD Biosciences (США), Cloud-Clone (КНР), Affinity Biosciences (КНР): CD15, меченные флуорохромом FITC (Флуоросцеиновый изотоп). Для

возбуждения FITC использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм, флуоресценцию регистрировали в диапазоне 500–550 нм. Использовали антитела CD62, меченные флуорохромом APC (Флуорохромный краситель Allophycocyanin). Для возбуждения APC использовали лазер с длиной волны возбуждения 633 нм, эмиссию регистрировали в диапазоне 640-700 нм. Антитела CD13, меченные флуорохромом PE (Флуорохромный краситель Phycoerythrin), возбуждали лазером с длиной волны возбуждения 495 нм, а эмиссию регистрировали в диапазоне 560-620 нм. Изображения анализировали с помощью программного пакета Las X или Las AF (Leica Microsystems, Германия). В каждом эксперименте выбиралось не менее 20 репрезентативных полей наблюдения. Наблюдения проводились с использованием иммерсионного объектива HC X APO L 20×/1.0 W (1.00 NA). Колокализация анализировалась с помощью программного обеспечения Las AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия).

## 2. Методы статистического анализа

Для статистической обработки данных использовали программный комплекс StatTech v. 4.7.2 (ООО «Статтех», Россия) и OriginLab 2021 (OriginLab Corporation, США).

При обработке количественных показателей применялись стандартные методы дескриптивной статистики. Для параметров, соответствующих нормальному распределению, данные представлены в виде среднего арифметического со стандартным отклонением ( $M \pm SD$ ) с расчетом 95% доверительных интервалов. Показатели с распределением, отличающимся от нормального, описаны с использованием медианы ( $Me$ ) и межквартильного размаха ( $Q1-Q3$ ).

Сравнительный анализ двух независимых групп проводился с применением параметрического t-критерия Стьюдента для данных с нормальным распределением и гомогенными дисперсиями, в остальных случаях использовались непараметрические аналоги. Для оценки корреляционных взаимосвязей между

показателями применялся коэффициент ранговой корреляции Спирмена, что обусловлено преимущественно ненормальным распределением анализируемых данных. Моделирование зависимостей осуществлялось методом линейного регрессионного анализа при условии нормального распределения зависимых переменных.

Анализ качественных признаков включал расчет абсолютных частот и процентных долей с построением 95% доверительных интервалов методом Клоппера-Пирсона. Результаты представлены в табличной форме с указанием среднего значения и стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ), где  $n$  отражает объем выборки. Графическая визуализация данных выполнена с использованием программного пакета OriginLab 2021. Во всех видах статистического анализа уровень значимости принят равным  $p < 0,05$ .

В данном исследовании корреляционный анализ был применен в качестве ключевого статистического метода для изучения взаимосвязей между количественными показателями системы гемостаза, основными маркерами воспаления и абсолютным количеством МВ в зависимости от тяжести течения COVID-19. Использовался непараметрический коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $\rho$ ), что обусловлено отклонением распределения данных от нормального, подтвержденного критериями Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Анализ проводился с учетом всех требований к обработке медицинских данных: предварительно были проверены условия применимости метода, выполнена оценка линейности связей с помощью диаграмм рассеяния, учтена возможная гетероскедастичность. Для количественной оценки силы корреляционной связи использована общепринятая классификация:

- 0,00-0,30 - слабая
- 0,30-0,70 - умеренная
- 0,70-1,00 - сильная корреляция

Статистическая значимость определялась при  $p < 0.05$  с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Все расчеты осуществлялись в

специализированных статистических пакетах (StatTech v.4.7.2) с соблюдением принципов воспроизводимости исследований. Особое внимание уделялось дифференцированному анализу корреляций в группах пациентов с различной степенью тяжести COVID-19, что позволило выявить паттерны изменений гемостатических параметров на разных стадиях заболевания.

## ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Результаты лабораторных исследований

Традиционная диагностика гемостаза базируется на регистрации образования фибринового сгустка после активации свертывающей системы *in vitro*. Наиболее востребованными в клинике являются тесты оценки активности протромбинового комплекса, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и концентрации фибриногена. Эти анализы были внедрены преимущественно для оценки активации коагуляционного гемостаза и контроля лечения антикоагулянтами [52].

Первым этапом исследования проведена оценка коагулологических, гематологических и биохимических показателей у пациентов с COVID-19 в зависимости от тяжести течения заболевания (Таблица 1).

По данным гематологического анализа, было выявлено прогрессирующее увеличение количества лейкоцитов от контрольной группы к группе со среднетяжелым и далее к группе с тяжелым течением, что свидетельствует о нарастании интенсивности системного воспалительного ответа. В отношении тромбоцитов статистически значимое снижение их количества было зарегистрировано только в группе пациентов с тяжелым течением по сравнению как с контролем, так и с группой среднетяжелого течения, что соответствует картине выраженной тромбоцитопении.

При оценке биохимических маркеров воспаления выявлено достоверное повышение концентраций С-реактивного белка и ферритина в обеих группах пациентов по сравнению с контролем. При этом их уровень прогрессивно нарастал по мере увеличения тяжести заболевания, достигая максимума в группе с тяжелым течением, что отражает степень выраженности острофазового воспалительного ответа.

Таблица 1 – Описательная статистика результатов лабораторных исследований в зависимости от степени тяжести COVID-19

Показатели	Референсные значения	Степень тяжести			<i>p</i>
		Контроль (К) (n=20)	1-я группа (1) (среднее течение COVID-19, n=138)	2-я группа (2) (тяжелое течение COVID-19, n=75)	
Лейкоциты ( $\times 10^9/L$ ), Ме (IQR)	4–10	6,35 (5,97; 6,83)	8,59 (5,50; 11,80)	11,80 (9,75; 16,20)	$p_{1-K}=0,014$ $p_{2-K} < 0,001$ $p_{2-1}=0,001$
Тромбоциты ( $\times 10^9/L$ ), Ме (IQR)	100–300	250,00 (228,75; 266,25)	207,00 (178,00; 298,00)	139,50 (104,25; 177,75)	$p_{2-K} < 0,001$ $p_{2-1} < 0,001$
СРБ, мг/л, Ме (IQR)	<5	2,25 (1,65; 2,82)	26,20 (11,33; 62,63)	87,40 (56,50; 99,10)	$p_{1-K} < 0,001$ $p_{2-K} < 0,001$ $p_{2-1} < 0,001$
Ферритин, нг/мл, Ме (IQR)	20–200	66,00 (57,75; 75,75)	225,20 (118,25; 366,52)	315,07 (172,00; 427,82)	$p_{1-K} < 0,001$ $p_{2-K} < 0,001$
АЧТВ, с, Ме (IQR)	25–36	28,00 (26,75; 30,00)	23,50 (22,00; 25,40)	57,15 (40,00; 86,12)	$p_{1-K} < 0,001$ $p_{2-K}=0,018$ $p_{2-1} < 0,001$
МНО, у. е, Ме (IQR)	0,9–1,2	1,00 (0,99; 1,02)	0,97 (0,87; 1,11)	2,60 (2,32; 3,58)	$p_{2-K} < 0,001$ $p_{2-1} < 0,001$
Фибриноген, г/л, Ме (IQR)	2–4	2,95 (2,80; 3,10)	4,80 (4,00; 5,60)	3,90 (3,40; 4,90)	$p_{1-K} < 0,001$ $p_{2-K} < 0,001$ $p_{2-1}=0,004$
D-димер, мг/л, Ме (IQR)	<0,5	0,24 (0,20; 0,28)	0,78 (0,30; 1,28)	2,27 (1,65; 5,23)	$p_{1-K} < 0,001$ $p_{2-K} < 0,001$ $p_{2-1} < 0,001$
ПТ по Квику (%), Ме (IQR)	80–100	96,00 (94,00; 97,00)	102,00 (88,00; 113,00)	73,70 (66,50; 80,75)	$p_{2-K} < 0,001$ $p_{2-1} < 0,001$

Примечание — ПТ по Квику — протромбиновое время по Квику; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; МНО — международное нормализованное отношение; СРБ — С-реактивный белок.

Таким образом, полученные данные демонстрируют четкую эволюцию лабораторных нарушений в зависимости от тяжести COVID-19. Среднетяжелое течение ассоциировано преимущественно с фазой гиперкоагуляции на фоне выраженного системного воспаления. В свою очередь, тяжелое течение характеризуется переходом в состояние гипокоагуляции (удлинение АЧТВ и ПВ, рост МНО, тромбоцитопения) при сохраняющихся признаках массивного тромбообразования (крайне высокий D-димер), что в совокупности соответствует картине коагулопатии потребления.

### 3.2 Изучение процесса полимеризации фибрина в БТП пациентов с COVID-19

На основании данных, полученных методом динамической турбидиметрии, выявлены значимые различия в показателях кинетики фибринообразования между группами пациентов с различной тяжестью течения COVID-19 (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние степени тяжести течения COVID-19 на кинетику фибринообразования

Показатель	Контроль, n=20	Первая группа (среднее течение), n=138	Вторая группа (тяжелое течение), n=60	Вторая группа (тяжелое течение), подгруппа не получающая гепаринотерапию, n=15
V (скорость полимеризации фибринового сгустка), ед. ОП/с	3,93±2,3	5,44±2,47 p=0,0013	1,12±0,71 p <0,0001	1,00±0,24 p <0,0001
Lag-период, мин	6,2±1,2	3,8±1,1 p=0,0004	9,4±0,8 p <0,0001	9,2±0,3 p <0,0001
A <sub>max</sub> , ед. ОП	1,625±0,433	1,412±0,351	0,576±0,17 p <0,0001	0,551±0,12 p <0,0001

Примечание — ОП — оптическая плотность; A<sub>max</sub> — максимальная оптическая плотность при данной длине волны; p — достоверность различий в сравнении с контролем

Анализ ключевых параметров демонстрирует четкую динамику в зависимости от тяжести заболевания:

1. Скорость полимеризации фибрина (V). Этот параметр, отражающий интенсивность формирования фибриновой сети, был достоверно повышен у пациентов со среднетяжелым течением по сравнению с контролем, что указывает на ускоренное образование сгустка. В противоположность этому, в группе с тяжелым течением, включая подгруппу пациентов, не получавших гепаринотерапию, скорость полимеризации была резко и статистически значимо снижена, свидетельствуя о выраженном угнетении данного процесса.

2. Лаг-период (Lag-период). Время, необходимое для инициации полимеризации фибрина (латентный период), оказалось достоверно укороченным у пациентов со среднетяжелым течением. Это соответствует состоянию

гиперкоагуляции, при котором каскад свертывания активируется быстрее. В группе тяжелого течения лаг-период, напротив, был существенно удлинен, что указывает на нарушение инициации формирования фибрина.

3. Максимальная оптическая плотность ( $A_{\max}$ ). Данный показатель, характеризующий конечную плотность и, косвенно, структурную прочность фибринового сгустка, не имел достоверных отличий от контроля при среднетяжелом течении. Однако в группе тяжелых пациентов наблюдалось резкое и статистически значимое снижение  $A_{\max}$ , что говорит о формировании менее плотного и, следовательно, структурно неполноценного сгустка.

Таким образом, метод турбидиметрии подтвердил, что среднетяжелое течение COVID-19 характеризуется признаками гиперкоагуляции: укорочением времени до начала фибринообразования и увеличением его скорости. Напротив, тяжелое течение отличается признаками выраженной гипокоагуляции: замедлением инициации и скорости полимеризации фибрина, а также формированием сгустка со сниженной плотностью. Важно, что идентичная картина гипокоагуляции по всем трем параметрам была зарегистрирована и в подгруппе тяжелых пациентов, не получавших гепаринотерапию (2Нер), что указывает на эндогенный характер этих нарушений, ассоциированных с самой тяжестью заболевания, а не с антикоагулянтным лечением. Данные выводы наглядно иллюстрируются типичными кинетическими кривыми для каждой исследованной группы (Рисунок 1).

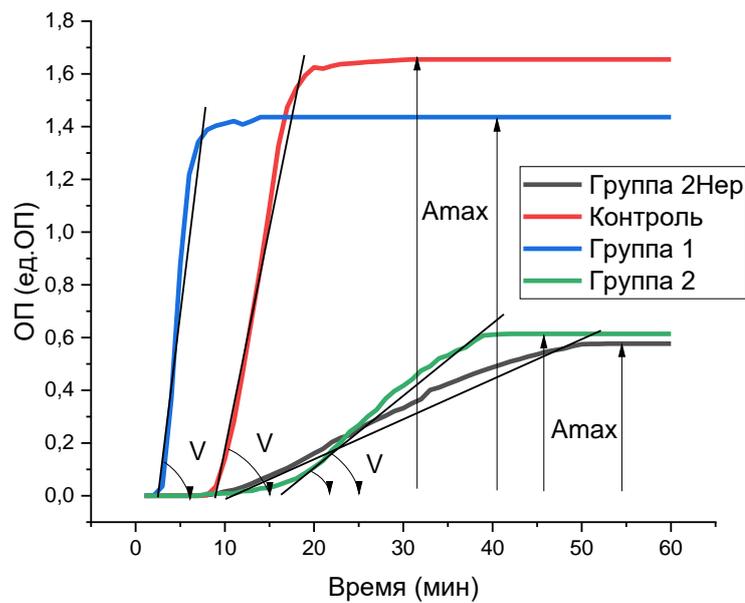


Рисунок 1 – Регистрация кинетики полимеризации фибрина методом динамической турбидиметрии. Определяемые параметры: лаг-период (Lag) — время до начала нарастания плотности;  $V$  — повышение оптической плотности на отрезке ее нарастания в единицу времени;  $A_{\max}$  — максимальная оптическая плотность при данной длине волны; контроль — группа здоровых доноров; группа 1 — среднетяжелое течение; группа 2 — тяжелое течение, пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии; группа 2Нер — пациенты с тяжелым течением, не получавшие гепаринотерапию

### 3.3 Характеристика коагуляционного (плазменного) гемостаза с участием микровезикул пациентов с COVID-19

На основании анализа результатов тромбэластографии на бестромбоцитарной плазме (БТП), представленных в таблице 3, выявлены ключевые различия в состоянии плазменного гемостаза у пациентов в зависимости от тяжести течения COVID-19, а также подтверждена значимая прокоагулянтная роль МВ в данном процессе.

Таблица 3 – Отношение времени активации коагуляции нативного образца к времени активации коагуляции образца после введения МВ

Показатель	Первая группа (среднее течение), n=138		Вторая группа (тяжелое течение), n=75		p	Референсные значения параметров
	Нативный образец, до внесения МВ	После внесения МВ	Нативный образец, до внесения МВ	После внесения МВ		
R	9,4±2,1	8,6±1,7	39,3±4,5	13,7±1,5	p<0,05	9-27 (мин.)
K	1,4±0,4	5,2±1,3	23,6±3,8	10,8±2,2	p<0,05	2-9 (мин.)
Angle	68,2±4,2	39,7±3,5	12,1±1,9	29,4±3,4	p<0,05	22-58 (deg)

Примечание — R — время активации коагуляции нативного образца; K - время формирования сгустка; Angle - угол альфа, отражающий скорость полимеризации фибрина; p — достоверность различий в сравнении между опытными группами.

У пациентов со среднетяжелым течением в нативных образцах плазмы (до внесения МВ) регистрировалась картина гиперкоагуляции: время активации коагуляции находилось на нижней границе или ниже референсного диапазона, время формирования сгустка было укорочено, а угол альфа, отражающий скорость полимеризации фибрина, — повышен. Это согласуется с данными других методов и указывает на повышенную готовность плазменного звена гемостаза к образованию сгустка. В противоположность этому, в нативных образцах пациентов с тяжелым течением выявлялись отчетливые признаки гипокоагуляции: параметр R был резко удлинен, K значительно увеличен, а угол Angle — критически снижен. Данные результаты свидетельствуют о глубоком нарушении инициации и скорости формирования фибринового сгустка.

Эксперимент по оценке влияния добавления МВ в образцы БТП продемонстрировал их выраженное прокоагулянтное действие в обеих группах. Добавление МВ приводило к укорочению времени R и K, а также к увеличению угла Alpha по сравнению с нативными пробами, то есть к нормализации или ускорению кинетики фибринообразования. Важно отметить, что степень этого

влияния коррелировала с исходным состоянием гемостаза. Наиболее выраженный корректирующий эффект МВ наблюдался в образцах с исходной гипокоагуляцией (тяжелое течение), где после их добавления параметры существенно сместились в сторону референсных значений. В пробах с исходной гиперкоагуляцией (среднетяжелое течение) прокоагулянтный эффект МВ также присутствовал, но был статистически и абсолютно менее выражен. Наглядно дифференцированный эффект добавления МВ на кинетику свертывания демонстрируют типичные для каждой из групп тромбоэластограммы (Рисунок 2).

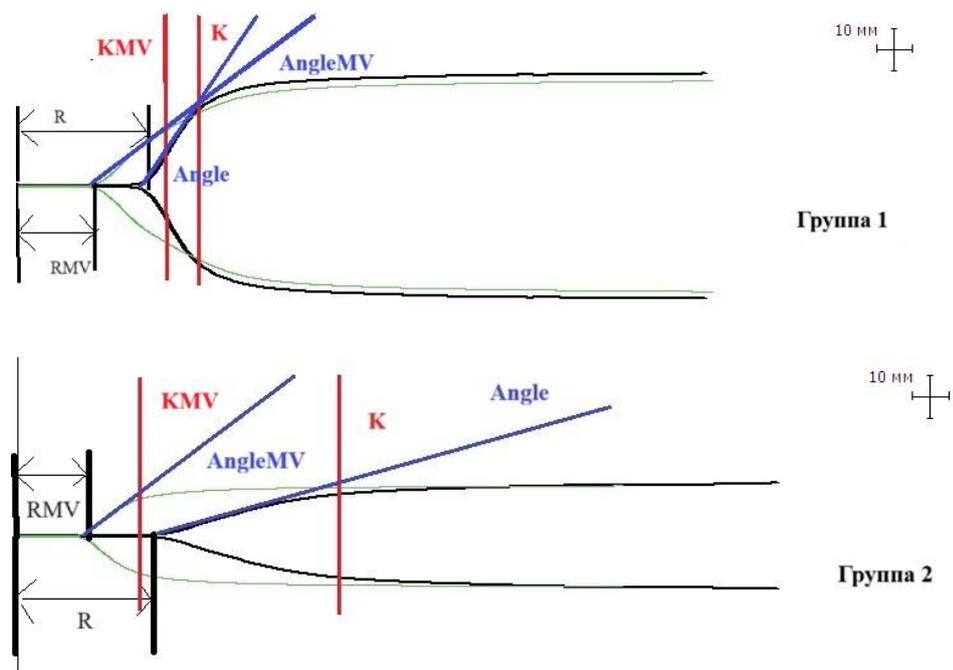


Рисунок 2 – Тромбоэластограммы, демонстрирующие влияние МВ на параметры коагуляции, типичные для каждой из исследуемых групп; Группа 1 – среднетяжелое течение COVID-19; Группа 2 –тяжелое течение COVID-19. R — время активации коагуляции нативного образца; RMV — время активации коагуляции после внесения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

Таким образом, результаты тромбоэластографии полностью согласуются с данными, полученными методом турбидиметрии, и подтверждают наличие двух

различных фаз нарушения плазменного гемостаза при COVID-19: фазы гиперкоагуляции при среднетяжелом и фазы гипокоагуляции при тяжелом течении.

Полученные экспериментальные данные однозначно указывают на то, что микровезикулы выполняют важную компенсаторно-адаптивную функцию, выступая в роли универсальных прокоагулянтных стимуляторов, способных ускорять активацию коагуляции, причем их влияние наиболее значительно именно в условиях ее исходного угнетения.

### 3.4. Подсчет абсолютного количества и фенотипирование микровезикул

Анализ количественного состава и фенотипа циркулирующих микровезикул (МВ) методом проточной цитометрии выявил существенные различия между группами пациентов в зависимости от тяжести течения COVID-19 и контрольной группой.

При сравнении с контрольной группой достоверных различий в абсолютном количестве МВ у пациентов со среднетяжелым течением выявлено не было (Таблица 4). Однако у пациентов с тяжелым течением было зарегистрировано статистически значимое снижение общего количества циркулирующих МВ как относительно контрольной группы, так и относительно группы со среднетяжелым течением.

Таблица 4 – Абсолютное количество МВ в периферической крови пациентов с COVID-19 различной степени тяжести и контрольной группы

Показатель	Категории	Абсолютное количество МВ, *10 <sup>6</sup> /мл		p
		Me	Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub>	
Степень тяжести COVID-19	Группа 1 (среднее течение COVID-19, n=138)	13,15	8,06 – 18,12	p <sub>Тяжелое течение – Среднее течение</sub> < 0,001 p <sub>контроль – Тяжелое течение</sub> = 0,006
	Группа 2 (тяжелое течение COVID-19, n=75)	3,00	1,79 – 4,78	
	Контроль (n=20)	11,17	3,62 – 17,19	

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

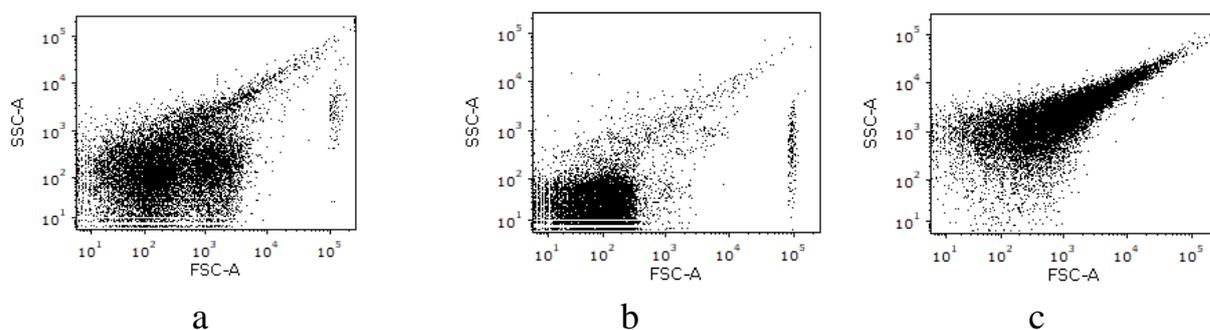


Рисунок 3 – Точечные диаграммы, типичные для каждой из исследуемых групп (а – среднетяжелое течение COVID-19, б – тяжелое течение COVID-19, с - контроль)

При анализе точечных диаграмм рассеяния в образцах пациентов с COVID-19 был идентифицирован гейт с образованиями, не характерными для образцов здоровых доноров (Рисунки 4, 5). По характеристикам светорассеяния (FSC/SSC) эти образования не соответствовали классическим микровезикулам и представляли собой более крупные агрегаты микрочастиц. Дальнейший фенотипический анализ проводился в пределах выделенного гейта, что позволило охарактеризовать клеточное происхождение и специфические маркеры обнаруженных агрегатов.

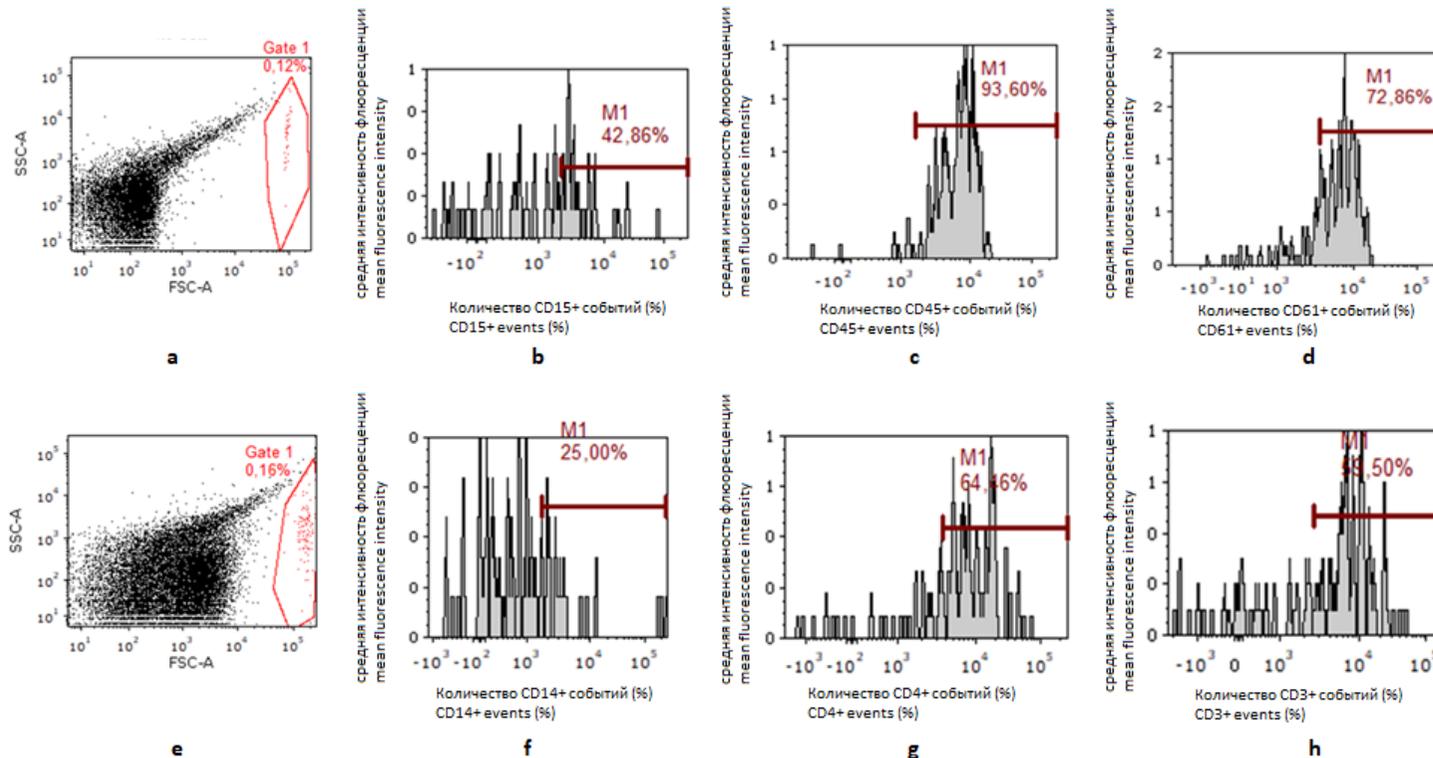


Рисунок 4 – Фенотипический профиль микровезикул типичных для пациентов со среднетяжелым течением COVID-19: проточно-цитометрический анализ – а, е — Точечные диаграммы рассеяния (FSC/SSC) с наложенным аналитическим гейтом, выделяющим популяцию микровезикул для фенотипирования, б — цитофлюорограмма маркера CD15 (нейтрофильное происхождение), с — цитофлюорограмма маркера CD45 (лейкоцитарный маркер), d — цитофлюорограмма маркера CD61 (тромбоцитарное происхождение), f — цитофлюорограмма экспрессии маркера CD14 (моноцитарное происхождение), g — цитофлюорограмма маркера CD4 (Т-хелперные лимфоциты), h — цитофлюорограмма маркера CD3 (Т-лимфоцитарный маркер)

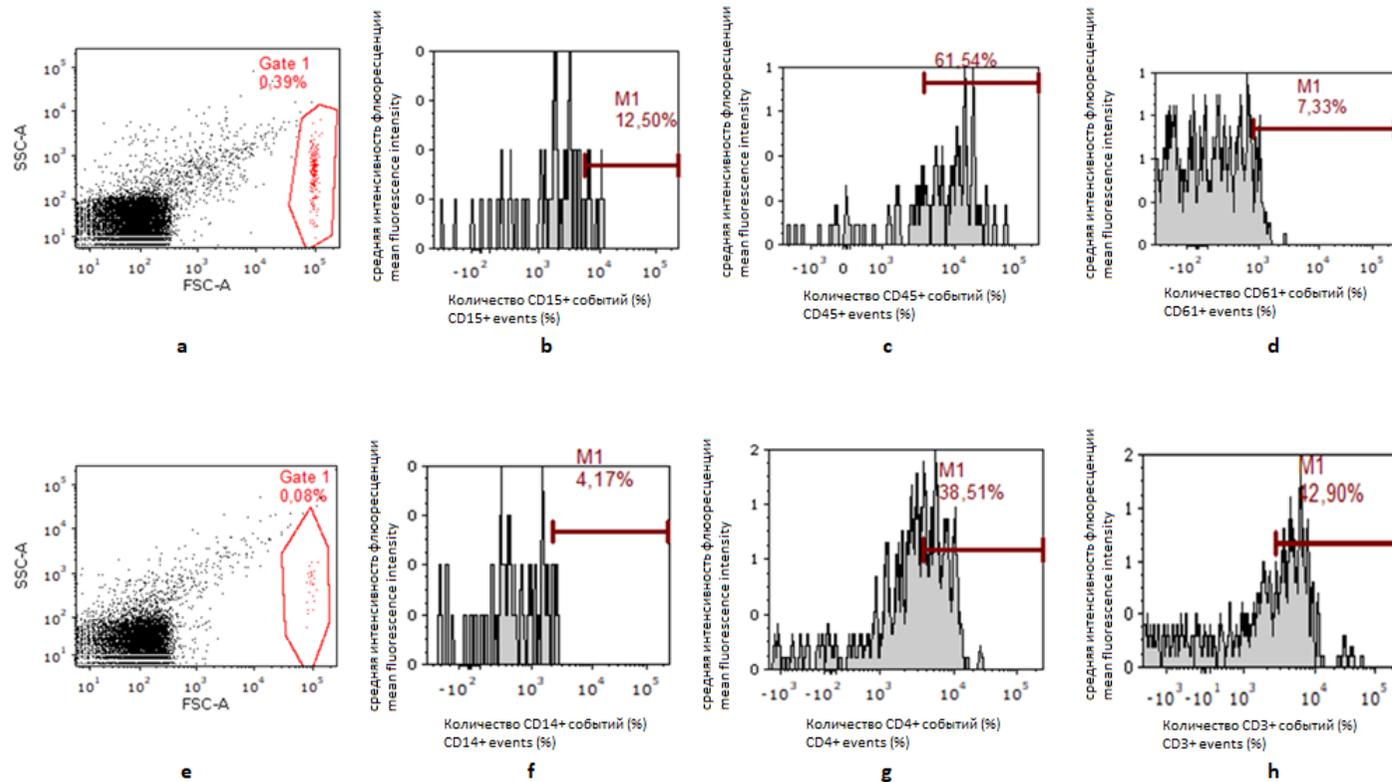


Рисунок 5 – Фенотипический профиль микровезикул типичных для пациентов с тяжелым течением COVID-19: проточно-цитометрический анализ – а, е — Точечные диаграммы рассеяния (FSC/SSC) с наложенным аналитическим гейтом, выделяющим популяцию микровезикул для фенотипирования, б — цитофлюорограмма маркера CD15 (нейтрофильное происхождение), с — цитофлюорограмма маркера CD45 (лейкоцитарный маркер), d — цитофлюорограмма маркера CD61 (тромбоцитарное происхождение), f — цитофлюорограмма экспрессии маркера CD14 (моноцитарное происхождение), g — цитофлюорограмма маркера CD4 (Т-хелперные лимфоциты), h — цитофлюорограмма маркера CD3 (Т-лимфоцитарный маркер)

Исследование экспрессии поверхностных маркеров на МВ продемонстрировало отчетливую разницу в клеточном происхождении МВ между исследуемыми группами (Таблица 5).

Таблица 5 – Содержание МВ в периферической крови пациентов с COVID-19

Параметр	Группа 1 (среднее течение COVID-19, n=138)	Группа 2 (тяжелое течение COVID-19, n=75)	p
CD15 <sup>+</sup> , МВ % M ± SD	53,34 ± 6,92	10,32 ± 4,29	p< 0,001
CD14 <sup>+</sup> , МВ % M ± SD	27,12 ± 3,09	2,17 ± 1,53	p< 0,001
CD45 <sup>+</sup> , МВ % M ± SD	70,67 ± 9,82	37,92 ± 10,00	p< 0,001
CD4 <sup>+</sup> , МВ % M ± SD	68,21 ± 9,56	46,52 ± 3,39	p=0,003
CD61 <sup>+</sup> , МВ % M ± SD	59,74 ± 11,22	20,90 ± 6,01	p< 0,001
CD62 <sup>+</sup> , МВ % M ± SD	55,98 ± 10,11	27,26 ± 5,24	p< 0,001
CD3 <sup>+</sup> , МВ % M ± SD	64,74 ± 11,24	63,33 ± 17,08	p=0,869

У пациентов со среднетяжелым течением в спектре циркулирующих МВ преобладали везикулы тромбоцитарного (CD61<sup>+</sup>) и лейкоцитарного происхождения, включая нейтрофильные (CD15<sup>+</sup>), моноцитарные (CD14<sup>+</sup>) и Т-лимфоцитарные (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>). Также отмечалась высокая экспрессия общего лейкоцитарного маркера (CD45<sup>+</sup>) и маркера активации (CD62<sup>+</sup>). У пациентов с тяжелым течением наблюдалось статистически значимое снижение относительного содержания практически всех субпопуляций МВ. Было зафиксировано резкое уменьшение доли МВ нейтрофильного (CD15<sup>+</sup>) и моноцитарного (CD14<sup>+</sup>) происхождения, а также значимое снижение доли МВ, несущих тромбоцитарный (CD61<sup>+</sup>), общелейкоцитарный (CD45<sup>+</sup>), Т-хелперный (CD4<sup>+</sup>) маркеры и маркер активации (CD62<sup>+</sup>). При этом относительное содержание МВ, несущих общий маркер Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), оставалось стабильным и сопоставимым в обеих группах пациентов, что указывает на сохранение данной популяции на фоне общего снижения пула МВ. Стабильность данной популяции МВ, на фоне значительного снижения общего количества МВ при тяжелом течении, может косвенно свидетельствовать об их интенсивном образовании. Данное наблюдение согласуется с известными данными о выраженных

апоптотических процессах в лимфоидной ткани при COVID-19 [16]. Высвобождение микровезикул является неотъемлемым компонентом апоптоза, что может поддерживать относительный уровень лимфоцитарных МВ в циркуляции даже на фоне общего истощения пула и снижения продукции МВ другими клетками. На рисунке 6 изображено процентное соотношение фенотипического состава МВ, присутствующих в исследуемых агрегатах при различной степени тяжести COVID-19.

**Доля микровезикул, экспрессирующих специфические маркеры при различной степени тяжести COVID-19**

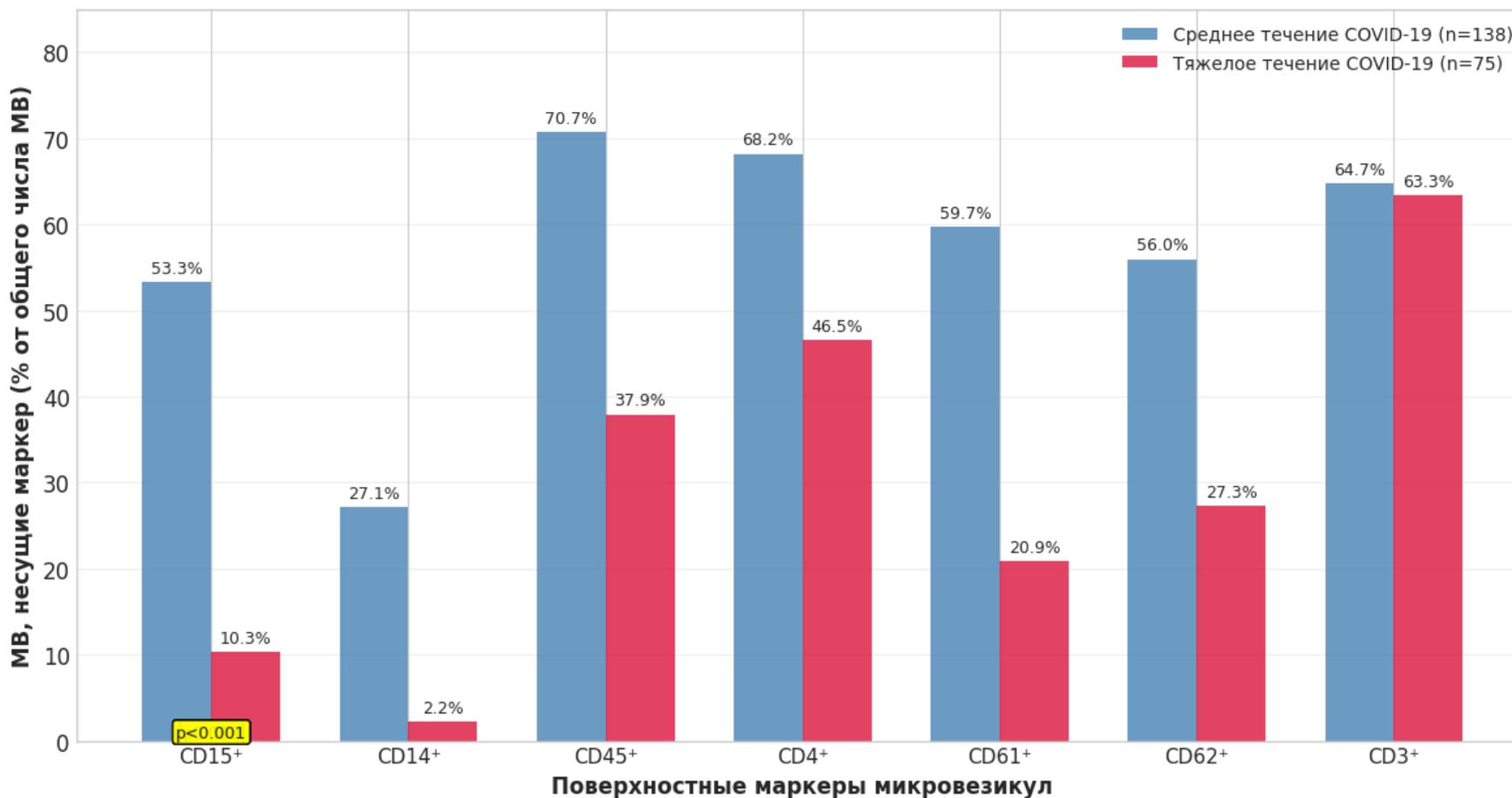


Рисунок 6 – Процентное соотношение MB разного фенотипа в исследуемых агрегатах в зависимости от степени тяжести COVID-19

При окрашивании образцов БТП пациентов с COVID-19 двойными метками моноклональных антител флуоресцентным интеркалирующим красителем для визуализации ДНК-содержащих фрагментов - пропидий йодидом (PI) и моноклалальными антителами CD15, CD61, CD3 были получены результаты, представленные в таблице 6.

Таблица 6 – Содержание в образцах БТП пациентов с COVID-19 различной степени тяжести МВ с двойной позитивной флуоресценцией по ДНК (PI<sup>+</sup>) и моноклональным антителам CD3, CD61, CD15

Параметр	Степень тяжести		P
	Группа 1 (среднее течение COVID-19, n=138)	Группа 2 (тяжелое течение COVID-19, n=75)	
CD3 <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> , M±SD	41,67±5,14	20,03±8,21	0,018
CD61 <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> , M±SD	70,57±8,49	19,43±4,07	< 0,001
CD15 <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> , МВ % M±SD	20,33±1,53	9,23±1,07	< 0,001

Примечание — PI – пропидиум йодид

У пациентов обеих групп определяются частицы, флуоресцирующие по метке PI<sup>+</sup>, что свидетельствует о присутствии нуклеиновых кислот. При двойной флуоресценции стало очевидно, что фрагменты нуклеиновых кислот (ДНК) несут на себе и МВ нейтрофильного, лимфоцитарного и тромбоцитарного происхождения. Относительно степени тяжести пациентов отмечается статистически значимое снижение содержания исследуемых фрагментов при тяжелом течении заболевания COVID-19.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что среднетяжелое течение COVID-19 характеризуется активным высвобождением в кровотоки разнообразных по происхождению МВ (преимущественно из тромбоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов), что может играть роль в реализации прокоагулянтного потенциала и поддержании гиперкоагуляции. При тяжелом течении наблюдается истощение пула циркулирующих МВ, за исключением субпопуляции, происходящей из Т-лимфоцитов. Снижение количества и изменение фенотипического профиля МВ, ассоциированных с нейтрофилами и

тромбоцитами, может быть одним из факторов, способствующих развитию гипокоагуляции и нарушений фибринообразования, выявленных другими методами.

### **3.5 Корреляционный анализ взаимосвязи абсолютного количества микровезикул и основных лабораторных показателей**

#### **3.5.1 Взаимосвязь уровня циркулирующих микровезикул с маркерами воспаления и фибринолиза при среднетяжелом течении COVID-19**

##### **Корреляционный анализ взаимосвязи между абсолютным количеством МВ и Д-димером**

В ходе исследования у пациентов с тяжелым течением COVID-19 был проведен корреляционный анализ для изучения взаимосвязи между абсолютным количеством циркулирующих МВ и концентрацией Д-димера в плазме крови. Исследование проводилось в когорте пациентов с COVID-19 средней степени тяжести. Для оценки силы и направленности корреляционной зависимости использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена, что обусловлено ненормальным распределением исследуемых показателей (подтвержденным критериями Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова,  $p < 0,05$ ).

Проведенный статистический анализ выявил значимую прямую корреляционную зависимость (рисунок 7) высокой степени между абсолютным количеством циркулирующих МВ и плазменной концентрацией Д-димера в когорте пациентов с COVID-19 средней степени тяжести.

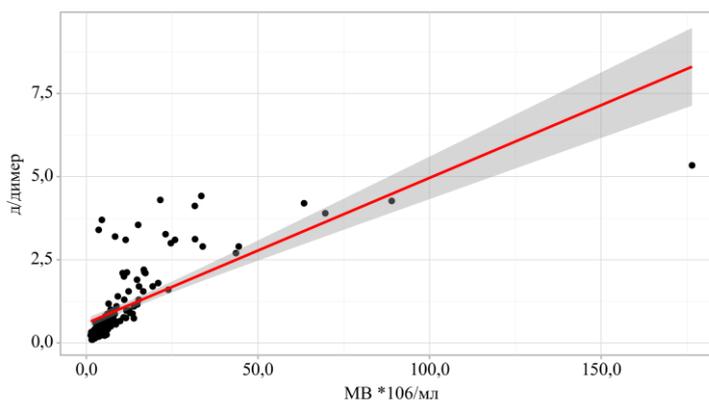


Рисунок 7 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации Д-димера у пациентов со средним течением COVID-19

Регрессионная модель:

Обнаруженная зависимость может быть описана уравнением парной линейной регрессии следующего вида:

$$Y_{\text{Д/димер}} = 0,044 \times X_{\text{МВ *106/мл}} + 0,592 \quad (1)$$

При увеличении количества МВ на 1 следует ожидать увеличение Д-димера на 0,044. Полученная модель объясняет 52,5% наблюдаемой дисперсии Д-димера.

Корреляционный анализ взаимосвязи между абсолютным количеством МВ и СРБ

Проведен статистический анализ взаимосвязи между количественными показателями циркулирующих МВ и уровнем СРБ в сыворотке крови.

Для оценки корреляционной зависимости использовали:

- Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (для ненормально распределенных данных)
- Линейный регрессионный анализ (при нормальном распределении параметров)

Исследование направлено на выявление возможной связи между:

- Активностью микровезикулярных процессов
- Системным воспалительным ответом, оцениваемым по уровню СРБ

Статистический анализ выявил статистически значимую прямую корреляцию (рисунок 8) умеренной силы между абсолютной концентрацией циркулирующих МВ и уровнем С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови.

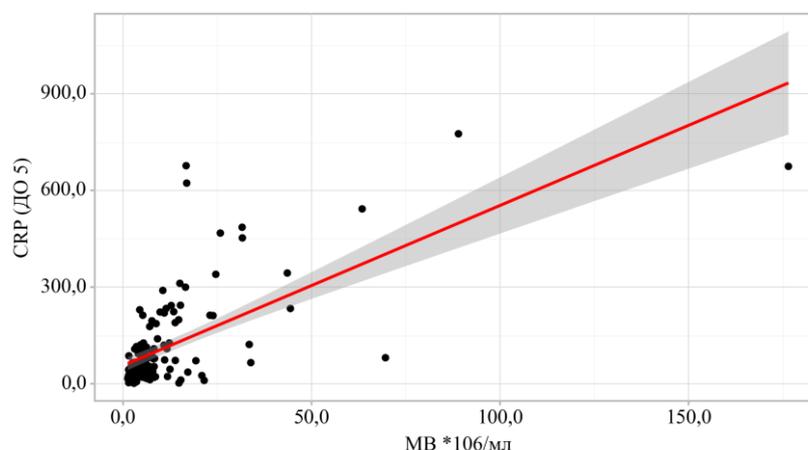


Рисунок 8 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость СРБ от абсолютного количества МВ

Установленная взаимосвязь описывается уравнением линейной регрессии:

$$Y_{\text{CRP (ДО 5)}} = 4,97 \times X_{\text{МВ}} * 10^6/\text{мл} + 56,559 \quad (2)$$

Интерпретация параметров модели: коэффициент регрессии (4,97) указывает, что при увеличении концентрации МВ на  $1 \times 10^6$  частиц/мл ожидается рост уровня СРБ в среднем на 4,97 мг/л.

Коэффициент детерминации ( $R^2=0,434$ ) свидетельствует о 43,4% вариабельности показателей СРБ, что объясняется изменениями концентрации МВ.

Полученные данные демонстрируют взаимное усиление микровезикулярной активности и системного воспалительного ответа. Установлена двусторонняя связь между уровнем циркулирующих микровезикул и концентрацией С-реактивного белка: с одной стороны, активация микровезикуляции стимулирует продукцию провоспалительных маркеров, с другой стороны, сам воспалительный процесс через цитокиновые медиаторы индуцирует повышенное высвобождение микровезикул из активированных клеток.

#### Корреляционный анализ взаимосвязи между абсолютным количеством МВ и ферритином

В рамках исследования также был проведен корреляционный анализ для оценки взаимосвязи между абсолютным количеством циркулирующих МВ и уровнем ферритина в сыворотке крови.

Методологический подход:

- Использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $\rho$ ) в связи с ненормальным распределением показателей;
- Предварительно выполнена проверка нормальности распределения (критерий Шапиро-Уилка,  $p < 0,05$ );
- Рассчитаны 95% доверительные интервалы для коэффициента корреляции.

Анализ направлен на выявление возможной связи между активностью микровезикулярных процессов и показателями системного воспаления и метаболизма железа.

Статистический анализ выявил статистически значимую прямую корреляцию (рисунок 9) умеренной силы между абсолютной концентрацией циркулирующих МВ и уровнем ферритина в сыворотке крови (20-200 нг/мл), результаты представлены в таблице 7.

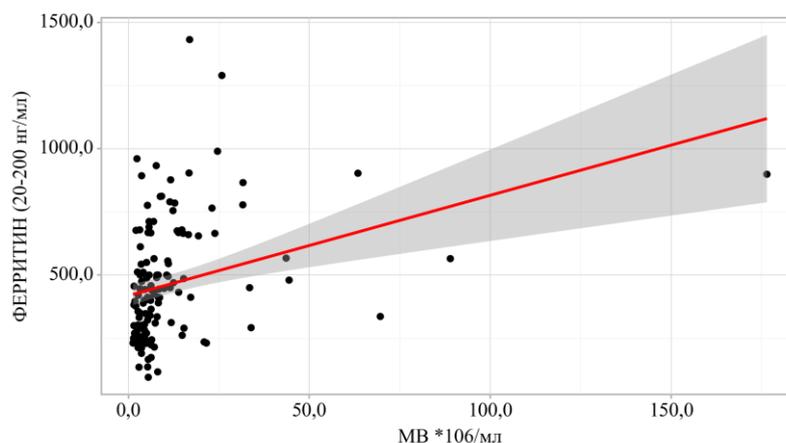


Рисунок 9 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость ферритина от абсолютного количества МВ

Установленная взаимосвязь описывается следующим уравнением линейной регрессии:

$$Y_{\text{ферритин (20-200 нг/мл)}} = 3,972 \times X_{\text{МВ * 10}^6/\text{мл}} + 418,419 \quad (3)$$

Коэффициент регрессии (3,972) демонстрирует, что каждое увеличение концентрации МВ на  $1 \times 10^6$  частиц/мл ассоциировано с повышением уровня ферритина в среднем на 3,972 нг/мл.

Коэффициент детерминации ( $R^2=0,102$ ) объясняет 10,2% общей вариабельности показателей ферритина, что может быть объяснено изменениями концентрации МВ.

Полученные данные свидетельствуют о наличии умеренной, но статистически значимой связи между микровезикулярной активностью и уровнем ферритина, что может отражать:

1. Участие МВ в процессах системного воспаления
2. Возможную роль в регуляции метаболизма железа.

Низкое значение коэффициента детерминации (10,2%) предполагает наличие других значимых факторов, влияющих на уровень ферритина, не учтенных в данной модели.

Таблица 7 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи абсолютного количества МВ с маркерами воспаления и фибринолиза у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	$\rho$	Теснота связи по шкале Чеддока	p
МВ ( $*10^6$ /мл) - Д-димер (мг/л)	0,882	Высокая	< 0,001
МВ ( $*10^6$ /мл) – СРБ (мг/л)	0,589	Заметная	< 0,001
МВ ( $*10^6$ /мл) – ферритин (нг/мл)	0,459	Умеренная	< 0,001

В соответствии с полученными данными (таблица 7), наибольшая теснота связи выявлена для пары «МВ — Д-димер» ( $\rho = 0,882$ ;  $p < 0,001$ ), что подтверждает ключевую роль МВ в тромбиногенезе. Корреляция МВ с СРБ ( $\rho = 0,589$ ;  $p < 0,001$ ) характеризуется как заметная, тогда как с ферритином ( $\rho = 0,459$ ;  $p < 0,001$ ) — как

умеренная, что в совокупности отражает вовлеченность МВ в системное тромбовоспаление.

### 3.5.2 Взаимосвязь уровня циркулирующих микровезикул с маркерами воспаления и фибринолиза при тяжелом течении COVID-19

#### Корреляционный анализ взаимосвязи между абсолютным количеством МВ и Д-димером

Для оценки распределения количественных показателей применялся критерий Шапиро-Уилка. Поскольку распределение значений отличалось от нормального, направление и сила корреляционной связи определялись с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистическая значимость различий устанавливалась при уровне  $p < 0,05$ .

Результаты корреляционного анализа (таблица 8) выявили статистически значимую ( $p < 0,001$ ) обратную корреляцию (рисунок 10) высокой степени ( $\rho = -0,769$ ) между уровнем МВ и концентрацией Д-димера.

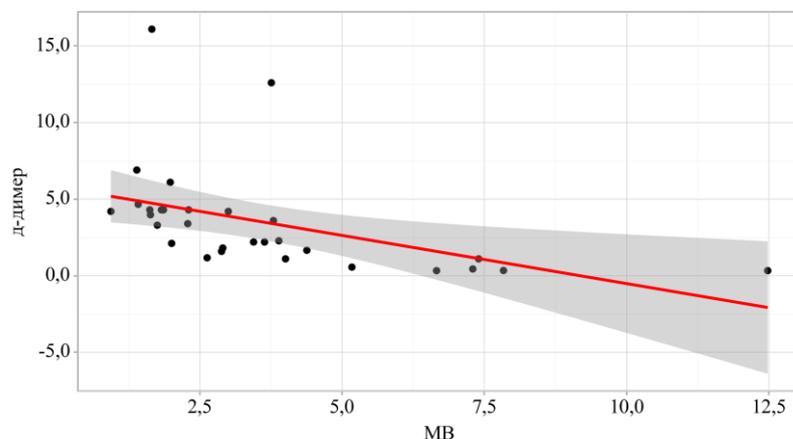


Рисунок 10 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации Д-димера у пациентов с тяжелым течением COVID-19

Линейная регрессионная модель зависимости Д-димера от МВ описывается уравнением:

$$Y_{\text{Д-димер}} = -0,629 \times X_{\text{МВ}} + 5,777 \quad (4)$$

Согласно модели, увеличение МВ на единицу ассоциировано со снижением уровня Д-димера на 0,629. Коэффициент детерминации ( $R^2 = 0,213$ ) указывает, что данная модель объясняет 21,3% вариабельности показателя Д-димера.

#### Корреляционный анализ взаимосвязи между МВ и ферритином

Анализ корреляции между МВ и ферритином (таблица 8) показал наличие статистически значимой ( $p = 0,001$ ) обратной связи заметной силы ( $\rho = -0,558$ ).

Графическая интерпретация регрессионной зависимости представлена на Рисунке 11.

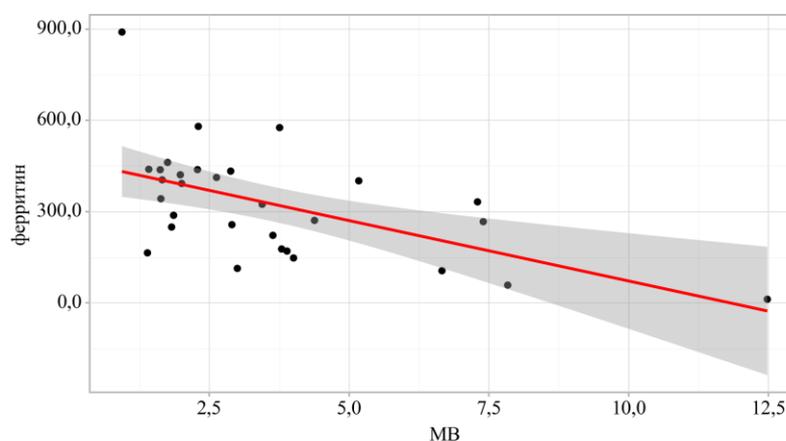


Рисунок 11 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации ферритина у пациентов с тяжелым течением COVID-19

Регрессионная модель зависимости ферритина от МВ выражается уравнением:

$$Y_{\text{ферритин}} = -39,687 \times X_{\text{МВ}} + 468,898 \quad (5)$$

Согласно модели, рост МВ на единицу сопровождается снижением уровня ферритина на 39,687. Коэффициент детерминации ( $R^2 = 0,311$ ) свидетельствует, что 31,1% вариативности ферритина объясняется изменениями МВ.

#### Корреляционный анализ взаимосвязи между абсолютным количеством МВ и СРБ

Корреляционный анализ выявил статистически значимую ( $p < 0,001$ ) обратную корреляцию (рисунок 12) высокой степени ( $\rho = -0,708$ ) между МВ и уровнем СРБ.

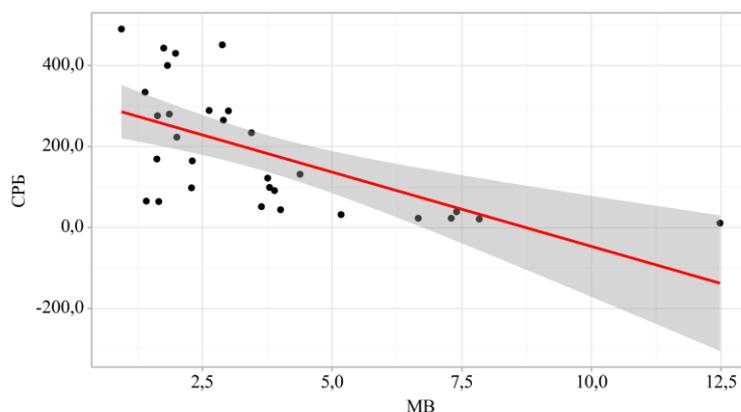


Рисунок 12 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации СРБ у пациентов с тяжелым течением COVID-19

Линейная регрессионная модель зависимости СРБ от МВ описывается уравнением:

$$Y_{\text{СРБ}} = -36,665 \times X_{\text{МВ}} + 320,191 \quad (6)$$

Согласно модели, увеличение МВ на единицу приводит к снижению СРБ на 36,665. Коэффициент детерминации ( $R^2=0,380$ ) показывает, что 38,0% вариабельности СРБ обусловлено изменениями МВ.

Таблица 8 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи абсолютного количества МВ с маркерами воспаления и фибринолиза у пациентов с тяжелым течением COVID-19

Показатель	Характеристика корреляционной связи		
	$\rho$	Теснота связи по шкале Чеддока	$p$
МВ ( $\cdot 10^6/\text{мл}$ ) - Д-димер (мг/л)	-0,769	Высокая	<0,001
МВ ( $\cdot 10^6/\text{мл}$ ) – СРБ (мг/л)	-0,558	Заметная	0,001
МВ ( $\cdot 10^6/\text{мл}$ ) – ферритин (нг/мл)	-0,708	Высокая	<0,001

В группе пациентов с тяжелым течением COVID-19 установлены статистически значимые обратные корреляционные связи высокой и заметной силы между уровнем циркулирующих МВ и всеми исследованными маркерами (таблица 8). Наиболее выраженная обратная зависимость выявлена для пары «МВ

— Д-димер» ( $\rho = -0,769$ ;  $p < 0,001$ ) и «МВ — ферритин» ( $\rho = -0,708$ ;  $p < 0,001$ ), несколько слабее — для пары «МВ — СРБ» ( $\rho = -0,558$ ;  $p = 0,001$ ), что свидетельствует о сопряженном снижении данных показателей на фоне истощения микровезикулярного пула при тяжелом течении заболевания. Полученные регрессионные модели позволяют количественно оценить влияние изменения абсолютного количества МВ на уровень исследуемых маркеров.

### **3.6 Визуализация структурной организации микровезикул и нейтрофильных внеклеточных ловушек в бестромбоцитарной плазме методом конфокальной микроскопии**

С применением методов конфокальной лазерной микроскопии у пациентов со средним течением COVID-19 обнаружены фрагменты нитеобразных структур, позитивных по DAPI, на которых экспрессируются МВ нейтрофильного ( $CD15^+FITC$ ) и тромбоцитарного происхождения ( $CD62^+APC$ ) (рисунок 13). С помощью лазера, флуоресцирующего по CD62 зафиксированы скопления микрочастиц размером около 15 мкм.

При среднетяжелом течении COVID-19 в структурах НВЛ выявлены МВ, экспрессирующие не только маркеры клеточного происхождения ( $CD15^+$ ,  $CD61^+$ ), но и тканевой фактор  $TF^+$  (рисунок 14). Колокализация  $TF^+$ -МВ с нитями ДНК свидетельствует о формировании функционально активных прокоагулянтных платформ, способных инициировать каскад свертывания непосредственно в зоне воспаления.

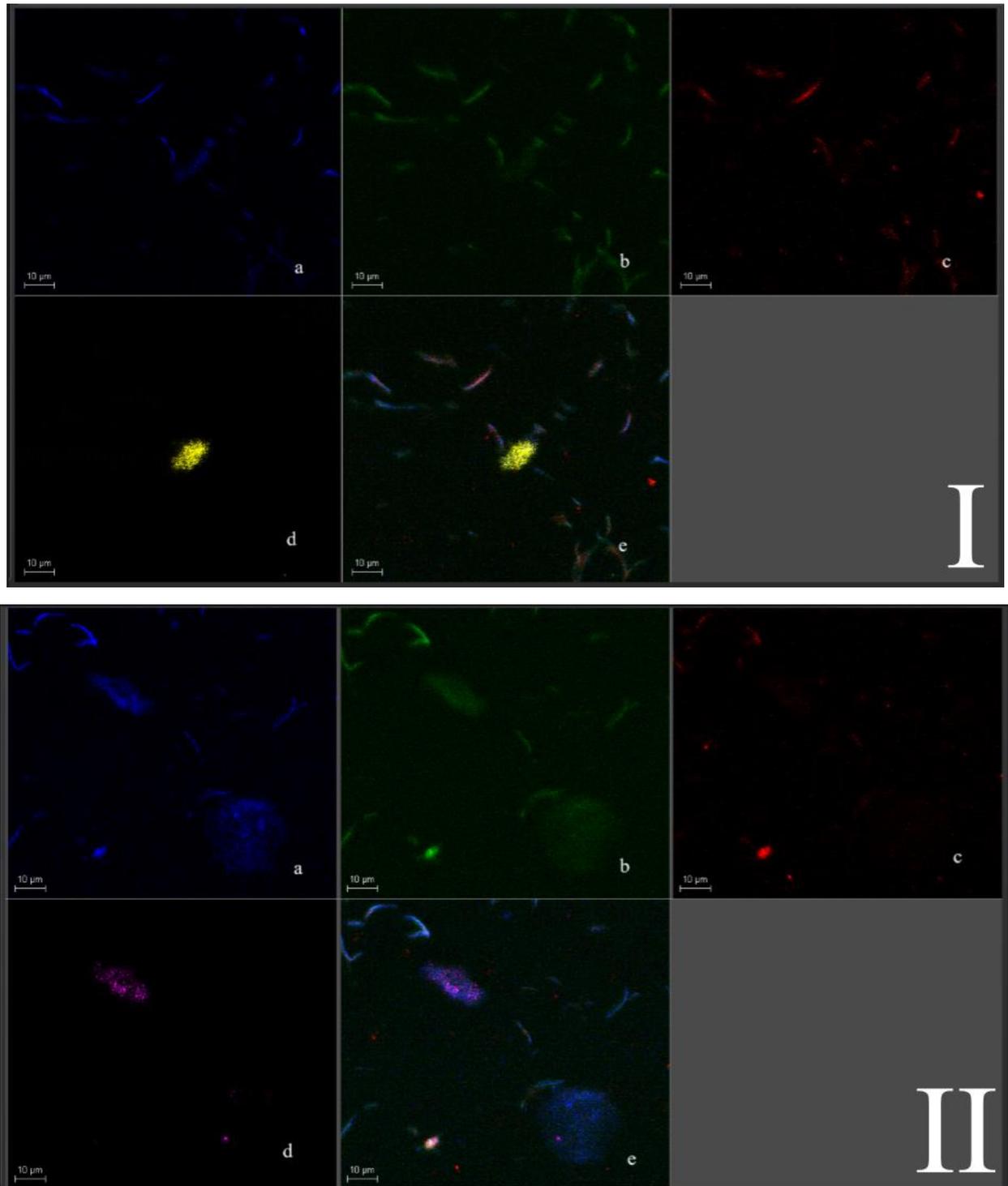


Рисунок 13 – Флуоресценция фрагментов ДНК и МВ в БТП пациентов со средним течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК, окрашенные DAPI, б - моноклональные антитела к CD15, меченные флуорохромом FITC, с - CD13, меченные флуорохромом PE, d – скопление микрочастиц, позитивных по CD62, меченные флуорохромом APC, e – наложение четырех каналов красителей);

Примечание: I – поле зрения 1, II – поле зрения 2.

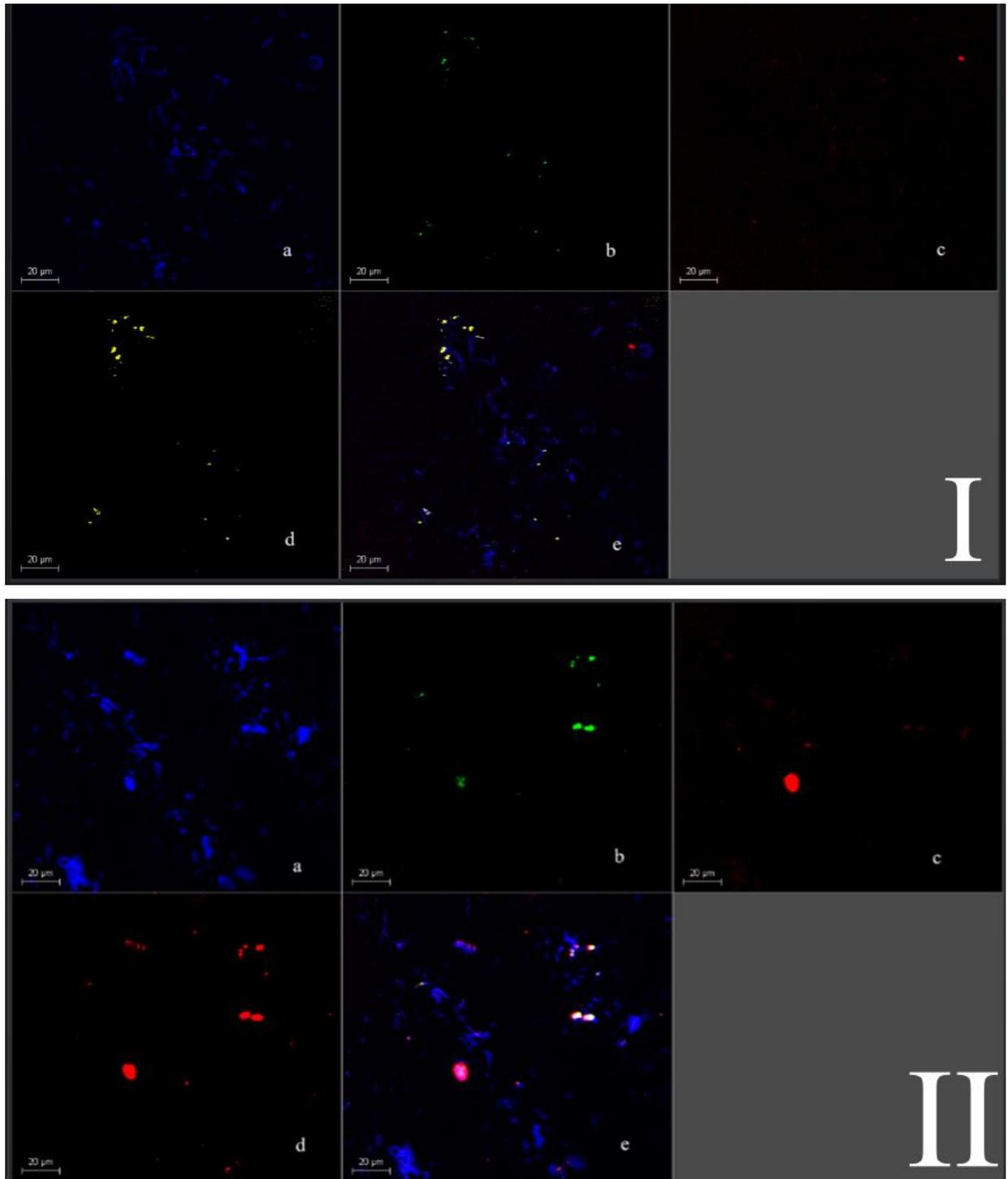


Рисунок 14 – Визуализация фрагментов ДНК и микровезикул в БТП пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК, окрашенные DAPI, b –MB, CD61<sup>+</sup>, флуорохром FITC, с – TF<sup>+</sup>, флуорохром PE, d – MB, CD15<sup>+</sup>, флуорохром APC, e – наложение четырех каналов красителей);  
Примечание: I – поле зрения 1, II – поле зрения 2.

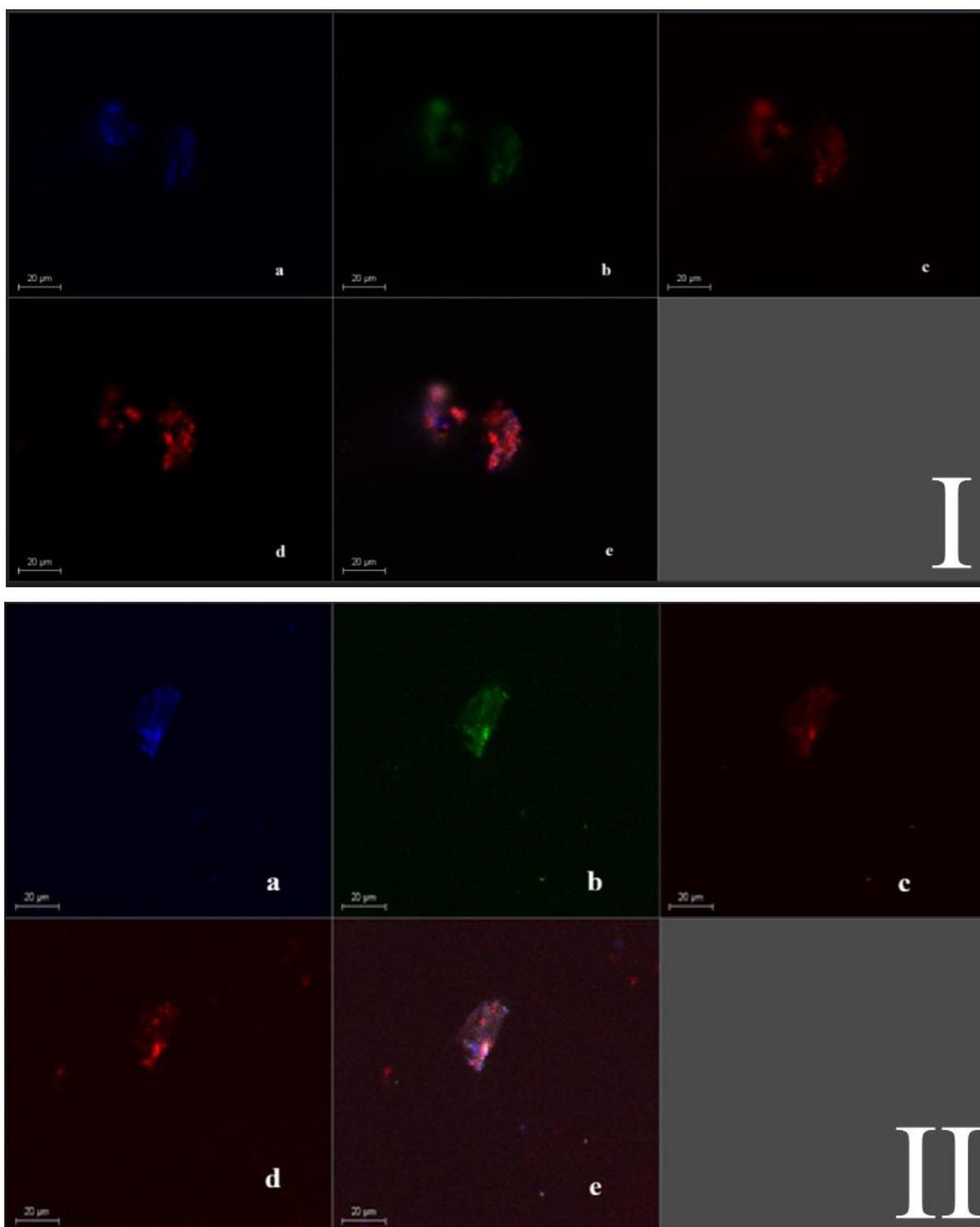


Рисунок 15 – Флуоресценция фрагментов ДНК и МВ в БТП пациентов с тяжелым течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК, окрашенные DAPI, б - моноклональные антитела к CD15<sup>+</sup>, флуорохром FITC, с - CD13<sup>+</sup>, флуорохром PE, d – моноклональные антитела к CD62<sup>+</sup>, флуорохром APC, е – наложение четырех каналов красителей);

Примечание: I – поле зрения 1, II – поле зрения 2.

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 по CD13, CD15 и агрегаты микрочастиц, флуоресцирующих по CD62 размером до 28 мкм (рисунок 15).

В образцах пациентов с тяжелым течением COVID-19 отмечено снижение интенсивности флуоресценции CD13, что косвенно свидетельствует о массивной дегрануляции и утрате мембранных маркеров вследствие гиперстимуляции.

При конфокальной микроскопии установлено, что популяция циркулирующих микровезикул гетерогенна: наряду с единичными частицами размером менее 1 мкм присутствуют крупные агрегаты, несущие одновременно тромбоцитарные и нейтрофильные маркеры. При тяжелом течении COVID-19 доля таких агрегатов увеличивается, что, вероятно, обусловлено нарушением регуляторных механизмов микровезикуляции.

## ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование позволило установить ключевые патогенетические особенности нарушений системы гемостаза у пациентов с COVID-19, в центре которых находится роль МВ как интеграторов тромботического и воспалительного ответа. Полученные данные выявляют закономерную взаимосвязь между характером коагулопатии и степенью тяжести COVID-19, а также обнаруживают ранее неизученные аспекты микровезикулярного участия в процессах тромбообразования.

Анализ стандартных лабораторных параметров выявил четкую дифференциацию между среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, что согласуется с данными литературы о бифазности коагулопатии при рассматриваемом заболевании [18, 58, 69]. У пациентов со среднетяжелым течением была зарегистрирована картина гиперкоагуляции: укорочение АЧТВ и значимое повышение уровня фибриногена на фоне выраженного воспалительного ответа (рост СРБ и ферритина). Эта фаза соответствует концепции «септического» или «воспалительного» протромботического состояния, описанного у пациентов с COVID-19 [27, 69]. В противоположность этому, у пациентов с тяжелым течением развивалась коагулопатия потребления: наряду с экстремальным ростом маркера фибринолиза Д-димера наблюдалось удлинение АЧТВ и протромбинового времени, снижение протромбинового индекса по Квику и тромбоцитопения. Подобная динамика — от гиперкоагуляции к гипокоагуляции с признаками потребления факторов свертывания — характерна для прогрессирования ДВС-синдрома, что подтверждается исследованиями Levi M. et al. и Iba T. et al. [58, 60]. Важно отметить, что выявленная тромбоцитопения и снижение фибриногена при тяжелом течении, несмотря на сохраняющийся высокий уровень Д-димера, указывают на истощение гемостатического потенциала на фоне персистирующей активации тромбообразования и фибринолиза [121, 133].

Применение метода динамической турбидиметрии позволило получить уникальные данные о функциональном состоянии плазменного звена гемостаза *in vitro*. Результаты полностью подтвердили и уточнили выводы, сделанные на основании стандартной коагулограммы. У пациентов со среднетяжелым течением выявлено достоверное укорочение лаг-периода и увеличение скорости полимеризации фибрина ( $V$ ), что является прямым доказательством ускоренной инициации и протекания каскада свертывания. Эти данные коррелируют с укорочением времени активации ( $R$ ) при ТЭГ и свидетельствуют о высокой готовности плазмы к генерации тромбина и образованию сгустка, что является сутью состояния гиперкоагуляции [118, 224].

У пациентов с тяжелым течением, включая подгруппу, не получавшую гепаринотерапию, зафиксирована диаметрально противоположная картина: значительное удлинение лаг-периода, резкое снижение скорости полимеризации и максимальной оптической плотности сгустка ( $A_{\max}$ ). Эти параметры однозначно указывают на глубокое угнетение как инициации, так и конечного этапа формирования фибриновой сети, характерное для гипокоагуляции и коагулопатии потребления. Согласование результатов в подгруппах пациентов с тяжелым течением, получавших и не получавших гепаринотерапию, доказывает, что наблюдаемая гипокоагуляция является эндогенным патогенетическим феноменом тяжелого течения COVID-19, а не следствием антикоагулянтной терапии. Полученные данные о структурно неполноценном, менее плотном сгустке (снижение  $A_{\max}$ ) при тяжелом течении дополняют представления о качественных нарушениях фибрина при COVID-19, описанных Whyte C.S. et al. [98].

Экспериментальное исследование с использованием тромбоэластографии с добавлением МВ в бестромбоцитарную плазму (БТП) предоставило прямые доказательства их мощной прокоагулянтной активности. Во всех образцах добавление МВ приводило к укорочению времени активации коагуляции ( $R$ ) и времени формирования сгустка ( $K$ ), а также к увеличению угла альфа ( $\alpha$ ). Наиболее выраженный корригирующий эффект наблюдался в пробах пациентов с тяжелым

течением, где исходные параметры указывали на гипокоагуляцию: после внесения МВ значения R, K и  $\alpha$  значительно смещались в сторону референсного диапазона. Эти результаты имеют принципиальное значение. Они демонстрируют, что МВ выполняют компенсаторно-адаптивную функцию, выступая в роли универсального прокоагулянтного буфера, способного усиливать коагуляционный ответ, особенно в условиях его исходного угнетения. Данный эффект объясняется, прежде всего, экспрессией на поверхности МВ фосфатидилсерина (ФС), который служит каталитической платформой для сборки теназного и протромбиназного комплексов [35, 179], а также возможным присутствием тканевого фактора [79]. Полученные данные согласуются с работами, показывающими, что МВ пациентов с COVID-19 ускоряют генерацию тромбина *in vitro* [118] и что их прокоагулянтный потенциал коррелирует с тяжестью заболевания [36, 175]. Таким образом, истощение пула циркулирующих МВ при тяжелом течении, выявленное в нашем исследовании, можно рассматривать не только как лабораторный феномен, но и как патогенетический фактор, усугубляющий коагулопатию потребления за счет утраты этого компенсаторного механизма.

Результаты проточной цитофлуориметрии выявили динамическую перестройку микровезикулярного профиля в зависимости от тяжести COVID-19. У пациентов со среднетяжелым течением общее количество МВ значительно не отличалось от контроля, однако их фенотипический состав свидетельствовал о системной клеточной активации: в циркуляции доминировали МВ тромбоцитарного (CD61<sup>+</sup>), нейтрофильного (CD15<sup>+</sup>), моноцитарного (CD14<sup>+</sup>) и Т-лимфоцитарного (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) происхождения, а также МВ, несущие маркер активации CD62<sup>+</sup> (P-селектин). Такой профиль отражает массивную активацию тромбоцитов, нейтрофилов и эндотелия, что является основой патогенеза тромбовоспаления при COVID-19 [16, 187].

У пациентов с тяжелым течением зафиксировано статистически значимое снижение общего количества МВ, а также резкое уменьшение относительной доли практически всех субпопуляций, за исключением МВ, несущих общий маркер Т-

лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>). Особенно выраженным было падение доли МВ нейтрофильного (CD15<sup>+</sup>), моноцитарного (CD14<sup>+</sup>) и тромбоцитарного (CD61<sup>+</sup>) происхождения. Это снижение коррелирует с развитием тромбоцитопении и, вероятно, отражает несколько процессов: потребление прокоагулянтных МВ в формирующихся тромбах; возможное истощение клеток-предшественниц (нейтрофилов, тромбоцитов) в условиях тяжелого воспаления и ДВС-синдрома; изменение характера клеточной гибели или активации. Стабильный уровень CD3<sup>+</sup> МВ на фоне общего снижения пула может косвенно свидетельствовать об интенсивных апоптотических процессах в лимфоидной ткани, характерных для тяжелого COVID-19 [3], поскольку высвобождение МВ является неотъемлемым компонентом апоптоза.

Проведенный корреляционный анализ выявил принципиально разные паттерны взаимосвязей между уровнем МВ и ключевыми биомаркерами на разных стадиях заболевания. При среднетяжелом течении установлены прямые корреляции высокой и умеренной силы между абсолютным количеством МВ и уровнем Д-димера ( $\rho=0.882$ ), СРБ ( $\rho=0.589$ ) и ферритина ( $\rho=0.459$ ). Эти данные имеют фундаментальное значение. Они убедительно доказывают, что в фазу гиперкоагуляции микровезикуляция тесно интегрирована в единый патологический контур «тромбовоспаления». Высокая корреляция с Д-димером указывает на прямую связь между количеством циркулирующих МВ и интенсивностью процессов тромбообразования и фибринолиза. Корреляция с маркерами острой фазы (СРБ, ферритин) подтверждает, что высвобождение МВ является частью системного воспалительного ответа, индуцированного SARS-CoV-2. Подобные взаимосвязи описаны в ряде исследований, где уровень МВ коррелировал с тяжестью COVID-19 и риском тромбозов [36, 175, 187].

При тяжелом течении характер корреляций кардинально меняется: выявлены обратные корреляции высокой степени между МВ и теми же маркерами — Д-димером ( $\rho=-0.769$ ), СРБ ( $\rho=-0.708$ ) и ферритином ( $\rho=-0.558$ ). Этот парадоксальный на первый взгляд результат находит логичное объяснение в контексте

коагулопатии потребления. Экстремально высокие уровни Д-димера и маркеров воспаления при тяжелом течении отражают активацию коагуляции и воспаления. Одновременное снижение количества МВ, как показано выше, может быть следствием их активного потребления в формирующихся микротромбах и истощения клеток-продуцентов. Таким образом, на этой стадии низкий уровень МВ ассоциирован с худшим прогнозом, выступая индикатором истощения компенсаторных возможностей системы гемостаза и перехода в фазу декомпенсации.

Наиболее значимым и новым результатом исследования является визуальное и цитометрическое доказательство формирования структурных комплексов «НВЛ-МВ». Методами проточной цитометрии с двойным окрашиванием (PI/CD15, PI/CD61, PI/CD3) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в БТП пациентов были обнаружены агрегаты микрочастиц, экспрессирующие маркеры нейтрофилов (CD15<sup>+</sup>) и тромбоцитов (CD61<sup>+</sup>) одновременно с фрагментами ДНК (PI<sup>+</sup>); нитевидные структуры, позитивные по DAPI (ДНК НВЛ), на которых локализованы МВ, несущие CD15<sup>+</sup>, CD61<sup>+</sup> и CD62<sup>+</sup>.

Полученные результаты позволяют сформулировать концепцию «МВ-опосредованного тромбогенеза», где МВ выступают активными участниками нетоз-ассоциированного иммунотромбоза. Образованные нейтрофилами ДНК-сети (НВЛ) служат каркасом, захватывающим циркулирующие МВ тромбоцитарного и, возможно, другого происхождения [154, 157]. В результате формируется гибридная структура, обладающая уникальным прокоагулянтным потенциалом: ДНК и гистоны НВЛ активируют тромбоциты и контактный путь свертывания [92, 161], в то время как МВ, несущие ФС и, возможно, тканевой фактор, предоставляют идеальную поверхность для сборки и ускорения работы ферментных комплексов коагуляции [35, 179]. Это создает мощный локальный прокоагулянтный очаг, способствующий образованию плотных, устойчивых к фибринолизу тромбов, что характерно для COVID-19 [98, 227]. Наши данные полностью согласуются с работой Gould T.J. et al., показавшей, что НВЛ способствуют генерации тромбина

[164], а также с исследованиями, демонстрирующими присутствие МВ в составе НВЛ-обогащенных тромбов при других патологических состояниях, сопровождающихся тромботическими осложнениями [154, 157].

Обнаружение подобных комплексов преимущественно при среднетяжелом течении и снижение их количества при тяжелом может указывать на то, что активное формирование агрегатов «НВЛ-МВ» является характерным для фазы гиперкоагуляции, тогда при переходе в коагулопатию потребления происходит их массовое потребление в тромбах или нарушаются механизмы их образования [22].

На основании совокупности полученных результатов может быть предложена интегрированная патогенетическая модель, представленная на рисунке 19.

Исходное событие - инфицирование SARS-CoV-2 приводит к повреждению эндотелия [84], активации нейтрофилов и тромбоцитов [187], запуская цитокиновый шторм [2].

Фаза гиперкоагуляции (среднетяжелое течение) - активированные нейтрофилы формируют НВЛ [154, 218]. Одновременно в кровотоке высвобождается большое количество прокоагулянтных МВ из тромбоцитов, нейтрофилов и других клеток [36, 175]. МВ адсорбируются на ДНК-сетях НВЛ, образуя комплексные агрегаты. Эти агрегаты служат мощным катализатором коагуляции, преимущественно через контактный (внутренний) путь, и платформой для быстрого образования фибрина [164]. Клинико-лабораторным отражением являются укорочение лаг-периода и времени свертывания, повышение скорости полимеризации фибрина, рост Д-димера, СРБ и ферритина при сохранном или повышенном количестве МВ.

Фаза коагулопатии потребления (тяжелое течение) - массивное и диссеминированное тромбообразование с участием комплексов «НВЛ-МВ» приводит к потреблению факторов свертывания, тромбоцитов и самих МВ [58, 60]. Истощение пула прокоагулянтных МВ и клеток-предшественниц усугубляет гипокоагуляцию. Формируются структурно неполноценные, рыхлые фибриновые

сгустки [98]. В лабораторной картине это проявляется удлинением времени свертывания, снижением скорости полимеризации фибрина, тромбоцитопенией [133], снижением уровня МВ, но персистенцией экстремально высоких уровней Д-димера и маркеров воспаления.

Полученные в ходе работы данные коррелируют с общепринятыми концептуальными моделями COVID-ассоциированной коагулопатии, описанными в современных источниках. Концепция двухфазности нарушений, предполагающая переход от гиперкоагуляции к гипокоагуляции и коагулопатии потребления, находит поддержку в работах ряда авторов [58, 60, 118]. Ключевая роль МВ в патогенезе нарушений гемостаза подтверждается данными о повышении их уровня и прокоагулянтной активности у пациентов с COVID-19 [36, 79, 175, 187]. Настоящее исследование дополняет эти сведения, демонстрируя динамику пула МВ и их фенотипический состав. Центральное место НВЛ в тромбогенезе при COVID-19 является общепризнанным [154, 157, 218] Настоящая работа вносит принципиально новый вклад, визуализируя прямое структурное взаимодействие между НВЛ и МВ, что предлагает конкретный механизм синергии между воспалительным и прокоагулянтным ответом. Выявленные нами корреляции между уровнем МВ, Д-димером и маркерами воспаления подтверждают интегральную природу «тромбовоспаления» и согласуются с данными, показывающими взаимосвязь между тяжестью COVID-19, коагулопатией и интенсивностью системного воспалительного ответа [27, 69, 175].

Отличительной особенностью настоящего исследования является комплексное применение взаимодополняющих методов (турбидиметрия, ТЭГ, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия), что позволило не только констатировать изменения, но и установить функциональные взаимосвязи между количественными, фенотипическими и функциональными характеристиками МВ и параметрами гемостаза при различной степени тяжести заболевания.

Результаты исследования подчеркивают двойственную роль МВ в патогенезе заболеваний: с одной стороны, они участвуют в поддержании гомеостаза, с другой

— могут способствовать развитию патологических процессов, таких как тромбозы, воспаление и иммунная дисрегуляция. Сравнение полученных данных с результатами других исследований [193, 208, 106] позволяет предположить, что МВ и НВЛ могут быть ключевыми факторами, связывающими воспаление и гиперкоагуляцию.

Таким образом, проведенное исследование расширяет понимание патогенеза COVID-ассоциированной коагулопатии, выдвигая микровезикулы в качестве центрального звена, связывающего активацию иммунных клеток (нейтрофилов, тромбоцитов), воспаление и нарушения свертывания крови. Установленный феномен интеграции МВ в структуры НВЛ открывает новые перспективы для разработки таргетных диагностических и терапевтических стратегий, направленных на блокирование ключевого звена патогенеза иммунотромбоза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное комплексное исследование роли МВ в регуляции системы гемостаза при COVID-19 позволило установить закономерности развития COVID-ассоциированной коагулопатии. Экспериментально доказано, что нарушения свертывающей системы крови при COVID-19 имеют зависимость от тяжести течения заболевания: фаза гиперкоагуляции с активацией микровезикулярных механизмов при среднетяжелом течении заболевания сменяется фазой коагулопатии потребления с истощением прокоагулянтного потенциала при тяжелом течении. Впервые выявлен и охарактеризован ключевой патогенетический механизм МВ-опосредованного тромбогенеза, заключающийся в способности МВ тромбоцитарного и нейтрофильного происхождения интегрироваться в структуры НВЛ, формируя агрегаты. Установлена диагностическая и прогностическая значимость МВ, проявляющаяся в наличии прямых корреляционных связей между уровнем МВ и маркерами воспаления (СРБ, ферритин) и коагуляции (Д-димер).

Полученные данные легли в основу разработанной концепции стратификации тромбогенного риска, учитывающей динамику изменений микровезикулярного профиля и параметров гемостаза. Зарегистрирован патент в Федеральной службе по интеллектуальной собственности №2855677 от 02.02.2026 г. «Способ выбора тактики ведения пациентов с COVID-19 для снижения риска тромботических осложнений», заявка №2025116745 от 18.06.2025 г.

Практическая значимость работы подтверждается созданием алгоритма диагностики нарушений гемостаза при COVID-19, включающего комплексную оценку параметров свертывающей системы методами тромбоэластографии, динамической турбидиметрии и проточной цитометрии. Разработаны практические рекомендации по мониторингу и коррекции выявленных нарушений.

Результаты исследования вносят существенный вклад в понимание патогенеза тромботических осложнений при COVID-19 и создают научную основу

для разработки персонализированных подходов к диагностике, профилактике и лечению коагулопатий у пациентов с коронавирусной инфекцией.

Представленная схема (рисунок 16) визуализирует интегративное понимание патогенеза коагулопатии при COVID-19, основанное на результатах проведенного исследования, что позволяет рассматривать COVID-ассоциированную коагулопатию как мультикомпонентное нарушение гемостаза, объединяющее эндотелиопатию, воспаление, активацию клеточных элементов и плазменных факторов. Данный патогенетический контур обосновывает необходимость разработки комплексных диагностических алгоритмов и персонализированных терапевтических подходов, направленных на ключевые звенья выявленных нарушений.

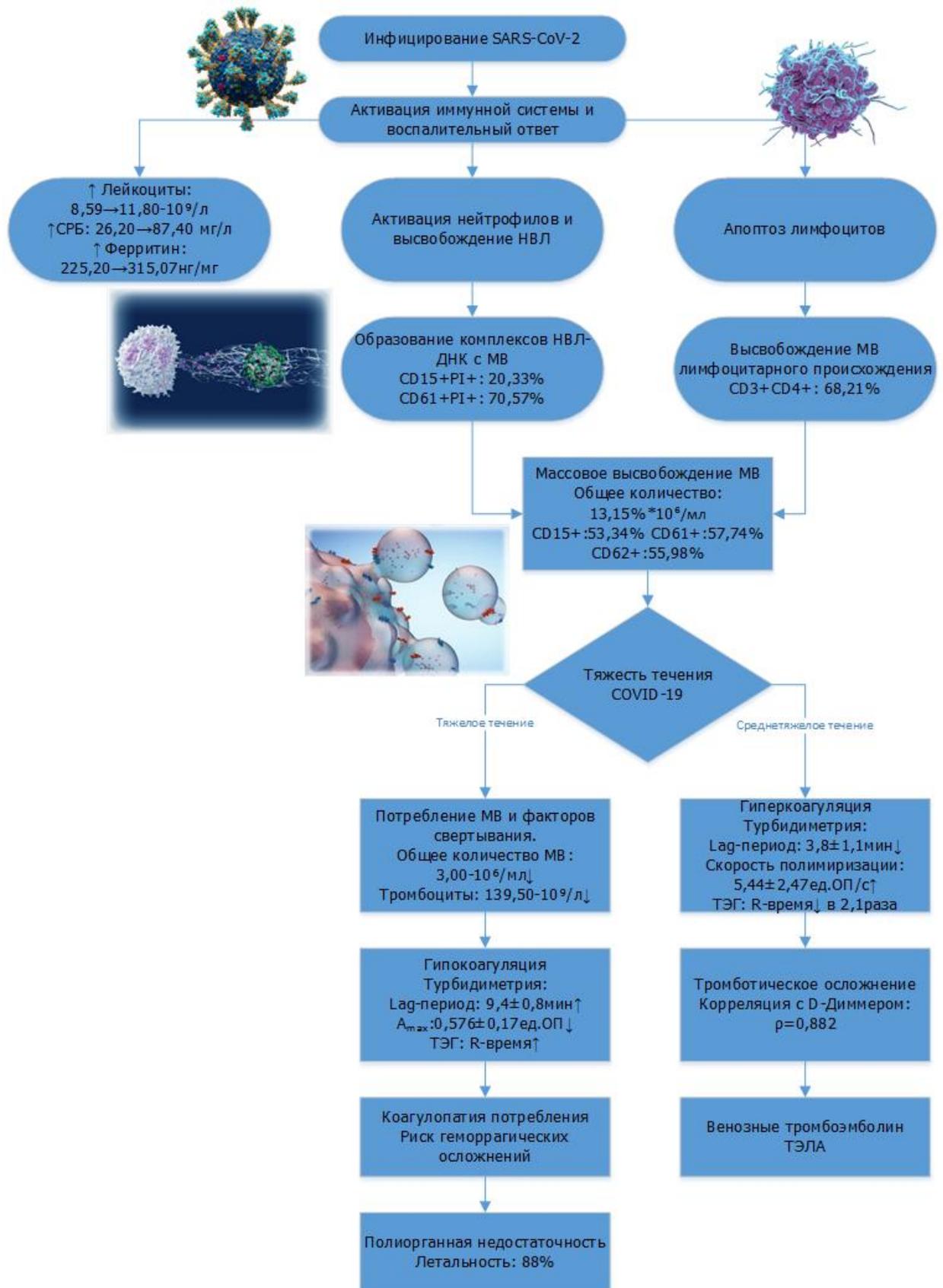


Рисунок 16 – Схема патогенеза свертывающей системы крови пациентов с COVID-19 различной степени тяжести

## 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 микрочастиц, 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 интеграции в структуры НВЛ с формированием комплексных конгломератов ДНК-PI<sup>+</sup> с микровезикулами CD15<sup>+</sup> и CD61<sup>+</sup>, 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 подобных комплексов, что может свидетельствовать об их потреблении в процессе тромбообразования.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Диагностические алгоритмы.

Для повышения эффективности диагностики нарушений гемостаза у пациентов с COVID-19 рекомендуется внедрить в клиническую практику комплексный диагностический алгоритм, включающий параллельное использование следующих методов:

Динамическая турбидиметрия – для анализа кинетических параметров фибринообразования (лаг-период, скорость полимеризации, максимальная оптическая плотность).

Стандартные коагулологические тесты – для мониторинга базовых показателей системы гемостаза (АЧТВ, протромбиновое время, уровень фибриногена, D-димер, тромбоциты).

Проточная цитометрия – для количественного и фенотипического анализа субпопуляций циркулирующих микровезикул (тромбоцитарных, нейтрофильных, моноцитарных), а также их прокоагулянтной активности.

Оценка маркеров системного воспаления (С-реактивный белок, ферритин) – для корреляционного анализа взаимосвязи между интенсивностью воспалительного ответа и характером гемостатических нарушений.

Комплексное использование указанных методов позволит не только оценить состояние гемостаза на различных уровнях (плазменном, клеточном, функциональном), но и выявить маркеры высокого риска развития иммунотромбоза, что необходимо для своевременного и персонализированного подбора антикоагулянтной и противовоспалительной терапии.

Тактика ведения пациентов.

При среднетяжелой форме заболевания рекомендуется регулярный мониторинг уровня микровезикул (МВ) нейтрофильного (CD15<sup>+</sup>) и тромбоцитарного (CD61<sup>+</sup>) происхождения в качестве предиктора тромботических осложнений. При выявлении концентрации МВ выше  $12 \times 10^6$ /мл или обнаружении ДНК-МВ комплексов следует рассмотреть вопрос о раннем назначении

низкомолекулярных гепаринов с профилактической целью. При тяжелой форме COVID-19 необходим ежедневный контроль лабораторных показателей, характерных для коагулопатии потребления (динамика Д-димера, фибриногена, количества тромбоцитов), а также маркеров полиорганной недостаточности. Антикоагулянтная терапия должна подбираться строго индивидуально с учетом динамики турбидиметрических параметров, данных тромбоэластографии и уровня воспалительных маркеров (СРБ, ферритин), что позволяет оптимизировать лечение и минимизировать риски как тромботических, так и геморрагических осложнений [25].

## **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.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АФК – активная форма кислорода

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

БТП – бестромбоцитарная плазма

ВАК – Высшая аттестационная комиссия

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» - Государственное автономное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан»

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКза – дезоксирибонуклеаза

ИФА – иммуноферментный анализ

КНР – Китайская Народная Республика

КТ – компьютерная томография

МВ – микровезикулы

МЗ – Министерство здравоохранения

МНО – международное нормализованное отношение

МПО – миелопероксидаза

НВЛ – нейтрофильные внеклеточные ловушки

ОРДС – Острый респираторный дистресс-синдром

ПТ по Квику – Протромбиновое время по Квику

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РАС - ренин-ангиотензиновая система

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТ – Республика Татарстан

РФ – Российская Федерация

СРБ – С-реактивный белок

США – Соединенные Штаты Америки

ТФ – тканевой фактор

ФС – фосфатидилсерин

ЭМВ – эндотелиальные микровезикулы

ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент-2

APC – аллофикоцианин (флуорохром)

CitH3 – цитруллинированный гистон H3

COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 года (SARS-CoV-2)

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

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

HR (Hazard Ratio) — Коэффициент риска (отношение рисков)

IFN- $\gamma$  – интерферона-гамма

IL – интерлейкин

FITC – флуоресцеин изотиоцианат (флуорохром)

MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1

MIP-1 $\alpha$  – макрофагальный воспалительный белок-1-альфа

PAD4 – пептидил аргинин деиминаза 4

PE – фикоэритрин (флуорохром)

PI – пропидий йодид (интеркалирующий краситель)

SARS-CoV-2 – Тяжелый острый респираторный синдром, коронавирус 2

TEG – тромбоэластография

TLR7/8 – толл-подобные рецепторы

TNF- $\alpha$  – фактора некроза опухоли-альфа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Активация тромбоцитов и механизмы тромбозэмболии у пациентов с тяжелым течением COVID-19. Альтернативные механизмы активности системы гемостаза / Б. И. Кузник, Ю. Н. Смоляков, Н. Н. Цыбиков [и др.] // Успехи современной биологии. – 2023. – Т. 143, № 4. – С. 335-358.
2. Алексеева, Е. И. COVID-19-индуцированный «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.
3. Апоптоз лимфоцитов у пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19 / Х. С. Хаертынов, С. В. Бойчук, В. А. Анохин [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2024. – Т. 105, № 6. – С. 926-935.
4. Баркаган, З. С. Диагностика и контролируемая терапии нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – Москва : Ньюдиамед, 2008. – 292 с.
5. Венозные тромбозэмболические осложнения у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19 / М. В. Бычинин, И. А. Мандель, Т. В. Клыпа [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2021. – № 4. – С. 41-47.
6. Внеклеточные везикулы плазмы крови : состав, происхождение, свойства / М. А. Пантелеев, А. А. Абаева, А. Н. Баландина [и др.] // Биологические мембраны. – 2017. – Т. 34, № 3. – С. 155-161.
7. Гомзикова, М. О. Мембранные микровезикулы : биологические свойства и участие в патогенезе заболеваний / М. О. Гомзикова, Р. Ф. Гайфуллина, И. Г. Мустафин // Гены & Клетки. – 2013. – Т. 8, № 1. – С. 6-11.
8. Григорьева, К. Н. Коррекция гемостаза в лечении и реабилитации пациентов с COVID-19 / К. Н. Григорьева, Н. Р. Гашимова, В. И. Цибизова // Реабилитология. – 2023. – Т. 1, № 1. – С. 49-59.
9. Долгов, В. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Свиринов. – Москва : Триада, 2005. – 150 с.

10. Зубаиров, Д. М. Микровезикулы в крови. Функции и их роль в тромбообразовании : монография / Д. М. Зубаиров, Л. Д. Зубаирова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 167 с.
11. Зубаиров, Д. М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования / Д. М. Зубаиров. – Казань : ФЭН, 2000. – 367 с.
12. Зубаиров, Д. М. Роль фрагментов клеточных мембран в процессах свертывания крови / Д. М. Зубаиров, И. А. Андрушко, А. Л. Сторожев // Кардиология. – 1974. – Т. 14, № 11. – С. 75-80.
13. Зубаиров, Д. М. Функциональная концепция инициирования свертывания крови клеточными мембранами / Д. М. Зубаиров, В. Н. Тимербаев // Гематология и трансфузиология. – 1991. – Т. 36, № 4. – С. 5-9.
14. Исследование внешнего пути свертывания крови / Д. М. Зубаиров, В. Н. Тимербаев, Р. Ф. Байкеев [и др.] // Биохимия животных и человека. – 1989. – № 13. – С. 1-10.
15. Матвиенко, О. Ю. Роль микрочастиц плазмы крови в развитии прокоагулянтных изменений у пациентов, перенесших COVID-19 / О. Ю. Матвиенко, О. А. Смирнова, О. Г. Головина // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2024. – № 2. – С. 48-53.
16. Микрочастицы клеток крови у больных COVID-19 как маркер активации системы гемостаза / О. В. Сироткина, А. И. Ермаков, Л. В. Гайковая [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2020. – № 4. – С. 35-40.
17. Момот, А. П. Тромбоцитарные микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала / А. П. Момот, Н. О. Царигородцева, Д. В. Федоров // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – № 2. – С. 1-14.
18. Нарушения системы гемостаза у пациентов с COVID-19 инфекцией различной степени тяжести / А. В. Любушкина, Е. И. Темник, Д. Ю. Константинов [и др.] // Наука и инновации в медицине. – 2023. – Т. 8, № 2. – С. 103-107.

19. Нейтрофильные внеклеточные ловушки : значение для диагностики и прогноза COVID-19 / Д. В. Кассина, И. А. Василенко, А. С. Гурьев [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2020. – Т. 48. – С. 43-50.
20. Опосредованное тромбином влияние микровезикул крови на кинетику образования, структуру и свойства фибринового сгустка / Р. М. Набиуллина, И. Г. Мустафин, Ф. И. Атауллаханов [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 7. – С. 812-821.
21. Пальцын, А. А. Микрочастицы тромбоцитов / А. А. Пальцын // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2017. – Т. 61, № 1. – С. 99-105.
22. 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.
23. Связывание клеточных микровезикул с фибрином в процессе свертывания крови / Р. М. Набиуллина, А. Р. Мухитов, Р. И. Литвинов [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2016. – Т. 102, № 5. – С. 597-605.
24. Состояние плазменного звена гемостаза у пациентов с коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2 / О. Ю. Матвиенко, Н. Е. Корсакова, А. А. Лернер [и др.] // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2020. – № 4. – С. 52-56.
25. 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.
26. Сухарева, Е. Г. Влияние микровезикул эритроцитов на спонтанную агрегацию тромбоцитов / Е. Г. Сухарева, М. Н. Егорихина, Г. Я. Левин // Ярославский педагогический вестник. – 2012. – Т. 3, № 4. – С. 176-180.

27. Явелов, И. С. COVID-19 : состояние системы гемостаза и особенности антитромботической терапии / И. С. Явелов, О. М. Драпкина // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 310-318.
28. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X.-L. Yang, X.-G. Wang [et al.] // Nature. – 2020. – Vol. 579, № 7798. – P. 270-273.
29. 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. – Vol. 18, № 4. – P. 844-847.
30. Activated platelets and platelet-derived extracellular vesicles mediate COVID-19-associated immunothrombosis / M. Ebeyer-Masotta, T. Eichhorn, R. Weiss [et al.] // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – Vol. 10. – P. 914891.
31. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation / A. Hakkim, T. A. Fuchs, N. E. Martinez [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – Vol. 108, № 17. – P. 7126-7131.
32. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1 / N. Van Doremalen, T. Bushmaker, D. H. Morris [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 382, № 16. – P. 1564-1567.
33. Aerosol and Surface Transmission Potential of SARS-CoV-2 / J. L. Santarpia, D. N. Rivera, V. L. Herrera [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 12732.
34. An evidence review of face masks against COVID-19 / J. Howard, A. Huang, Z. Li [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2021. – Vol. 118, № 4. – P. e2014564118.
35. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane / P. J. Sims, T. Wiedmer, C. T. Esmon [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1988. – Vol. 263, № 34. – P. 18205-18212.

36. Assessment of circulating microvesicles and their procoagulant activity in patients with COVID-19 / A. H. Thayer, H. K. Yahromi, M. Kamravan, S. A. R. Rezaie // *BMC Research Notes*. – 2024. – Vol. 17, № 1. – P. 233.
37. Azzam, H. Circulating platelet and erythrocyte microparticles in young patients with atrial fibrillation / H. Azzam, N. Zaghoul, M. Hassan // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2009. – Vol. 28, № 2. – P. 178-184.
38. Azzam, H. Elevated platelet microparticle levels in valvular atrial fibrillation / H. Azzam, M. Zaghloul // *Hematology*. – 2009. – Vol. 14, № 6. – P. 357-360.
39. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19 / A. C. Kalil, T. F. Patterson, A. K. Mehta, C. R. Tomashek // *New England Journal of Medicine*. – 2024. – Vol. 390, № 9. – P. 795-807.
40. Belen, F. B. High D-dimer levels at disease onset are associated with increased mortality in patients, and their increase after initiation of therapy precedes the development of multiple organ failure and DIC syndrome / F. B. Belen // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2023. – Vol. 21, № 4. – P. 845-856.
41. Berberine-induced decline in circulating CD31<sup>+</sup>/CD42<sup>-</sup> microparticles is associated with improvement of endothelial function in humans / J. M. Wang, Z. Yang, M. G. Xu, J. Ye // *European Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 614, № 1-3. – P. 77-83.
42. Berlin, D. A. Severe Covid-19 / D. A. Berlin, R. M. Gulick, F. J. Martinez // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, № 25. – P. 2451-2460.
43. Bhardwaj, M. Multifaceted COVID-19 Associated Coagulopathy / M. Bhardwaj, P. Himral, D. Aggarwal // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. – 2023. – Vol. 17, № 3. – P. OC01-OC04.
44. Binnicker, M. J. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory / M. J. Binnicker // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2024. – Vol. 37, № 2. – P. e00094.
45. Budnik, I. Immune Factors in Deep Vein Thrombosis Initiation / I. Budnik, A. Brill // *Trends in Immunology*. – 2018. – Vol. 39, № 8. – P. 610-623.

46. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity / H. C. Christianson, K. J. Svensson, T. H. van Kuppevelt, J.-P. Li // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110, № 43. – P. 17380-17385.
47. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps / J. Park, R. W. Wysocki, Z. Amoozgar [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 8, № 361. – P. 361ra138.
48. Cellular microparticles : a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors / O. Morel, F. Toti, B. Hugel, J. M. Freyssinet // *Current Opinion in Hematology*. – 2006. – Vol. 13, № 5. – P. 372-377.
49. Cellular microparticles : new players in the field of vascular disease? / M. Diamant, M. E. Tushuizen, A. Sturk, R. Nieuwland // *European Journal of Clinical Investigation*. – 2004. – Vol. 34, № 6. – P. 392-401.
50. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes / K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 319, № 5867. – P. 1244-1247.
51. Chowdary, P. COVID-19 coagulopathy – what should we treat? / P. Chowdary // *Experimental Physiology*. – 2022. – Vol. 107, № 7. – P. 749-758.
52. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure / N. Amabile, A. P. Guerin, A. Leroyer, C. M. Boulanger // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2005. – Vol. 16, № 11. – P. 3381-3388.
53. Circulating endothelial microparticles correlate inversely with endothelial function in patients with ischemic left ventricular dysfunction / D. Bulut, K. Maier, N. Bulut-Streich, J. Mügge // *Journal of Cardiac Failure*. – 2008. – Vol. 14, № 4. – P. 336-340.
54. Circulating microparticles in the pathogenesis and early anticoagulation of thrombosis in COVID-19 with kidney injury / С. задачи, С. Yu, V.A. Novakovic [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 9. – P. 784505.

55. Circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism : a case-control study / L. Bal, S. Ederhy, E. Di Angelantonio, F. Papatheodoridis // *International Journal of Cardiology*. – 2010. – Vol. 145, № 2. – P. 321-322.
56. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China / W.-J. Guan, Z.-Y. Ni, Y. Hu [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – P. 1708-1720.
57. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China : a retrospective cohort study / F. Zhou, T. Yu, R. Du [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10229. – P. 1054-1062.
58. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19 / M. Levi, J. Thachil, T. Iba, J. H. Levy // *The Lancet Haematology*. – 2023. – Vol. 10, № 3. – P. e189-e199.
59. Coagulopathy and thromboembolic events in patients with SARS-CoV-2 infection : pathogenesis and management strategies / A. Allegra, V. Innao, A. G. Allegra, C. Musolino // *Annals of Hematology*. – 2020. – Vol. 99, № 9. – P. 1953-1965.
60. Coagulopathy in COVID-19 / T. Iba, J. H. Levy, M. Levi, J. M. Connors // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 9. – P. 2103-2109.
61. Cocucci, E. Shedding microvesicles : artefacts no more / E. Cocucci, G. Racchetti, J. Meldolesi // *Trends in Cell Biology*. – 2009. – Vol. 19, № 2. – P. 43-51.
62. Colombo, M. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles / M. Colombo, G. Raposo, C. Théry // *Journal of Cell Biology*. – 2013. – Vol. 200, № 4. – P. 373-383.
63. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics / E. Petersen, M. Koopmans, U. Go [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20, № 9. – P. e238-e244.
64. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles / G. Tans, J. Rosing, M. C. Thomassen, H. C. Hemker // *Blood*. – 1991. – Vol. 77, № 12. – P. 2641-2648.

65. CO-RADS : A categorical CT assessment scheme for patients suspected of having COVID-19 / M. Prokop, W. van Everdingen, T. van Rees Vellinga [et al.] // *European Radiology*. – 2024. – Vol. 34, № 1. – P. 121-130.
66. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size / A. Mangold, S. Alias, T. Scherz, S. Hofbauer // *Circulation Research*. – 2015. – Vol. 116, № 7. – P. 1182-1192.
67. Coronavirus biology and replication : implications for SARS-CoV-2 / P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2021. – Vol. 19, № 3. – P. 155-170.
68. 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. – Vol. 296, № 2. – P. E32-E40.
69. COVID-19 and coagulation : bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection / H. Al-Samkari, R. S. Karp Leaf, W. H. Dzik [et al.] // *Blood*. – 2020. – Vol. 136, № 4. – P. 489-500.
70. COVID-19 and coagulopathy : A systematic review / T. Iba, J. H. Levy, J. M. Connors [et al.] // *Journal of Intensive Care*. – 2020. – Vol. 8. – P. 53.
71. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease : Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up : JACC State-of-the-Art Review / B. Bikdeli, M. V. Madhavan, D. Jimenez [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2020. – Vol. 75, № 23. – P. 2950-2973.
72. COVID-19 Coagulopathies : Highlights of 2020-2021 Reported Data / R. Patel, R. Smith, A. B. Jones, L. Chen // *The University of Louisville Journal of Respiratory Infections*. – 2023. – Vol. 7, № 1. – P. 15-28.
73. COVID-19 Infection : Origin, epidemiology, and clinical features of human coronavirus / P. Asumang, P. A. Poku Senior, E. Oppong, K. Opoku // *Open Access Research Journal of Life Sciences*. – 2023. – Vol. 5, № 1. – P. 1-9.

74. COVID-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant / N. Andrews, J. Stowe, F. Kirsebom [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386, № 16. – P. 1532-1546.
75. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation / D. Wrapp, N. Wang, K. S. Corbett [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 367, № 6483. – P. 1260-1263.
76. Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis / P. A. Holme, N. O. Solum, F. Brosstad, M. Kierulf // *Thrombosis Research*. – 1998. – Vol. 59, № 3. – P. 427-437.
77. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR / V. M. Corman, O. Landt, M. Kaiser [et al.] // *Eurosurveillance*. – 2020. – Vol. 25, № 3. – P. 2000045.
78. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 / RECOVERY Collaborative Group, P. Horby, W. Shen Lim [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384, № 8. – P. 693-704.
79. Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles : tissue factor activity in patients with severe COVID-19 / C. Guervilly, A. Bonifay, S. Burtey, M. Sabatier // *Blood Advances*. – 2021. – Vol. 5, № 3. – P. 628-634.
80. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles / R. A. Preston, W. Jy, J. J. Jimenez, L. M. Mauro // *Hypertension*. – 2003. – Vol. 41, № 2. – P. 211-217.
81. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer : Possible role of a metastasis predictor / H. K. Kim, K. S. Song, Y. S. Park, J. H. Kim // *European Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 39, № 2. – P. 184-191.
82. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease / H. Koga, S. Sugiyama, K. Kugiyama, H. Yasue // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2005. – Vol. 45, № 10. – P. 1622-1630.

83. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes / P. Cherian, G. J. Hankey, J. W. Eikelboom, F. M. van Bockxmeer // *Stroke*. – 2003. – Vol. 34, № 9. – P. 2132-2137.
84. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 / Z. Varga, A. J. Flammer, P. Steiger, M. Haberecker // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395, № 10234. – P. 1417-1418.
85. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis / J. J. Jimenez, W. Jy, L. M. Mauro, C. Soderland // *Thrombosis Research*. – 2003. – Vol. 109, № 4. – P. 175-180.
86. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes / L. Bernal-Mizrachi, W. Jy, C. Fierro, O. J. Finn // *International Journal of Cardiology*. – 2004. – Vol. 97, № 3. – P. 439-446.
87. Endothelial microparticles in diseases / G. N. Chironi, C. M. Boulanger, A. Simon, A. Tedgui // *Cell and Tissue Research*. – 2009. – Vol. 335, № 1. – P. 143-151.
88. Endothelial-derived microparticles : Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis / A. S. Leroyer, F. Anfosso, R. Lacroix, M. Sabatier // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2010. – Vol. 104, № 3. – P. 456-463.
89. 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. – Vol. 7, № 8. – P. e575-e582.
90. Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 variants : implications for immune escape and vaccine efficacy / A. Jaidka, S. Mohapatra, H. Singh [et al.] // *Science*. – 2024. – Vol. 383, № 6688. – P. eabo7896.
91. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells / A. Savina, M. Furlán, M. Vidal, M. I. Colombo // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 22. – P. 20083-20090.
92. Extracellular DNA traps promote thrombosis / T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. D. Wagner // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107, № 36. – P. 15880-15885.

93. Extracellular vesicle-mediated endothelial apoptosis and EV-associated proteins correlate with COVID-19 disease severity / B. Krishnamachary, C. Cook, A. Kumar, C. A. Buesing // *Journal of Extracellular Vesicles*. – 2021. – Vol. 10, № 9. – P. e12117.
94. Extrapulmonary manifestations of COVID-19 / A. Gupta, M. V. Madhavan, K. Sehgal [et al.] // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26, № 7. – P. 1017-1032.
95. Factors influencing the level of circulating procoagulant microparticles in acute pulmonary embolism / L. Bal, S. Ederhy, E. Di Angelantonio, F. Papatheodoridis // *Archives of Cardiovascular Diseases*. – 2010. – Vol. 103, № 6-7. – P. 394-403.
96. Fani, M. Comparison of the COVID-2019 (SARS-CoV-2) pathogenesis with SARS-CoV and MERS-CoV infections / M. Fani, A. Teimoori, S. Ghafari // *Future Virology*. – 2020. – Vol. 15. – P. 317-323.
97. 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. – Vol. 231, № 2. – P. 193-203.
98. 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*. – 2021. – Vol. 19, № 5. – P. 1332-1339.
99. Flow cytometry for extracellular vesicle characterization in COVID-19 and post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection / M. Fanelli, V. Petrone, R. Chirico [et al.] // *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids*. – 2024. – Vol. 5, № 3. – P. 417-437.
100. Foley, J. H. Cross talk pathways between coagulation and inflammation / J. H. Foley, E. M. Conway // *Circulation Research*. – 2021. – Vol. 128, № 9. – P. 1394-1410.
101. Freyssinet, J.-M. Cellular microparticles : what are they bad or good for? / J.-M. Freyssinet // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Vol. 1, № 7. – P. 1655-1662.

102. From vulnerable plaque to vulnerable patient : a call for new definitions and risk assessment strategies. Part I / M. Naghavi, P. Libby, E. Falk, S. W. Casscells // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108, № 14. – P. 1664-1672.
103. Furie, B. In vivo thrombus formation / B. Furie, B. C. Furie // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2007. – Vol. 5, Suppl. 1. – P. 12-17.
104. Furie, B. Mechanisms of thrombus formation / B. Furie, B. C. Furie // *New England Journal of Medicine*. – 2008. – Vol. 359, № 9. – P. 938-949.
105. Galstyan, G. M. Coagulopathy in COVID-19 / G. M. Galstyan // *General Reanimatology*. – 2020. – Vol. 30, № 5. – P. 645-657.
106. Garnier, Y. Plasma microparticles of intubated COVID-19 patients cause endothelial cell death, neutrophil adhesion and NETosis, in a phosphatidylserine-dependent manner / Y. Garnier // *British Journal of Haematology*. – 2022. – Vol. 196, № 5. – P. 1159-1169.
107. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps / G. Sollberger, A. Choidas, G. L. Burn, D. Luenemann // *Science Immunology*. – 2018. – Vol. 3, № 26. – P. eaar6689.
108. Global vaccine efficacy against emerging variants / A. Jaidka, S. Mohapatra, H. Singh [et al.] // *Science*. – 2024. – Vol. 383, No 6683. – P. eabn9747.
109. Goldman, E. Exaggerated risk of transmission of COVID-19 by fomites / E. Goldman // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20, № 8. – P. 892-893.
110. Golubeva, M. G. Role of P-Selectin in the Development of Hemostasis Disorders in COVID-19 / M. G. Golubeva // *Biology Bulletin Reviews*. – 2022. – Vol. 12, № 4. – P. 406-413.
111. Greater Fibrinolysis Resistance but No Greater Platelet Aggregation in Critically Ill COVID-19 Patients / C. Heinz, W. Miesbach, E. Herrmann, M. Spies // *Anesthesiology*. – 2021. – Vol. 134, № 3. – P. 457-467.
112. Grigoreva, K. N. The role of neutrophil extracellular traps in COVID-19 associated coagulopathy / K. N. Grigoreva, N. R. Gashimova, V. I. Tsybizova // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 45-58.

113. Hargett, L. A. On the origin of microparticles : From «platelet dust» to mediators of intercellular communication / L. A. Hargett, N. N. Bauer // *Pulmonary Circulation*. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 329-340.

114. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes / L. Bernal-Mizrachi, W. Jy, J. J. Jimenez, L. M. Mauro // *American Heart Journal*. – 2004. – Vol. 147, № 2. – P. 253-260.

115. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection : a multicenter prospective cohort study / J. Helms, C. Tacquard, F. Severac, I. Garrig // *Intensive Care Medicine*. – 2020. – Vol. 46, № 6. – P. 1089-1098.

116. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner / E. Biro, K. N. Sturk-Maquelin, G. M. Vogel, H. K. Nieuwland // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2003. – Vol. 1. – P. 2561-2568.

117. Hypercoagulability detected by whole blood thromboelastometry (ROTEM®) and impedance aggregometry (MULTIPLATE®) in obese patients / E. Campello, L. Spiezia, E. Zabeo, P. Simioni // *Thrombosis Research*. – 2015. – Vol. 135, № 3. – P. 548-553.

118. Hypofibrinolytic state and high thrombin generation may play a major role in SARS-COV2 associated thrombosis / C. Nougier, R. Benoit, M. Simon, M. Hugon-Rodin // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 9. – P. 2215-2219.

119. Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy / L. Nicolai, A. Leunig, S. Brambs [et al.] // *Circulation*. – 2020. – Vol. 142, № 12. – P. 1176-1189.

120. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients / J. Hadjadj, N. Yatim, L. Barnabei [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 369, № 6504. – P. 718-724.

121. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19 / F. A. Klok, M. J. H. A. Kruip, N. J. M. van der Meer [et al.] // *Thrombosis Research*. – 2020. – Vol. 191. – P. 145-147.

122. Increased circulating CD31<sup>+</sup>/annexin V<sup>+</sup> apoptotic microparticles and decreased circulating endothelial progenitor cell levels in hypertensive patients with microalbuminuria / P. H. Huang, S. S. Huang, Y. H. Chen, J. W. Lin // *Journal of Hypertension*. – 2010. – Vol. 28, № 8. – P. 1655-1665.

123. Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China, 2020 / J. Cai, W. Sun, J. Huang [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 26, № 6. – P. 1343-1345.

124. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation / H. D. Lewis, J. Liddle, J. E. Coote [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 11, № 3. – P. 189-191.

125. Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with COVID-19 / REMAP-CAP Investigators, A. C. Gordon, P. R. Mouncey [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384, № 16. – P. 1491-1502.

126. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19 / J. Thachil, N. Tang, S. Gando, M. Levi // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 5. – P. 1023-1026.

127. Kahn, I. Z. Microthrombocytis and platelet fragmentation associated with idiopathic/autoimmune thrombocytopenic purpura / I. Z. Kahn, S. Karpatkin // *British Journal of Haematology*. – 1975. – Vol. 31. – P. 449-460.

128. Kahn, S. B. The role of platelets in hemostasis and thrombosis / S. B. Kahn, S. Karpatkin // *Seminars in Hematology*. – 1975. – Vol. 12, № 1. – P. 81-106.

129. Kawasaki-like multisystem inflammatory syndrome in children during the covid-19 pandemic in Paris, France : prospective observational study / J. Toubiana, C. Poirault, A. Corsia [et al.] // *BMJ*. – 2020. – Vol. 369. – P. m2094.

130. Kini, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms / R. M. Kini // *Toxicon*. – 2005. – Vol. 45, № 8. – P. 1147-1161.

131. Large-Vessel Stroke as a Presenting Feature of Covid-19 in the Young / T. J. Oxley, J. Mocco, S. Majidi [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382, № 20. – P. e60.
132. Lippi, G. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection / G. Lippi, M. Plebani // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2020. – Vol. 58, № 7. – P. 1131-1134.
133. Lippi, G. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections : A meta-analysis / G. Lippi, M. Plebani, B. M. Henry // *Clinica Chimica Acta*. – 2022. – Vol. 506. – P. 145-148.
134. Long COVID : major findings, mechanisms and recommendations / H. E. Davis, L. McCorkell, J. M. Vogel [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2024. – Vol. 22, № 3. – P. 133-146.
135. Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19 / Y. Xie, E. Xu, B. Bowe [et al.] // *Nature Medicine*. – 2024. – Vol. 30, № 2. – P. 344-352.
136. Martinod, K. Thrombosis : tangled up in NETs / K. Martinod, D. D. Wagner // *Blood*. – 2014. – Vol. 123, № 18. – P. 2768-2776.
137. Mathivanan, S. Exosomes : extracellular organelles important in intercellular communication / S. Mathivanan, H. Ji, R. J. Simpson // *Journal of Proteomics*. – 2010. – Vol. 73, № 10. – P. 1907-1920.
138. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission : a comprehensive review / M. D. Asumang, A. B. Kengne, C. K. Dzuvor [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. – 2023. – Vol. 21, № 5. – P. 312-327.
139. Mertens, K. The contribution of Ca<sup>2+</sup> and phospholipids to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor IX / K. Mertens, R. M. Bertina // *Biochemical Journal*. – 1984. – Vol. 223, № 3. – P. 607-615.
140. Meyerowitz, E. A. SARS-CoV-2 transmission and prevention in the era of the delta variant / E. A. Meyerowitz, A. Richterman, R. T. Gandhi // *New England Journal of Medicine*. – 2023. – Vol. 388, № 2. – P. 183-195.

141. Microparticles in cardiovascular diseases / M. J. VanWijk, E. VanBavel, A. Sturk, R. Nieuwland // *Cardiovascular Research*. – 2003. – Vol. 59, № 2. – P. 277-287.
142. Microparticles in deep vein thrombosis / M. C. Flores-Nascimento, F. L. Orsi, A. P. Yokoyama, J. M. Annichino-Bizzacchi // *Thrombosis Research*. – 2009. – Vol. 124, № 4. – P. 437-440.
143. Microparticles in deep venous thrombosis, antiphospholipid syndrome and Factor V Leiden / M. C. Flores-Nascimento, M. P. Beltrame, E. V. De Paula, J. M. Annichino-Bizzacchi // *Platelets*. – 2009. – Vol. 20, № 6. – P. 367-375.
144. Microparticles in hemostasis and thrombosis / S. Patchipulusu, J. C. Hsu, G. B. Perera, D. Dockal // *Circulation Research*. – 2010. – Vol. 108, № 10. – P. 1284-1297.
145. Morawska, L. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) / L. Morawska, D. K. Milton // *Clinical Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 71, № 9. – P. 2311-2313.
146. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant / W. F. Garcia-Beltran, E. C. Lam, K. St. Denis [et al.] // *Cell*. – 2022. – Vol. 185, № 3. – P. 457-466.e4.
147. Multisystem inflammatory syndrome in children in New York State / E. M. Dufort, E. H. Koumans, E. J. Chow [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, № 4. – P. 347-358.
148. Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide / H. Parker, A. M. Albrett, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2012. – Vol. 91, № 3. – P. 369-376.
149. Nesheim, M. E. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase / M. E. Nesheim, J. B. Taswell, K. G. Mann // *Journal of Biological Chemistry*. – 1979. – Vol. 254, № 21. – P. 10952-10962.
150. NETopathies? Unraveling the dark side of old diseases through neutrophils / A. Mitsios, A. Arampatzioglou, S. Arelaki [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 678.

151. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis / R. Khandpur, C. Carmona-Rivera, A. Vivekanandan-Giri [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2013. – Vol. 5, № 178. – P. 178ra40.

152. Neurologic Features in Severe SARS-CoV-2 Infection / J. Helms, S. Kremer, H. Merdji [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382. – P. 2268-2270.

153. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China / L. Mao, H. Jin, M. Wang [et al.] // *JAMA Neurology*. – 2020. – Vol. 77, № 6. – P. 683-690.

154. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19 / Y. Zuo, M. Zuo, S. Yalavarthi, H. Goshua // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2021. – Vol. 51, № 2. – P. 446-453.

155. Neutrophil extracellular traps are induced by coronavirus 2019 disease-positive patient plasma and persist longitudinally : A possible link to endothelial dysfunction as measured by syndecan-1 / E. J. Kelly, M. A. Oliver, B. C. Carney, A. D. Orgill // *Surgical Infections*. – 2023. – Vol. 24, № 10. – P. 887-896.

156. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans* / C. F. Urban, D. Ermert, M. Schmid [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2009. – Vol. 5, № 10. – P. e1000639.

157. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome / E. A. Middleton, X.-Y. He, F. Denorme [et al.] // *Blood*. – 2020. – Vol. 136, № 10. – P. 1169-1179.

158. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease / C. Lood, L. P. Blanco, M. M. Purmalek [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2016. – Vol. 75, № 9. – P. 1717-1725.

159. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development / A. S. Savchenko, K. Martinod,

M. A. Seidman, S. Subramaniam // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2014. – Vol. 12, № 6. – P. 860-870.

160. Neutrophil extracellular traps in thrombi retrieved during interventional treatment of ischemic arterial diseases / A. Z. Farkas, V. J. Farkas, I. Gubucz, L. Komócsi // *Thrombosis Research*. – 2019. – Vol. 175. – P. 46-52.

161. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 303, № 5663. – P. 1532-1535.

162. Neutrophil extracellular traps mediated by platelet microvesicles promote thrombosis and brain injury in acute ischemic stroke / X. Gao, X. Zhao, J. Li [et al.] // *Cell Communication and Signaling*. – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 50.

163. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice / A. Brill, T. A. Fuchs, A. S. Savchenko [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 136-144.

164. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms / T. J. Gould, T. T. Vu, L. L. Swystun [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2014. – Vol. 34, № 9. – P. 1977-1984.

165. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation / C. Silvestre-Roig, Q. Braster, A. Ortega-Gomez [et al.] // *Nature Reviews Cardiology*. – 2020. – Vol. 17, № 6. – P. 327-340.

166. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis / K. C. Wildhagen, P. García de Frutos, C. P. Reutelingsperger, L. Beckers // *Blood*. – 2014. – Vol. 123, № 7. – P. 1098-1101.

167. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 2007. – Vol. 176, № 2. – P. 231-241.

168. O'Brien, J. R. The platelet-like activity of serum / J. R. O'Brien // *British Journal of Haematology*. – 1955. – Vol. 1, № 2. – P. 223-228.

169. Obeagu, E. I. Impacts of COVID-19 on hemostasis : coagulation abnormalities and management perspectives / E. I. Obeagu, M. Tukur, K. Akaba // *Annals of Medicine and Surgery.* – 2024. – Vol. 86, № 4. – P. 2237-2245.

170. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19) : a multicenter European study / J. R. Lechien, C. M. Chiesa-Estomba, D. R. De Siati [et al.] // *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* – 2020. – Vol. 277, № 8. – P. 2251-2261.

171. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19 / J. Hammond, H. Leister-Tebbe, A. Gardner [et al.] // *NEJM.* – 2024. – Vol. 391, № 5. – P. 451-463.

172. Owens, A. P. Microparticles in hemostasis and thrombosis / A. P. Owens, N. Mackman // *Circulation Research.* – 2011. – Vol.108, № 10. – P. 1284-1297.

173. Özden, Ö. The Relationship Between COVID-19 Related Coagulopathy with Organ Damage and Prognosis / Ö. Özden, D. L. Tunay // *Çukurova Anestezi ve Cerrahi Bilimler Dergisi.* – 2022. – Vol. 5, № 3. – P. 342-350.

174. Pathogenetic aspects of post-covid-19 complications in the blood coagulation system / L. Kot, D. Ostapchenko, O. V. Kolenchenko [et al.] // *Visnik Kiïvs'kogo nacional'nogo unïversitetu imeni Tarasa Ševčenka. Biologiâ.* – 2023. – Vol. 92, № 1. – P. 17-21.

175. Patients With COVID-19 Have Elevated Levels of Circulating Extracellular Vesicle Tissue Factor Activity That Is Associated With Severity and Mortality-Brief Report / A. Rosell, S. Havervall, F. von Meijenföldt [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* – 2021. – Vol. 41, № 2. – P. 878-882.

176. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice / J. S. Knight, V. Subramanian, A. A. O'Dell [et al.] // *Ann Rheum Dis.* – 2015. – Vol. 74, № 12. – P. 2199-206.

177. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents / G. Kampf, D. Todt, S. Pfaender [et al.] // *Journal of Hospital Infection*. – 2023. – Vol. 132. – P. 12-19.

178. Phosphatidylserine exposure on microparticles and in vivo thrombin generation / A. M. Weerheim, A. M. Kolb, A. Sturk, R. Nieuwland // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2002. – Vol. 1, № 1. – P. 60-67.

179. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography / A. M. Weerheim, A. M. Kolb, A. Sturk, R. Nieuwland // *Analytical Biochemistry*. – 2002. – Vol. 302, № 2. – P. 191-198.

180. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19 / B. K. Manne, F. Denorme, E. A. Middleton [et al.] // *Blood*. – 2020. – Vol. 136, № 11. – P. 1317-1329.

181. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets / N. Rukoyatkina, S. Mindukshev, S. Walter, U. Walter // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 102, № 1. – P. 194-201.

182. Platelet microparticles : A potential predictive factor of survival in haemophilia A patients with inhibitors / V. Proulle, B. Hugel, B. Guillet, J. M. Freyssinet // *British Journal of Haematology*. – 2001. – Vol. 112, № 1. – P. 107-113.

183. Platelet microparticles : detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine / T. Burnouf, H. A. Goubran, M. L. Chou, M. El-Ekiaby // *Blood Reviews*. – 2014. – Vol. 28, № 4. – P. 155-166.

184. Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura / L. L. Horstman, Y. S. Ahn, W. Jy, J. J. Jimenez // *Thrombosis and Haemostasis*. – 1992. – Vol. 67, № 6. – P. 659-665.

185. Platelet reactivity to thrombin differs between patients with COVID-19 and those with ARDS unrelated to COVID-19 / Y. Zaid, F. Guessous, F. Puhm [et al.] // *Blood Advances*. – 2021. – Vol. 5, № 3. – P. 635-639.

186. Platelet-derived microparticles promote coagulation activation via collagen-dependent pathways / F. Setzer, V. Oberle, M. Blass, K. T. Preissner // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2006. – Vol. 96, № 6. – P. 873-879.

187. Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19 / Y. Zaid, F. Puhm, I. Allaeyes [et al.] // *Circulation Research*. – 2020. – Vol. 127, № 11. – P. 1404-1418.

188. Platelets contribute to disease severity in COVID-19 / T. J. Barrett, S. Bilaloglu, M. Cornwell [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2021. – Vol. 19, № 12. – P. 3139-3153.

189. Post-acute COVID-19 syndrome / A. Nalbandian, K. Sehgal, A. Gupta [et al.] // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27. – P. 601-615.

190. Progress in SARS-CoV-2, diagnostic and clinical treatment of COVID-19 / L. Yang, S. Lü, J.-L. Wang [et al.] // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10, № 12. – P. e33179.

191. Pulmonary Embolism in Patients With COVID-19 : Awareness of an Increased Prevalence / J. Poissy, J. Goutay, M. Caplan [et al.] // *Circulation*. – 2020. – Vol. 142, № 2. – P. 184-186.

192. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19 / M. Ackermann, S. E. Verleden, M. Kuehnel [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, № 2. – P. 120-128.

193. Quantifying neutrophil extracellular trap release in a combined infection-inflammation NET-array device / U. S. Datla, B. Vundurthy, J. S. Hook [et al.] // *Lab on a Chip*. – 2024. – Vol. 24, № 3. – P. 615-628.

194. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway / M. Ostrowski, N. B. Carmo, S. Krumeich [et al.] // *Nature Cell Biology*. – 2010. – Vol. 12, № 1. – P. 19-30.

195. Radiological Society of North America Expert Consensus Statement on reporting chest CT findings related to COVID-19 / S. Simpson, F. U. Kay, S. Abbara [et al.] // *Radiology*. – 2024. – Vol. 310, № 1. – P. 222-234.

196. Ravalli, S. Coronavirus outbreak in Italy : Physiological benefits of home-based exercise during pandemic / S. Ravalli, G. Musumeci // *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*. – 2020. – Vol. 5, № 2. – P. 31.

197. Red blood cell-derived microparticles isolated from blood units initiate and propagate thrombin generation / O. Rubin, J. Delobel, M. Prudent [et al.] // *Transfusion*. – 2013. – Vol. 53, № 8. – P. 1744-1754.

198. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 – Final Report / J. H. Beigel, K. M. Tomashek, L. E. Dodd [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383, № 19. – P. 1813-1826.

199. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China / C. Wu, X. Chen, Y. Cai [et al.] // *JAMA Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 180, № 7. – P. 934-943.

200. Risks of deep vein thrombosis, pulmonary embolism, and bleeding after covid-19 : nationwide self-controlled cases series and matched cohort study / I. Katsoularis, O. Fonseca-Rodríguez, P. Farrington [et al.] // *BMJ*. – 2024. – Vol. 384. – P. e076690.

201. Role of microparticles in haemostasis and thrombosis : clinical implications / R. Lacroix, C. Dubois, A. S. Leroyer, F. Sabatier // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2013. – Vol. 109, № 5. – P. 816-826.

202. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine : an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov [et al.] // *The Lancet*. – 2021. – Vol. 397, № 10275. – P. 671-681.

203. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine / F. P. Polack, S. J. Thomas, N. Kitchin [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – P. 2603-2615.

204. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2 : an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South

Africa, and the UK / M. Voysey, S. A. C. Clemens, S. A. Madhi [et al.] // *Lancet*. – 2021. – Vol. 397, № 10269. – P. 99-111.

205. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19 / S. Zhang, Y. Liu, X. Wang [et al.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2020. – Vol. 13, № 1. – P. 120.

206. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger // *Cell*. – 2020. – Vol. 181, № 2. – P. 271-280.e8.

207. SARS-CoV-2 infection and thrombotic complications : a narrative review / I. C. Moschonas, A. D. Tselepis // *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. – 2021. – Vol. 52, № 1. – P. 111-123.

208. SARS-CoV-2 primed platelets-derived microRNAs enhance NETs formation by extracellular vesicle transmission and TLR7/8 activation / T.-L. Liao, H.-J. Liu, D.-Y. Chen [et al.] // *Cell Communication and Signaling*. – 2023. – Vol. 21, № 1. – P. 304.

209. Scientific and Standardization Committee communication : Clinical guidance on the diagnosis, prevention, and treatment of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19 / A. C. Spyropoulos, J. H. Levy, W. Ageno [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 8. – P. 1859-1865.

210. Severe covid-19 pneumonia : pathogenesis and clinical management / A. H. Attaway, R. G. Scheraga, A. Bhimraj [et al.] // *BMJ*. – 2021. – Vol. 372. – P. n436.

211. Shantsila, E. Circulating microparticles in cardiovascular disease : implications for atherogenesis and atherothrombosis / E. Shantsila, P. W. Kamphuisen, G. Y. Lip // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2010. – Vol. 8, № 11. – P. 2358-2368.

212. Sharma, S. Coagulopathy is Initiated with Endothelial Dysfunction and Disrupted Fibrinolysis in Patients with COVID-19 Disease / S. Sharma, A. Ray, B. Sadasivam // *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. – 2023. – Vol. 38, № 2. – P. 220-230.

213. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques : A role for apoptosis in plaque thrombogenicity / Z. Mallat, B. Hugel, J. Ohan, F. Leseche // *Circulation*. – 2000. – Vol. 99, № 3. – P. 348-353.

214. Smallwood, M. Introduction / M. Smallwood // *The Future of Long COVID : Synthesis Lectures on Threatcasting*. – Cham : Springer, 2024. – P. 1-5.

215. Stability of SARS-CoV-2 in different environmental conditions / A. W. H. Chin, J. T. S. Chu, M. R. A. Perera [et al.] // *The Lancet Microbe*. – 2023. – Vol. 4, № 3. – P. e145-e153.

216. Sturk, N. R. Cell derived vesicles in health and disease / N. R. Sturk // *Nederlands Tijdschrift voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde*. – 2012. – Vol. 37. – P. 65-68.

217. Targeting potential drivers of COVID-19 : Neutrophil extracellular traps / B. J. Barnes, J. M. Adrover, A. Baxter-Stoltzfus [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217, № 6. – P. e20200652.

218. The central role of extracellular vesicles in the mechanisms of thrombosis in COVID-19 patients with cancer and therapeutic strategies / H. Jing, N. Zuo, V. A. Novakovic [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Vol. 9. – P. 792335.

219. The coronavirus pandemic and aerosols : Does COVID-19 transmit via expiratory particles? / S. Asadi, N. Bouvier, A. S. Wexler, W. D. Ristenpart // *Aerosol Science and Technology*. – 2020. – Vol. 54, № 6. – P. 635-638.

220. The Gla domain of factor IXa binds to factor VIIIa in the tenase complex / M. D. Blostein, B. C. Furie, I. Rajotte, G. E. Gilbert // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 33. – P. 31297-31302.

221. The Long Term Residual Effects of COVID-Associated Coagulopathy / M. Ranucci, E. Baryshnikova, M. Anguissola [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 6. – P. 5514.

222. The platelet microparticle proteome / B. A. Garcia, D. M. Smalley, H. Cho, S. F. Hoffmeister // *Journal of Proteome Research*. – 2005. – Vol. 4, № 5. – P. 1516-1521.
223. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome / M. Ranucci, A. Ballotta, U. Di Dedda, E. Baryshnikova // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 7. – P. 1747-1751.
224. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions / G. J. Bosman, E. Lasonder, M. Luten, G. Willekens // *Transfusion*. – 2008. – Vol. 48, № 5. – P. 827-835.
225. The role of platelet-derived microvesicles in intercellular communication / S. Montoro-Garcia, E. Shantsila, F. Marin, G. Y. H. Lip // *Platelets*. – 2011. – Vol. 23, № 1. – P. 7-13.
226. The suboptimal fibrinolytic response in COVID-19 is dictated by high PAI-1 / C. S. Whyte, M. Simpson, G. B. Morrow [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2022. – Vol. 20, № 10. – P. 2394-2406.
227. Thierry, A. R. Neutrophil extracellular traps and by-products play a key role in COVID-19 : pathogenesis, risk factors, and therapy / A. R. Thierry, B. Roch // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – Vol. 9, № 9. – P. 2942.
228. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19 / X. Yang, Q. Yang, Y. Wang [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 6. – P. 1469-1472.
229. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke / C. Ducroux, L. Di Meglio, S. Loyau, M. Mazighi // *Stroke*. – 2018. – Vol. 49, № 3. – P. 754-757.
230. Tissue Factor-bearing MPs and the risk of venous thrombosis in cancer patients : A meta-analysis / C. Cui, G. Wang, S. Yang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 1675.
231. Tissue plasminogen activator (tPA) treatment for COVID-19 associated acute respiratory distress syndrome (ARDS) : A case series / J. Wang, N. Hajizadeh, E.

E. Moore [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18, № 7. – P. 1752-1755.

232. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation / I. Del Conde, C. N. Shrimpton, P. Thiagarajan, J. A. Lopez // *Blood*. – 2005. – Vol. 106, № 5. – P. 1604-1611.

233. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 / RECOVERY Collaborative Group // *The Lancet*. – 2024. – Vol. 403, № 10425. – P. 533-544.

234. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis / A. Hoshino, B. Costa-Silva, T. L. Shen [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 527, № 7578. – P. 329-335.

235. Vargas-Hernández, Á. The Role of NETosis and Complement Activation in COVID-19-Associated Coagulopathies / Á. Vargas-Hernández // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11, № 5. – P. 1371.

236. Viera, A. J. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes / A. J. Viera, M. Mooberry, N. S. Key // *Journal of the American Society of Hypertension*. – 2012. – Vol. 6, № 4. – P. 243-252.

237. Viscoelastic Hemostatic Assays : A Primer on Legacy and New Generation Devices / O. Volod, C. M. Bunch, N. Zackariya, S. S. Wiles // *Journal of Clinical Medicine*. – 2022. – Vol. 11, № 3. – P. 860.

238. Vishal, A. Diagnostic accuracy of RT-PCR and alternative methods for COVID-19 detection / A. Vishal, S. Kumar, S. Patel // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2024. – Vol. 37, № 1. – P. e00114-23.

239. Vishal, A. Therapeutic advances in COVID-19 management / A. Vishal, S. Kumar, S. Patel // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2024. – Vol. 23, № 3. – P. 215-230.

240. Weekly epidemiological update on COVID-19 – 1 September 2023 // World Health Organization : website. – URL: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---1-september-2023> (accessed: 17.12.2025).

241. WHO COVID-19 dashboard // World Health Organization : website. – URL: <https://covid19.who.int/> (accessed: 17.12.2025).

242. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma / P. Wolf // *British Journal of Haematology*. – 1967. – Vol. 13, № 3. – P. 269-288.

243. Zhu, Y. NETosis and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19 : Immunothrombosis and Beyond / Y. Zhu, X. Chen, X. Liu // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 838011.

244. Zwaal, R. F. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells / R. F. Zwaal, A. J. Schroit // *Blood*. – 1997. – Vol. 89, № 4. – P. 1121-1123.

245.  $\beta$ 2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF- $\kappa$ B activation of human neutrophils / B. Salanova, M. Choi, S. Rolle, W. Kolanus // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, № 38. – P. 27960-27969.

## СПИСОК ИЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблица 1 – Описательная статистика результатов лабораторных исследований в зависимости от степени тяжести COVID-19.....	61
Таблица 2 – Влияние степени тяжести течения COVID-19 на кинетику фибринообразования.....	62
Рисунок 1 – Регистрация кинетики полимеризации фибрина методом динамической турбидиметрии. Определяемые параметры: лаг-период (Lag) — время до начала нарастания плотности; $V$ — повышение оптической плотности на отрезке ее нарастания в единицу времени; $A_{\max}$ — максимальная оптическая плотность при данной длине волны; контроль — группа здоровых доноров; группа 1 — среднетяжелое течение; группа 2 — тяжелое течение, пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии; группа 2Нер — пациенты с тяжелым течением, не получавшие гепаринотерапию.....	64
Таблица 3 – Отношение времени активации коагуляции нативного образца к времени активации коагуляции образца после введения МВ.....	65
Рисунок 2 – Тромбоэластограммы, демонстрирующие влияние МВ на параметры коагуляции, типичные для каждой из исследуемых групп; а – группа со среднетяжелым течением COVID-19; b – группа с тяжелым течением COVID-19. R — время активации коагуляции нативного образца; RMV — время активации коагуляции после внесения МВ в образец.....	66
Таблица 4 – Абсолютное количество МВ в периферической крови пациентов с COVID-19 различной степени тяжести и контрольной группы.....	68
Рисунок 3 – Точечные диаграммы (а, е) и цитофлюорограммы МВ, экспрессирующих CD15 (b), CD45 (c), CD61 (d), CD14 (f), CD4 (g), CD3 (h) типичные для пациентов с COVID-19 средней степени тяжести на гейте, характерном для COVID-19.....	68
Рисунок 4 – Фенотипический профиль микровезикул типичных для пациентов со среднетяжелым течением COVID-19: проточно-цитометрический анализ – а, е — Точечные диаграммы рассеяния (FSC/SSC) с наложенным аналитическим гейтом,	

выделяющим популяцию микровезикул для фенотипирования, b — цитофлюорограмма маркера CD15 (нейтрофильное происхождение), c — цитофлюорограмма маркера CD45 (лейкоцитарный маркер), d — цитофлюорограмма маркера CD61 (тромбоцитарное происхождение), f — цитофлюорограмма экспрессии маркера CD14 (моноцитарное происхождение), g — цитофлюорограмма маркера CD4 (Т-хелперные лимфоциты), h — цитофлюорограмма маркера CD3 (Т-лимфоцитарный маркер).....69

Рисунок 5 – Фенотипический профиль микровезикул типичных для пациентов с тяжелым течением COVID-19: проточно-цитометрический анализ – a, e — Точечные диаграммы рассеяния (FSC/SSC) с наложенным аналитическим гейтом, выделяющим популяцию микровезикул для фенотипирования, b — цитофлюорограмма маркера CD15 (нейтрофильное происхождение), c — цитофлюорограмма маркера CD45 (лейкоцитарный маркер), d — цитофлюорограмма маркера CD61 (тромбоцитарное происхождение), f — цитофлюорограмма экспрессии маркера CD14 (моноцитарное происхождение), g — цитофлюорограмма маркера CD4 (Т-хелперные лимфоциты), h — цитофлюорограмма маркера CD3 (Т-лимфоцитарный маркер).....70

Таблица 5 – Содержание МВ в периферической крови пациентов с COVID-19.....71

Рисунок 6 – Процентное соотношение фенотипического состава МВ, присутствующих в исследуемых агрегатах при различной степени тяжести COVID-19.....72

Таблица 6 – Содержание в образцах БТП пациентов с COVID-19 различной степени тяжести МВ с двойной позитивной флуоресценцией по ДНК (PI<sup>+</sup>) и моноклональным антителам CD3, CD61, CD15.....74

Рисунок 7 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации Д-димера у пациентов со средним течением COVID-19.....76

Рисунок 8 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость СРБ от абсолютного количества МВ.....	77
Рисунок 9 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость ферритина от абсолютного количества МВ.....	78
Таблица 7 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи абсолютного количества МВ с маркерами воспаления и фибринолиза у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19.....	79
Рисунок 10 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации Д-димера у пациентов с тяжелым течением COVID-19.....	80
Рисунок 11 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации ферритина у пациентов с тяжелым течением COVID-19.....	81
Рисунок 12 – График регрессионной функции, характеризующий зависимость абсолютного количества МВ и концентрации СРБ у пациентов с тяжелым течением COVID-19.....	83
Таблица 8 – Результаты корреляционного анализа взаимосвязи абсолютного количества МВ с маркерами воспаления и фибринолиза у пациентов с тяжелым течением COVID-19.....	81
Рисунок 13 – Флуоресценция фрагментов ДНК и МВ в БТП пациентов со средним течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК, окрашенные DAPI, b - моноклональные антитела к CD15, меченные флуорохромом FITC, с - CD13, меченные флуорохромом PE, d – скопление микрочастиц, позитивных по CD62, меченные флуорохромом APC, e – наложение четырех каналов красителей.....	81
Рисунок 14 – Рисунок 14 – Визуализация фрагментов ДНК и микровезикул в БТП пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК, окрашенные DAPI, b –МВ, CD61 <sup>+</sup> , флуорохром FITC, с - TF, флуорохромPE, d – МВ, CD15 <sup>+</sup> , флуорохром APC, e – наложение четырех каналов красителей.....	85

- Рисунок 15 – Флуоресценция фрагментов ДНК и МВ в БТП пациентов с тяжелым течением COVID-19 (а - фрагменты ДНК, окрашенные DAPI, b - моноклональные антитела к CD15<sup>+</sup>, флуорохром FITC, с - CD13<sup>+</sup>, флуорохром PE, d – моноклональные антитела к CD62<sup>+</sup>, флуорохром APC, e – наложение четырех каналов красителей.....86
- Рисунок 16 – Схема патогенеза свертывающей системы крови пациентов с COVID-19 различной степени тяжести.....98

## Приложение 1 – Патент № 2816538 Способ оценки плазменного гемостаза

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2816538****Способ оценки плазменного гемостаза**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Грачева Елена Сергеевна (RU), Мустафин Ильшат Ганиевич (RU), Набиуллина Роза Муллаяновна (RU)*

Заявка № **2023135671**Приоритет изобретения **28 декабря 2023 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **01 апреля 2024 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **28 декабря 2043 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат 429b6a0fe3653164ba9f96f83b73b4aa7  
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 10.05.2023 по 02.08.2024

*Ю.С. Зубов*

**Приложение 2 – Патент №2855677 Способ выбора тактики ведения пациентов с COVID-19 для снижения риска тромботических осложнений**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

**№ 2855677**

**Способ выбора тактики ведения пациентов с COVID-19  
для снижения риска тромботических осложнений**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Грачева Елена Сергеевна (RU), Мустафин Ильшат Ганиевич (RU), Абдулганиева Диана Ильдаровна (RU)*

Заявка № **2025116745**

Приоритет изобретения **18 июня 2025 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **02 февраля 2026 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **18 июня 2045 г.**

*Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ  
Сертификат 00a570e477a13181531b4b8818e75f29506  
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**  
Действителен с 04.02.2025 по 28.11.2026

*Ю.С. Зубов*



**Приложение 3 – Свидетельство о государственной регистрации базы данных  
№2023620455 База данных параметров турбидиметрической кривой при  
исследовании полимеризации фибрина у пациентов с коронавирусной  
инфекцией SAR-CoV-2**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации базы данных  
**№ 2023620455**

**База данных параметров турбидиметрической кривой  
при исследовании полимеризации фибрина у пациентов  
с коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Казанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Грачева Елена Сергеевна (RU), Мустафин Ильшат  
Ганиевич (RU), Тюрин Юрий Александрович (RU)*

Заявка № **2023620168**  
Дата поступления **25 января 2023 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре баз данных **02 февраля 2023 г.**



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности  
 Ю.С. Zubov

**Приложение 4 – Свидетельство о государственной регистрации базы данных  
№2023621981 База данных проточно-цитометрического определения  
абсолютного количества микровезикул в бестромбоцитарной плазме у  
пациентов коронавирусной инфекцией SAR-CoV-2**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации базы данных  
**№ 2023621981**

**База данных проточно-цитометрического определения  
абсолютного количества микровезикул  
бестромбоцитарной плазме у пациентов с  
коронавирусной инфекцией SARS-CoV-2**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Казанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Грачева Елена Сергеевна (RU), Мустафин Ильшат  
Ганиевич (RU)*

Заявка № **2023621758**  
Дата поступления **09 июня 2023 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре баз данных **19 июня 2023 г.**



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности  
 Ю.С. Зубов

**Приложение 5 – Свидетельство о государственной регистрации базы данных  
№2021622762 База данных лабораторных исследований крови пациентов с  
новой коронавирусной инфекцией SAR-CoV-2.**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации базы данных  
**№ 2021622762**

**База данных лабораторных исследований крови  
пациентов с новой коронавирусной инфекцией SARS-  
CoV-2**

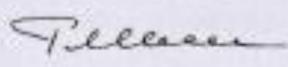
Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Казанский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *Грачева Елена Сергеевна (RU)*

Заявка № **2021622724**  
Дата поступления **25 ноября 2021 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре баз данных **02 декабря 2021 г.**



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Назмеев

**Приложение 6 - Свидетельство о государственной регистрации базы данных  
№2022621506 База данных лабораторных показателей крови пациентов с  
тяжелым течением новой коронавирусной инфекции SAR-CoV-2**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



**СВИДЕТЕЛЬСТВО**  
о государственной регистрации базы данных  
**№ 2022621506**

**База данных основных лабораторных показателей  
крови пациентов с тяжелым течением новой  
коронавирусной инфекции SARS-CoV-2**

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Казанский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Грачева Елена Сергеевна (RU), Мустафин Ильшат  
Ганиевич (RU), Абдулганиева Диана Ильдаровна (RU),  
Баялиева Айнагуль Жолдошевна (RU)*

Заявка № **2022621350**  
Дата поступления **09 июня 2022 г.**  
Дата государственной регистрации  
в Реестре баз данных **24 июня 2022 г.**



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

  
Ю.С. Зубов