© 2021 Авторы

DOI: 10.17816/KMJ2021-141 УДК 612.111: 612:115: 578.834.1: 616-092.18

Количественные и качественные изменения клеток крови при COVID-19

Наталья Геннадьевна Евтюгина[1]*, Светлана Сергеевна Санникова[2], Алина Дмитриевна Пешкова[1], Светлана Ильдаровна Сафиуллина[1,3], Изабелла Александровна Андрианова[1], Гульзада Рафаиловна Тарасова[1], Рафаэль Рафикович Хисматуллин[1], Шахноза Матмурадовна Абдуллаева[1], Рустем Игоревич Литвинов[1]

[1]Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань, Россия;
[2]Городская клиническая больница №16, г. Казань, Россия;
[3]Медицинский центр «Айболит», г. Казань, Россия

Реферат

Цель. Установить связь гематологических нарушений с патогенезом, течением и исходами COVID-19.

Методы. Обследованы 235 госпитальных пациентов в остром периоде COVID-19 со среднетяжёлой и тяжёлой формами болезни на фоне антикоагулянтной и иммуносупрессивной терапии. Изучали гемограмму и морфологию клеток крови, а также функциональное состояние тромбоцитов методом проточной цитометрии в сопоставлении с клинической картиной и синтезом маркёров воспаления. Для оценки сократительной функции тромбоцитов использовали тест кинетики контракции (ретракции) сгустков крови в сочетании со сканирующей электронной микроскопией тромбоцитов и сгустков крови.

Результаты. Наряду с гемолитической анемией, нейтрофилёзом и лимфопенией в крови пациентов присутствуют незрелые формы эритроцитов и лейкоцитов вследствие активации гемопоэза. Контракция сгустков крови при COVID-19 нарушена, особенно при тяжёлом течении заболевания и летальных исходах, а также при наличии сопутствующих заболеваний, включая гемобластозы, ишемическую болезнь сердца и острые нарушения мозгового кровообращения. У пациентов-мужчин изменения контракции более выражены. Подавление контракции прямо коррелирует с признаками анемии и коагулопатии, включая уровень D-димера, что подтверждает патогенетическую значимость сжатия сгустков крови при COVID-19. Снижение сократительного потенциала тромбоцитов обусловлено умеренной тромбоцитопенией в сочетании с хронической активацией и вторичной дисфункцией тромбоцитов. Строение и клеточный состав сгустков крови зависят от полноты контракции; сгустки с неполной контракцией характеризуются высокой порозностью, низким содержанием деформированных многогранных эритроцитов (полиэдроцитов) и равномерным распределением фибрина.

Вывод. В патогенезе COVID-19 участвуют клетки крови, которые претерпевают как количественные, так и качественные изменения; одним из протромботических механизмов может быть нарушение контракции сгустков крови.

Ключевые слова: клетки крови, свёртывание крови, контракция сгустков крови, COVID-19, тромбоциты.

Для цитирования: Евтюгина Н.Г., Санникова С.С., Пешкова А.Д., Сафиуллина С.И., Андрианова И.А., Тарасова Г.Р., Хисматуллин Р.Р., Абдуллаева Ш.М., Литвинов Р.И. Количественные и качественные изменения клеток крови при COVID-19. *Казанский мед. ж.* 2021; 102 (2): 141–155. DOI: 10.17816/KMJ2021-141.

Quantitative and qualitative changes in blood cells associated with COVID-19

N.G. Evtugina[1], S.S. Sannikova[2], A.D. Peshkova[1], S.I. Safiullina[1,3], I.A. Andrianova[1], G.R. Tarasova[1], R.R. Khismatullin[1], Sh.M. Abdullaeva[1], R.I. Litvinov[1]
[1]Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia;
[2]City Clinical Hospital No. 16, Kazan, Russia;
[3]Medical Center “Aibolit”, Kazan, Russia

Адрес для переписки: natalja.evtugyna@gmail.com

Поступила 11.02.2021, принята в печать 19.03.2021

Abstract

Aim. To establish the relationship of hematological disorders with the pathogenesis, course and outcomes of COVID-19.

Methods. We examined 235 hospitalized patients with moderate and severe forms of acute COVID-19 receiving anticoagulants and immunosuppressive drugs. We studied the full blood cell counts and morphology along with the platelet function by flow cytometry in comparison with the clinical features and synthesis of inflammatory markers. To assess platelet contractility, blood clot contraction (retraction) kinetics was used in combination with scanning electron microscopy of platelets and blood clots.

Results. Hemolytic anemia, neutrophilia and lymphopenia were associated with immature erythrocytes and leukocytes, indicating activation of hematopoiesis. Contraction of blood clots in COVID-19 was impaired, especially in severe and lethal cases, as well as in the presence of comorbidities, including myeloproliferative and coronary heart diseases and acute cerebrovascular disease. In male patients, the changes in clot contraction were more pronounced. Suppression of clot contraction correlated directly with anemia and coagulopathy, including a high D-dimer level, which confirms the pathogenetic significance of blood clot contraction in COVID-19. A decrease in platelet contractility was due to moderate thrombocytopenia in combination with chronic platelet activation and secondary platelet dysfunction. The structure and cellular composition of blood clots depended on the extent of contraction; clots with impaired contraction were porous, had a low content of deformed polyhedral erythrocytes (polyhedrocytes) and an even distribution of fibrin.

Conclusion. Blood cells undergoing both quantitative and qualitative changes are involved in the pathogenesis of COVID-19; the suppressed platelet-driven contraction of intravital blood clots may be a part of the prothrombotic mechanisms.

Keywords: blood cells, blood clotting, contraction of blood clots, COVID-19, platelets.

For citation: Evtugina N.G., Sannikova S.S., Peshkova A.D., Safiullina S.I., Andrianova I.A., Tarasova G.R., Khismatullin R.R., Abdullaeva Sh.M., Litvinov R.I. Quantitative and qualitative changes in blood cells associated with COVID-19. *Kazan Medical Journal.* 2021; 102 (2): 141–155. DOI: 10.17816/KMJ2021-141.

Актуальность. Коронавирусная инфекция COVID-19 (от англ. coronavirus disease) обычно протекает как респираторная патология лёгкой или средней тяжести, но нередко болезнь приобретает злокачественный системный характер с острым респираторным дистресс-синдромом и полиорганной дисфункцией, вплоть до летального исхода [1]. Доля пациентов с тяжёлым и критическим течением инфекции составляет от 15 до 20% [2], средняя летальность при COVID-19 в основной популяции колеблется в пределах 2–3%, однако в возрастной группе старше 85 лет может достигать 15% [3–5].

В последних временных рекомендациях Минздрава РФ по лечению коронавирусной инфекции [2] при подборе схем антикоагулянтной профилактики и терапии основной акцент сделан на мониторинг показателей гемостаза. Из гематологических показателей рекомендации касаются только количества тромбоцитов, поскольку тромбоцитопения бывает фактором риска кровотечения и показанием для уменьшения дозы антикоагулянтов или даже их отмены. В то же время известно, что среднетяжёлые и тяжёлые случаи COVID-19 сопровождаются значительными изменениями гематологических показателей, таких как количество лейкоцитов, а также соотношение тромбоцитов и лимфоцитов, которые отражают системное воспаление и могут иметь прогностическое значение, предопределяя течение болезни и её исход [6–9].

Наряду с изменениями «белой» крови COVID-19 сопровождается анемией и изменением качественного состава эритроцитов, отражая гемолиз и нарушения гемопоэза в ответ на гиперпродукцию медиаторов воспаления [10]. COVID-19 часто сопровождается коагулопатиями, которые ассоциированы с большой частотой венозных и артериальных макро- и микротромбозов [11, 12]. В развитии коагулопатий и тромбозов важнейшую роль играют клетки крови и эндотелия, которые способны индуцировать внутрисосудистую активацию системы гемостаза и поддерживать высокий тромботический потенциал, экспрессируя и секретируя прокоагулянты и образуя матрицу для сборки ферментных комплексов коагуляционного каскада [13]. Нарушения свёртывания крови в комбинации с системным васкулитом становятся основными факторами, предопределяющими развитие полиорганной недостаточности у пациентов с тяжёлыми осложнениями COVID-19 и высоким риском смерти [14].

Эти и другие данные указывают на важность количественных и качественных изменений клеток крови при COVID-19, которые обусловливают важнейшие и разнообразные патофизиологические процессы, определяю-

щие клиническую картину заболевания и его течение. Контроль гематологических показателей и понимание механизмов изменений клеточного состава крови у пациентов с COVID-19 может помочь в определении прогноза и выборе тактики лечения для улучшения исходов заболевания.

Цель исследования — установить связь гематологических нарушений с патогенезом, течением и исходами COVID-19.

Материал и методы исследования. *Характеристика клинического материала*. Исследование проведено на пациентах с подтверждённым диагнозом новой коронавирусной инфекции COVID-19, поступивших в COVID-госпиталь на базе ГАУЗ «Городская клиническая больница №16» г. Казани. Исследование проводили при наличии письменного согласия пациентов и согласно разрешению этического комитета Казанского (Приволжского) федерального университета (выписка из протокола №27 от 28.12.2020).

Обследованы 235 пациентов в возрасте от 33 до 92 лет (средний возраст 68 лет), в том числе 107 (46%) мужчин и 128 (54%) женщин. Критерии включения пациентов в исследование:

– возраст старше 18 лет;

– диагноз COVID-19, подтверждённый с помощью полимеразной цепной реакции (тест на рибонуклеиновую кислоту вируса SARS-CoV-2);

– состояние пациента средней тяжести или тяжёлое [2];

– наличие инфильтратов в лёгких, характерных для вирусной пневмонии, по данным компьютерной томографии.

Критерии не включения пациентов в исследование: возраст младше 18 лет и наличие других инфекций (гепатитов B и C, инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека).

Все пациенты получали лечение в соответствии с временными рекомендациями Минздрава РФ [2], включавшее этиотропную, патогенетическую (в том числе иммуносупрессивную и антикоагулянтную), а также симптоматическую терапию.

Подавляющее большинство пациентов (90%) получали низкомолекулярные гепарины (НМГ) по одной из следующих схем:

1) стандартная профилактическая доза;

2) высокая профилактическая (промежуточная) доза;

3) лечебная доза [15].

Почти всем пациентам при госпитализации назначали стандартные профилактические дозы НМГ, исходя из массы тела [15] (исключение составляли пациенты с выраженной тромбоцитопенией на фоне сопутствующих гемобластозов, которые не получали НМГ). При прогрессирующей гиперкоагуляции, определяемой по растущим уровням D-димера и фибриногена, дозы НМГ повышали до высоких профилактических (при значениях для фибриногена ≤6,5 г/л и/или D-димера ≤1500 нг/мл) или лечебных (фибриноген >6,5 г/л и/или D-димер >1500 нг/мл).

Взятие крови для исследования проводили натощак перед очередным введением НМГ, то есть через 24 ч после последней подкожной инъекции при однократном суточном введении или через 12 ч после последней инъекции при двукратном суточном введении, на фоне сохраняющегося остаточного эффекта НМГ [16].

Общая клиническая характеристика обследованных пациентов представлена в табл. 1. Контрольную группу составили 50 условно здоровых доноров, из них 23 (46%) мужчины и 27 (54%) женщин в возрасте от 24 до 87 лет (средний возраст 65 лет). Таким образом, основная и контрольная группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Получение крови и её компонентов. Кровь из антекубитальной вены собирали в вакутейнер с 3,2% натрия цитратом («S-Monovette», Германия), смешивая в соотношении 9:1 по объёму. Первую пробу цитратной крови использовали для изучения контракции сгустка крови. Вторую пробу крови центрифугировали при 200 g в течение 10 мин при комнатной температуре, отбирали богатую тромбоцитами плазму и использовали для проточной цитометрии и сканирующей электронной микроскопии тромбоцитов. Третий образец крови стабилизировали K_3-ЭДТА[1] (конечная концентрация 1,6 мг/мл) в вакутейнерах S-Monovette и использовали для гематологических анализов. Стабилизированную кровь хранили и обрабатывали при комнатной температуре, использовали не позднее 4 ч после взятия.

Изучение контракции сгустков крови. Определение кинетики и степени контракции (ретракции, сжатия) сгустка крови проводили у 215 пациентов с COVID-19 и 40 здоровых доноров с помощью оригинального метода, основанного на динамической регистрации размера сгустка [17]. Перед определением двухканальную пластиковую измерительную кювету размером 12×7×1 мм ополаскивали 4% раствором Тритона X-100 на 150 мМ NaCl для предотвращения прилипания фибрина к стенкам кюветы, чтобы сделать возможным сжатие сгустка.

[1] ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики пациентов с COVID-19, включённых в исследование

Демографические и клинические характеристики		Количество пациентов (n=235), абс. (%)
Пол	Мужчины	107 (46)
	Женщины	128 (54)
Возраст, годы	<65	84 (36)
	≥65	151 (64)
Степень тяжести заболевания	Среднетяжёлая	177 (75)
	Тяжёлая	58 (25)
Степень поражения лёгких (по данным компьютерной томографии)	1-я	47 (20)
	1–2-я	111 (47)
	3–4-я	77 (33)
Длительность заболевания на момент обследования	<7 дней от начала заболевания	18 (8)
	7–14 дней от начала заболевания	103 (44)
	>14 дней от начала заболевания	114 (49)
Исход заболевания	Благоприятный	217 (92)
	Летальный	18 (8)
Сопутствующие заболевания и факторы риска тромбозов		
Гемобластозы		7 (3)
Гипертоническая болезнь		131 (56)
Сахарный диабет		56 (24)
Ишемическая болезнь сердца		44 (18)
Острый инфаркт миокарда		18 (8)
Острые нарушения мозгового кровообращения		26 (11)
Тромбофлебит сосудов нижних конечностей		10 (4)
Курение		16 (7)
Ожирение (индекс массы тела >30 кг/м^2)		78 (33)
Лечение		
Низкомолекулярный гепарин (дозы по [15])	Профилактическая доза	100 (42)
	Высокая профилактическая и лечебная дозы	118 (48)
Глюкокортикоиды (дексаметазон, метилпреднизолон, преднизолон)		221 (94)
Ингибиторы интерлейкина-6 (тоцилизумаб)		7 (3)
Противовирусные препараты (ингавирин, арбидол)		60 (26)
Муколитики (ацетилцистеин, амброксол)		120 (51)
Гидроксихлорохин (плаквенил)		82 (35)
Искусственная вентиляция лёгких		13 (6)

В пластиковой пробирке к цитратной крови последовательно добавляли $CaCl_2$ (конечная концентрация 2 мМ) и свежеразмороженный тромбин человека (конечная концентрация 1 ЕД/мл) для инициации свёртывания крови и активации тромбоцитов. После этого быстро переносили 80 мкл активированного образца в прозрачную измерительную кювету, предварительно подогретую до 37 °С в термостатируемой камере прибора «Регистратор тромбодинамики» (ООО «ГемаКор», Москва).

Фоторегистрацию размеров сгустка крови проводили автоматически каждые 15 с в течение 20 мин после добавления тромбина (рис. 1, А). Серийные изображения сгустка конвертировали в кинетическую кривую контракции (рис. 1, Б), по которой автоматически рассчитывали следующие параметры:

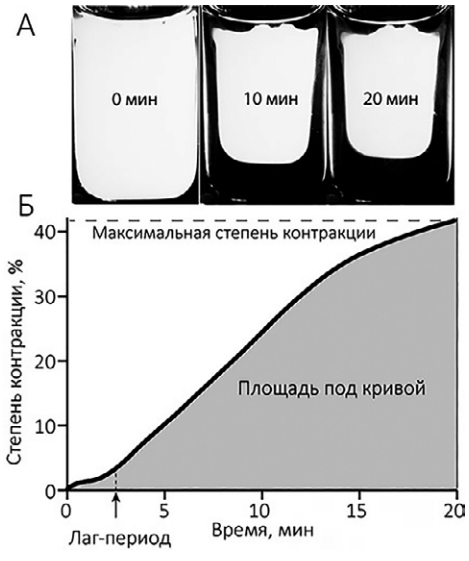

Рис. 1. Оптическая система для измерения кинетики контракции сгустка крови: А — примеры изображений сгустка на разных стадиях контракции; Б — типичная кинетическая кривая контракции сгустка крови и её основные параметры

1) конечная степень контракции — величина, отражающая степень сжатия сгустка (в процентах) относительно его первоначального размера после 20 мин регистрации;

2) лаг-период — время, в течение которого сгусток достигает 95% первоначального размера;

3) площадь под кинетической кривой, отражающая механическую работу тромбоцитов по сжатию сгустка;

4) средняя скорость контракции — степень сжатия сгустка (в процентах) в единицу времени.

Гематологический и иммунохимический анализ. Для микроскопии образцы цельной крови из пальца 65 пациентов смешивали с 3% раствором ЭДТА (трилона Б) в соотношении 1:3. Переносили каплю смеси на обезжиренное предметное стекло и делали мазок, который высушивали, фиксировали в метаноле (10 мин) и окрашивали по Романовскому–Гимзе. В каждом образце микроскопировали 10 полей зрения при увеличениях ×100 и ×400. Подсчёт клеток крови 235 пациентов и 50 здоровых доноров осуществляли на гематологическом анализаторе BC-3600 (Mindray, Китай). Уровень интерлейкинов в сыворотке крови 78 пациентов с COVID-19, имевших лабораторные признаки воспаления, определяли на приборе StatFax 2100 с применением наборов фирмы АО «Вектор-Бест» (Россия).

Проточная цитометрия тромбоцитов. Функциональное состояние тромбоцитов оценивали методом проточной цитометрии у случайно выбранных 20 пациентов с COVID-19 и 10 здоровых доноров по экспрессии P-селектина (CD62p) и активного интегрина αIIbβ3 до и после стимуляции пептидом (TRAP-6), активирующим рецептор тромбина. Для этого образец богатой тромбоцитами плазмы, содержащий 400 000 клеток, инкубировали в течение 10 мин с моноклональными антителами против CD62p, мечеными фикоэритрином (0,045 мкг/мл), и с антителами PAC-1 против активной формы интегрина αIIbβ3, мечеными флюоресцеин-5-изотиоцианатом (1 мкг/мл).

Пептидный активатор тромбоцитов TRAP-6 (50 мкМ), имитирующий действие тромбина, добавляли к богатой тромбоцитами плазме, инкубировали в течение 3 и 10 мин при комнатной температуре, после чего анализировали тромбоциты с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Гейт тромбоцитов определяли на основе их размера (прямое светорассеяние) и гранулярности (боковое светорассеяние); в каждом образце подсчитывали 5000 тромбоцитов. Для анализа данных использовали программное обеспечение CytExpert 2.4.

Сканирующая электронная микроскопия тромбоцитов. Образцы богатой тромбоцитами плазмы из крови 34 больных с COVID-19 разбавляли в 10 раз буфером Тироде (4 мМ HEPES; 135 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 2,4 мМ $MgCl_2$; 3,3 мМ NaH_2PO_4; 5,6 мМ D-глюкоза; 0,3% бычий сывороточный альбумин, pH=7,4), после чего фиксировали тромбоциты глутаровым альдегидом (2%) на физиологическом растворе в течение 90 мин при комнатной температуре с последующим хранением при 4 °C. Клетки осаждали центрифугированием (500 g, 3 мин) на поликарбонатном фильтре с размером пор 0,4 мкм и обрабатывали фосфатным буфером (3 раза по 5 мин), 30%, 50% этанолом (по 5 мин), 70% этанолом (10 мин), 80%, 90%, 95% этанолом (по 5 мин), 100% этанолом (3 раза по 20 мин).

Далее образцы помещали в 50% раствор гексаметилдисилазана (HMDS — от *Hexamethyldisilazane*) на этаноле (5 мин) и 100% HMDS (2 раза по 7 мин), после чего высушивали на воздухе при комнатной температуре 10–12 ч. Сухие образцы покрывали слоем золота с палладием на напылителях Polaron e5100 или Quorum Q150T ES, после чего проводили сканирующую электронную микроскопию (микроскоп Merlin, Carl Zeiss, Германия).

Сканирующая электронная микроскопия сгустков крови. Сгустки, образовавшиеся в результате свёртывания и контракции 80 мкл цельной крови 24 больных с COVID-19 с нормальной или сниженной контракцией, были

аккуратно, без механической пертурбации извлечены из кюветы прибора «Регистратор тромбодинамики», 2 раза промыты в физиологическом растворе и зафиксированы в 2% глутаровом альдегиде на физиологическом растворе в течение 90 мин при комнатной температуре. Сгустки рассекали пополам и обезвоживали, повышая долю этилового спирта от 30 до 100%, после чего замещали спирт добавлением избытка HMDS и высушивали. Образцы, ориентированные срезом кверху, напыляли смесью золота и палладия (Polaron e5100), и исследовали внутреннее содержание сгустков на сканирующем электронном микроскопе Merlin, Carl Zeiss, Германия.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием программных пакетов GraphPad Prism 8 и RStudio. Для оценки нормальности распределения выборки применяли критерии Д'Агостино–Пирсона, Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Оценку статистических различий для парных сравнений осуществляли с помощью непараметрического теста Манна–Уитни. Для многофакторного анализа применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением с использованием теста Данна. Ранговый корреляционный анализ проводили методом Спирмена. Для сравнения категориальных переменных применяли критерий χ^2. При оценке достоверности использовали уровень статистической значимости 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. *Изменения гемограммы и морфологии клеток крови при COVID-19.* Гематологический анализ у пациентов с COVID-19 выявил качественные и количественные изменения в клетках крови всех типов.

Среди клеток *эритроидного ряда* наиболее частыми отклонениями от нормы были микроанизоцитоз (44% случаев), пойкилоцитоз (30%) и ретикулоцитоз (6,3%). В сочетании с тельцами Жолли, мегалобластами, нормобластами и сидеробластами, а также снижением общего количества эритроцитов и уровня гемоглобина (табл. 2), эти изменения указывают на гемолитическую анемию и регенераторную активацию костного мозга с незавершённым эритропоэзом. Об этом же свидетельствует увеличение среднего объёма эритроцитов в сочетании с гипохромией эритроцитов (снижение среднего содержания и средней концентрации гемоглобина в эритроцитах; см. табл. 2). Развитие гемолитической анемии не только усугубляет гипоксию и ишемию органов и тканей, но и способствует прогрессированию гиперкоагуляции [18], следовательно, своевременная коррекция анемического синдрома позволит снизить риск тромботических осложнений.

Обращают на себя внимание нарушения *гранулоцитарного миелопоэза*, которые проявляются абсолютным и относительным нейтрофилёзом (см. табл. 2) в комбинации с многочисленными палочкоядерными гранулоцитами (в 20% случаев) и даже выраженной лейкемоидной реакцией миелоидного типа с появлением в периферической крови миелоцитов и метамиелоцитов (в 11% случаев). Эти изменения указывают на системное воспаление и высокий уровень воспалительных цитокинов, стимулирующих гранулоцитарный миелопоэз. Лейкоцитоз был обусловлен исключительно ростом количества нейтрофилов при незначительном абсолютном моноцитозе и нормальном содержании базофилов и эозинофилов (см. табл. 2). Количество *лимфоцитов* в крови у подавляющего большинства пациентов было снижено; средняя лимфопения, как абсолютная, так и относительная, была умеренной, но достоверной, свидетельствуя о супрессии адаптивного иммунитета при COVID-19 (см. табл. 2).

У пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой выявлено достоверное снижение количества тромбоцитов в крови, хотя медиана находилась в пределах референсных значений (см. табл. 2). Тромбоцитопения была обнаружена у 19% пациентов, из них у половины она была умеренной ($100–150 \times 10^9$/л), а у половины — выраженной (менее 100×10^9/л). У 7% пациентов зарегистрирован тромбоцитоз $>400 \times 10^9$/л. На фоне тромбоцитопении в единичных случаях в мазках крови присутствовали мегакариоциты, что указывает на компенсаторную и/или воспалительную активацию мегакариоцитопоэза.

Нарушение контракции сгустков крови у пациентов с COVID-19. Для оценки функционального состояния тромбоцитов и общего тромботического потенциала нами разработан тест кинетики контракции сгустков крови, который находит всё большее применение при разных видах патологии [17, 19–22]. Этот тест основан на измерении полноты и скорости сжатия сгустков крови под действием активированных тромбоцитов и зависит от количества и качества тромбоцитов, а также от клеточного белкового состава крови [17]. При сравнении параметров кинетики контракции сгустков крови в группе пациентов и в контроле при COVID-19 обнаружено выраженное достоверное торможение всех стадий процесса контракции: снижение средней степени и ско-

Таблица 2. Гематологические показатели у пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми донорами

Показатели (в скобках референсные значения)	Пациенты с COVID-19 (n=235)	Здоровые доноры (n=50)
Гемоглобин (110–160), г/л	126 (110; 137)**	146 (135; 153)
Гематокрит (37–54), %	39 (34; 43)	41 (36; 43)
Скорость оседания эритроцитов (2–10), мм/ч	32 (18; 45)**	7 (5; 12)
Эритроциты (3,9–4,7), $\times 10^{12}$/л	4,3 (3,8; 4,7)*	4,6 (4,3; 4,9)
Средний объём эритроцитов (80–100), фл.	89 (86; 93)**	86 (84; 88)
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (27–34), пг	28,9 (27,6; 29,8)**	31,7 (29,8; 33,7)
Ширина распределения эритроцитов по объёму (11–16), %	13,9 (13,4; 15,2)	13,9 (13,4; 14,6)
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (320–360), г/л	321 (315; 326)**	366 (352; 386)
Тромбоциты (180–360), $\times 10^9$/л	225 (158; 292)*	247 (220; 300)
Средний объём тромбоцитов (6,5–12,0), фл.	9,7 (9,0; 10,8)**	8,1 (7,5; 8,8)
Тромбокрит (0,108–0,282), %	0,228 (0,179; 0,287)	0,260 (0,200; 0,305)
Лейкоциты (4–10), $\times 10^9$/л	7,5 (5,2; 11,1)**	5,1 (4,2; 6,2)
Нейтрофилы (46–72), %	74,0 (64,7; 83,0)**	58,3 (54,6; 64,5)
Нейтрофилы (2–7), $\times 10^9$/л	5,2 (3,4; 8,3)**	2,9 (2,2; 3,6)
Моноциты (3–11), %	5,2 (4,0; 8,0)	6,0 (5,1; 6,9)
Моноциты (0,1–1,5), $\times 10^9$/л	0,4 (0,2; 0,7)*	0,3 (0,2; 0,4)
Лимфоциты (18–38), %	17 (10; 24)**	35 (29; 39)
Лимфоциты (0,8–4,0), $\times 10^9$/л	1,1 (0,7; 1,7)**	1,7 (1,4; 2,3)
Эозинофилы (0,5–5), %	1,0 (0; 3,0)	1,0 (0,8; 1,2)
Эозинофилы (0,02–0,30), $\times 10^9$/л	0,10 (0; 0,19)	0,10 (0,07; 0,17)
Базофилы (0–1), %	0	0,6 (0,3; 0,7)
Базофилы (0–0,07), $\times 10^9$/л	0	0,04 (0,03; 0,05)

Примечание: результаты представлены в виде медианы и интерквартильного интервала (25-й и 75-й процентили); *p <0,01, **p <0,0001, критерий Манна–Уитни.

рости контракции, площади под кинетической кривой, а также удлинение лаг-периода (рис. 2, табл. 3, А).

Клинический анализ выявил связь изменённой контракции сгустков крови с тяжестью и исходами заболевания. При тяжёлом течении заболевания отмечено достоверное угнетение контракции сгустков крови по всем параметрам в сравнении со среднетяжёлой формой болезни (табл. 3, Б).

Кроме того, у наиболее тяжёлой категории пациентов, находящихся на искусственной вентиляции лёгких, лаг-период контракции был замедлен [медиана 240 с, интерквартильный размах (IQR) 195; 465] по сравнению с пациентами без искусственной вентиляции лёгких (медиана 180 с, IQR 150; 210; p <0,01).

В соответствии с обнаруженной зависимостью от тяжести болезни в подгруппе пациентов с летальным исходом зарегистрировано достоверное угнетение контракции по всем параметрам по сравнению с подгруппой пациентов с благоприятным исходом (табл. 3, В). Выявленная связь показателей контракции сгустков крови с тяжестью и исходами COVID-19 указывает на патогенетическую роль нарушенной контракции, а также на возможное прогностическое и диагностическое значение теста кинетики контракции сгустков крови.

Кроме основного заболевания, скорость и полнота контракции сгустков крови зависели от сопутствующей патологии. В частности, у пациентов с COVID-19 и сопутствующими гемобластозами были достоверно снижены степень контракции и площадь под кинетической кривой, а также удлинён лаг-период (табл. 3, Г). Аналогичные изменения параметров контракции сгустков присутствовали на фоне сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца (табл. 3, Д) и острые нарушения мозгового кровообращения в анамнезе (табл. 3, Е).

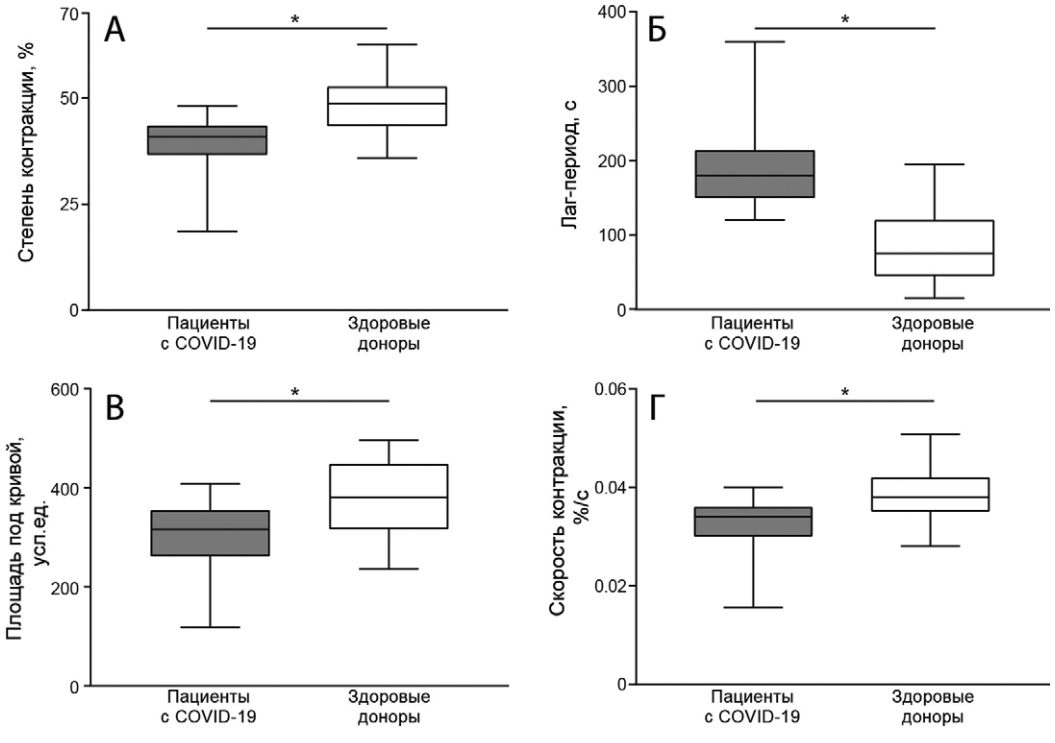

Рис. 2. Параметры контракции сгустков крови пациентов с COVID-19 (n=215) и здоровых доноров (n=40): А — степень контракции; Б — лаг-период; В — площадь под кривой; Г — средняя скорость; результаты представлены в виде медианы и интерквартильного интервала (25-й и 75-й процентили); *p <0,001, критерий Манна–Уитни

Эти результаты подтверждают опубликованные ранее данные об угнетении контракции сгустков крови при венозных тромбоэмболических осложнениях [19] и остром ишемическом инсульте [20]. Следует отметить, что у пациентов-мужчин с COVID-19 степень, скорость контракции и площадь под кривой достоверно снижены по сравнению с пациентками (табл. 3, Ж), что отражает более тяжёлое течения заболевания у мужчин [23, 24].

Связь параметров контракции сгустков крови с клеточным и белковым составом крови при COVID-19. Чтобы выявить причины нарушения контракции сгустков крови у пациентов с COVID-19, параметры контракции были сопоставлены с результатами других лабораторных тестов. Известно, что главной причиной нарушенной контракции сгустков крови бывают тромбоцитопения и дисфункция тромбоцитов в сочетании с патологическими изменениями состава крови [17]. Зависимость степени контракции сгустков крови от количества тромбоцитов наглядно представлена на рис. 3. Снижение степени, средней скорости и площади под кривой контракции, по сравнению с нормальным уровнем тромбоцитов, происходит уже при умеренной тромбоцитопении (100–150×10^9/л), тогда как при падении количества тромбоцитов до 50×10^9/л и ниже возникают прогрессивное замедление и почти полное подавление контракции. Эти данные подтверждают ключевую роль сократительной функции тромбоцитов в контракции сгустков крови и важную патогенетическую роль тромбоцитопении и, возможно, тромбоцитопатии при COVID-19.

Корреляционный анализ показателей контракции сгустка крови и тестов гемокоагуляции выявил слабые или умеренные, но достоверные взаимосвязи. Степень контракции положительно коррелировала с количеством тромбоцитов (r=0,25, p <0,001), а также отрицательно коррелировала со средним объёмом эритроцитов (r=–0,24, p <0,05) и средним содержанием гемоглобина (r=–0,29, p <0,01). Уровень тромбоцитов и тромбокрит положительно коррелировали с площадью под кинетической кривой (r=0,31, p <0,001 и r=0,22, p <0,05 соответственно) и скоростью контракции (r=0,25, p <0,001 и r=0,24, p <0,05). Лаг-период находился в обратной зависимости от количества тромбоцитов (r=–0,26, p <0,001) и положительно коррелировал с протромбиновым временем (r=0,35, p <0,01). Площадь под кинетической кривой отрицательно коррелировала с протромбиновым временем (r=–0,33, p <0,01). Средняя скорость контракции коррелировала

Таблица 3. Параметры контракции сгустков крови у пациентов с COVID-19

Группы и подгруппы сравнения	Параметры контракции			
	Степень контракции, %	Лаг-период, с	Площадь под кривой, усл.ед.	Средняя скорость, %/с $\times 10^{-3}$
А. Пациенты с COVID-19 и здоровые доноры				
Пациенты (n=215)	41 (37; 43)***	180 (150; 213)***	315 (261; 354)***	34 (31; 36)***
Доноры (n=40)	48 (43; 52)	75 (45; 120)	380 (316; 447)	38 (35; 42)
Б. Зависимость от тяжести заболевания				
Среднетяжёлая форма (n=149)	41 (38; 44)*	180 (150; 195)**	322 (280; 358)**	34 (32; 36)*
Тяжёлая форма (n=51)	39 (33; 43)	210 (165; 255)	298 (220; 337)	32 (27; 35)
В. Зависимость от исхода заболевания				
Благоприятный исход (n=184)	41 (38; 44)	180 (150; 210)	317 (271; 357)	34 (31; 36)
Летальный исход (n=16)	35 (27; 42)*	255 (195; 349)***	238 (156; 320)**	30 (22; 35)**
Г. Зависимость от наличия сопутствующих гемобластозов				
Есть гемобластозы (n=8)	28 (17; 42)*	218 (150; 251)	200 (117;304)**	23 (14; 34)
Нет гемобластозов (n=207)	41 (37; 44)	180 (150; 210)	316 (270; 357)	34 (31; 36)
Д. Зависимость от наличия сопутствующей ишемической болезни сердца (ИБС)				
Есть ИБС (n=41)	39 (33; 41)**	195 (165; 240)*	298 (227; 335)*	32 (29; 35)*
Нет ИБС (n=159)	41 (38; 44)	180 (150; 210)	324 (276; 361)	34 (32; 36)
Е. Зависимость от наличия сопутствующих острых нарушений мозгового кровообращения (ОНМК)				
Есть ОНМК (n=23)	36 (27; 43)*	225 (165; 285)**	272 (152; 318)*	30 (22; 36)*
Нет ОНМК (n=162)	41 (38; 44)	180 (150; 210)	323 (279; 358)	34 (31; 36)
Ж. Зависимость от половой принадлежности				
Женщины (n=115)	42 (39; 45)***	180 (150; 225)	323 (291;371)**	34 (32; 37)***
Мужчины (n=100)	39 (35; 42)	180 (150; 210)	306 (253; 341)	33 (29; 35)

Примечание: результаты представлены в виде медианы и интерквартильного интервала (25-й и 75-й процентили); *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, критерий Манна–Уитни.

отрицательно со средним объёмом эритроцитов (r=–0,22, p <0,05) и средним содержанием гемоглобина (r=–0,25, p <0,01). Кроме корреляционных связей, обнаружено удлинение лаг-периода до 203 с (IQR 165; 251) при уровне гемоглобина <110 г/л, тогда как при уровне гемоглобина >110 г/л лаг-период был 180 с (IQR 150; 210, p <0,01).

Связи между такими разными параметрами указывают на то обстоятельство, что причины изменения кинетики контракции сгустков крови включают, но не исчерпываются количеством и функциональным состоянием тромбоцитов. Связь нарушений контракции сгустков крови со средним объёмом эритроцитов и содержанием гемоглобина в эритроцитах свидетельствует о том, что изменения «красной» крови также следует принимать во внимание при оценке риска тромботических осложнений и тромбопрофилактике у пациентов с COVID-19.

Важно отметить, что степень контракции сгустков крови была связана с уровнем D-димера в крови: при угнетённой контракции (степень контракции <41%) доля пациентов с повышенным уровнем D-димера (>1000 нг/мл) была достоверно больше, чем в подгруппе пациентов с нормальной контракцией ≥41% (p=0,047, критерий χ^2), что подтверждает ассоциацию нарушенной контракции сгустков крови с внутрисосудистым отложением фибрина, лизис которого становится источником D-димера.

Эти закономерности указывают на патогенетическую связь нарушенной контракции сгустков крови с изменениями клеточного и белкового состава крови, что подтверждает информативность теста кинетики контракции при COVID-19.

Строение и состав сгустков крови у пациентов с COVID-19. По данным сканирующей электронной микроскопии сгустков крови, главные структурные элементы — волокна фибрина и эритроциты. Поскольку сгустки претерпевают сжатие (контракцию, или ретракцию), эритроциты в зависимости от степени их

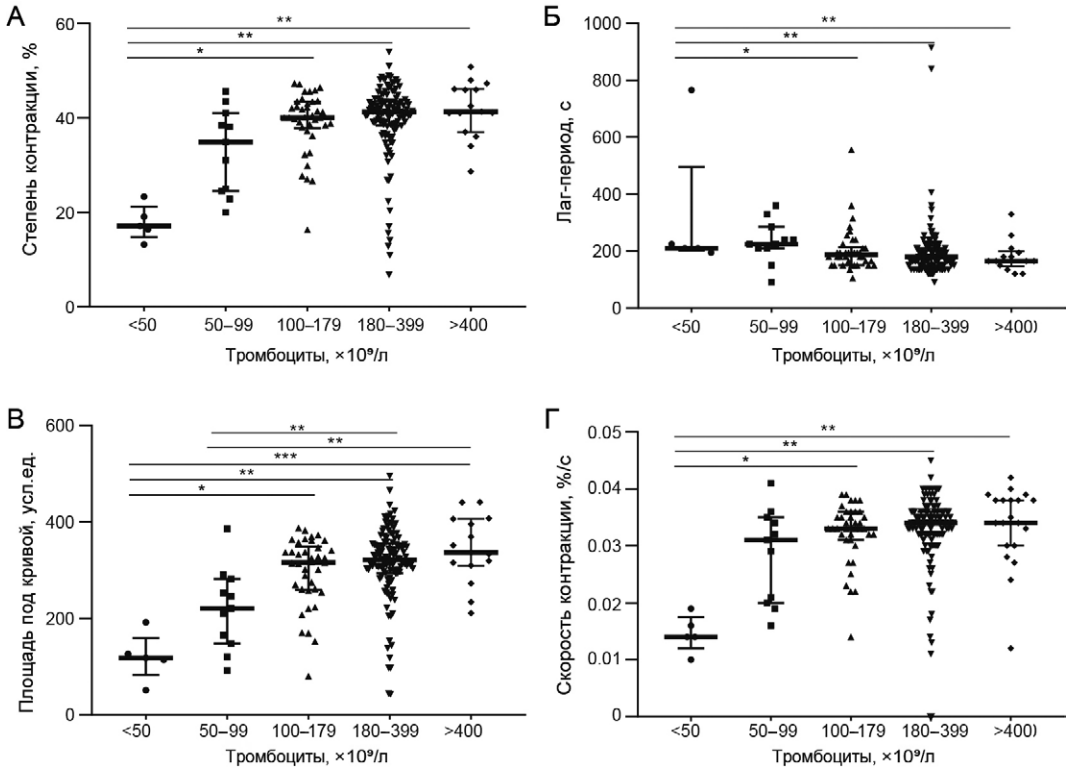

Рис. 3. Зависимость параметров контракции сгустков крови пациентов с COVID-19 от количества тромбоцитов: А — степень контракции; Б — лаг-период; В — площадь под кривой; Г — средняя скорость; результаты представлены в виде медианы и интерквартильного интервала (25-й и 75-й процентили); *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, метод Краскела–Уоллиса с последующим тестом Данна для парных сравнений.

компрессионной деформации условно подразделяются на четыре типа [25]:

1) двояковогнутые (исходные, недеформированные);

2) частично деформированные, но близкие к исходным («промежуточные двояковогнутые»);

3) более деформированные, приобретающие признаки многогранников («промежуточные многогранные»);

4) максимально деформированные до стадии многогранников, или полиэдров (полиэдроциты).

Образование полиэдроцитов обусловлено их компрессией под действием силы, генерируемой фибрино-тромбоцитарным комплексом. Наиболее очевидное физиологическое следствие компактной упаковки деформированных эритроцитов состоит в том, что это делает сгусток плотным и непроницаемым, в том числе для патогенов и фибринолитических ферментов.

Строение и состав сгустков крови у пациентов с COVID-19 при сходстве качественного состава сильно варьировали в зависимости от способности сгустков к контракции. Наиболее наглядно структурные различия видны при сопоставлении сгустков с самой низкой (13%) и самой высокой (49%) степенями контракции, которые представлены на рис. 4.

В первом случае (см. рис. 4, А) сгусток характеризуется более высокой порозностью, большим содержанием фибрина, почти полным отсутствием деформированных клеток (полиэдроцитов и близких к ним промежуточных многогранных) при сохранении фракции двояковогнутых эритроцитов. Патофизиологические последствия порозности сгустков крови и тромбов могут быть связанны с их пониженными гемостатическими свойствами вследствие повышенной проницаемости для крови и её компонентов. Другими словами, такие сгустки не могут эффективно препятствовать геморрагическому диатезу.

При высокой степени сжатия (см. рис. 4, Б) сгусток становится плотным, без межклеточных пор, с большим содержанием полиэдроцитов при полном отсутствии двояковогнутых эритроцитов. Важно отметить, что полная контракция сгустка приводит к перераспределению фибрина, который преобладает на краю сгустка и почти полностью отсутствует в центральной части, как было описано ранее [26].

Эти отличия приобретают характер общей закономерности при сравнении количественного состава сгустков из крови пациентов с COVID-19 с нормальной (≥41%) и понижен-

Таблица 4. Сравнительная характеристика строения и состава сгустков крови у пациентов с COVID-19 при пониженной (<41%) и нормальной (≥41%) степенях контракции

Изучаемые структуры	Контракция <41% (n=17)	Контракция ≥41% (n=7)
Объёмная доля сгустка, занимаемая каждым типом структурных элементов		
Эритроциты	70% (60; 80)**	90% (85; 94)
Фибрин	15% (10; 20)**	5% (5;10)
Поры	15% (10; 20)**	5% (3; 10)
Относительное число эритроцитов с восходящей степенью компрессии		
Двояковогнутые эритроциты (исходные, без компрессии)	10% (10; 25)***	0
Промежуточные двояковогнутые эритроциты	35% (30; 45)**	10% (3; 20)
Промежуточные многогранные эритроциты	30% (20; 40)	20% (10; 30)
Эритроциты в форме многогранника (полиэдроциты)	15% (10; 20)***	70% (40; 80)

Примечание: результаты представлены в виде медианы и интерквартильного интервала (25-й и 75-й процентили); *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001, критерий Манна–Уитни.

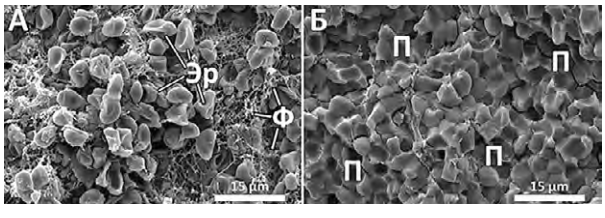

Рис. 4. Репрезентативные микрофотографии сгустков крови у больных COVID-19 с низкой (13%) (А) и высокой (49%) (Б) степенями контракции, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии: А — сгусток с высокой порозностью, большим содержанием фибрина (Ф) и сохранением фракции двояковогнутых эритроцитов (Эр); Б — сгусток плотный, без межклеточных пор, с большим содержанием многогранных эритроцитов — полиэдроцитов (П)

ной (<41%) степенью контракции (табл. 4). При полноценной контракции преобладали эритроциты с признаками компрессионной деформации, фибрин аккумулировался на периферии сгустка, порозность была снижена. И напротив, при нарушенной контракции сгустков доля деформированных (многогранных) эритроцитов была низкая, порозность относительно высокая, а фибрин присутствовал во всех участках сгустка без тенденции к его перераспределению на периферию.

Учитывая, что снижение степени контракции относительно нормы обнаружено у 53% обследованных пациентов с COVID-19 и что это нарушение статистически значимо сочеталось с более тяжёлым течением и неблагоприятным исходом заболевания (см. табл. 3), полученные морфологические данные могут объяснить эту патогенетическую связь, если экстраполировать их на прижизненные микро- и макротромбы.

Во-первых, уплотнение межклеточных пространств, компактность и сжатие тромба вследствие контракции уменьшают окклюзию сосуда и улучшают местный кровоток. И напротив, при нарушении контракции тромботическая обтурация сосудов более выражена, что усугубляет ишемию [20].

Во-вторых, контрактированные сгустки и тромбы с высокой плотностью фибриновых волокон и повышенной локальной концентрацией фибринолитиков быстрее лизируются изнутри — в отличие от рыхлых, слабо контрактированных сгустков, которые имеют низкую чувствительность к внутреннему фибринолизу и, следовательно, существуют дольше [27].

В-третьих, степень контракции определяет механическую стабильность тромбов, то есть склонность к эмболизации, так что тромбы с меньшей степенью контракции потенциально более эмбологенны [19], что может объяснять высокую частоту тромбоэмболии лёгочной артерии и кардиоэмболических ишемических инсультов при COVID-19 [14,28,29].

Таким образом, строение и состав сгустков крови образуют структурную основу для патофизиологических последствий нарушения контракции сгустков крови и тромбов у пациентов с COVID-19.

Изменения функционального состояния тромбоцитов при COVID-19. Относительная тромбоцитопения сочеталась с умеренными изменениями функционального состояния тромбоцитов, определённого по экспрессии маркёров активации (P-селектина и активного интегрина αIIbβ3), секреции растворимого sP-селектина и морфологическим признакам (сканирующая электронная микроскопия).

По данным проточной цитометрии, в крови пациентов с COVID-19 по сравнению со здоровыми донорами обнаружена в среднем двукратная фоновая («спонтанная») активация тромбоцитов по способности экспрессировать P-селектин на поверхность плазматической

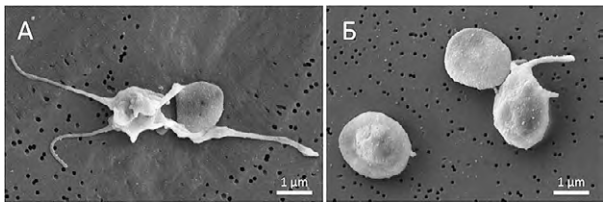

Рис. 5. Репрезентативные микрофотографии частично активированных (А) и покоящихся (Б) тромбоцитов из крови пациентов с COVID-19, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии

мембраны (медиана 2,3%, IQR 1,2; 3,0 у пациентов с COVID-19 — против медианы 1,1%, IQR 0,6; 1,8, p <0,05). После 3-минутной инкубации с активатором (TRAP-6) медианная доля тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин, у пациентов с COVID-19 составила 85% (IQR 77; 87), что на 12% выше, чем у здоровых доноров (медиана 73%, IQR 65; 81, p <0,05), хотя эта достоверная разница нивелировалась к 10 мин после активации.

Одновременно с этим через 10 мин инкубации тромбоцитов с TRAP-6 у пациентов с COVID-19 происходило незначительное, но достоверное снижение уровня экспрессии активного интегрина αIIbβ3: доля активированных тромбоцитов у пациентов с COVID-19 составила 91% (IQR 89; 94), а у здоровых доноров — 95% (IQR 93; 96, p <0,01).

Эти разнонаправленные изменения указывают на не очень выраженную, но достоверную активацию циркулирующих тромбоцитов с одновременными признаками дисфункции, хотя и не достигающих степени истощения и рефрактерности.

Экспрессия Р-селектина на наружной мембране сопровождается его секрецией, поэтому повышенный уровень растворимого sP-селектина в крови также служит биохимическим маркёром активации тромбоцитов [30]. Для пациентов с COVID-19 было характерно достоверное увеличение концентрации sP-селектина (медиана 81 нг/мл, IQR 55; 104) относительно здоровых доноров (медиана 55 нг/мл, IQR 31; 70, p <0,001). Важно подчеркнуть, что уровень sP-селектина прямо коррелировал с содержанием в крови воспалительных клеток: нейтрофилов (r=0,53; p <0,0001), лимфоцитов (r=0,29; p=0,014) и моноцитов (r=0,25; p=0,045).

Кроме того, высокое содержание sP-селектина (медиана 82,5 нг/мл; IQR 64,6; 111,6) сочеталось с гиперпродукцией воспалительного цитокина интерлейкина-8 (>35 пг/мл), тогда как при более низкой его концентрации (<35 пг/мл) содержание sP-селектина в крови было достоверно меньше (медиана 58,2; IQR 50,2; 87,5, p=0,029). Попутное, но важное наблюдение, подтверждающее важность воспалительных цитокинов в развитии респираторного синдрома при COVID-19: у пациентов с уровнем интерлейкина-8 >35 пг/мл уровень сатурации крови кислородом (медиана 94%; IQR 92; 96) был достоверно ниже, чем у пациентов с уровнем интерлейкина-8 <35 пг/мл (медиана 96%; IQR 93; 97, p=0,038).

Сканирующая электронная микроскопия тромбоцитов, выделенных из крови 34 случайно выбранных пациентов с COVID-19, также выявила морфологические признаки умеренной спонтанной активации тромбоцитов у всех обследованных пациентов. Активация тромбоцитов проявлялась в виде утраты дисковидной формы тела тромбоцита, уменьшении диаметра тела тромбоцита, образовании множественных филоподий (рис. 5, А). Несмотря на наличие активированных тромбоцитов, большая часть клеток сохраняла дисковидную форму при отсутствии или наличии одной-двух коротких филоподий, что характерно для покоящихся не активированных тромбоцитов (рис. 5, Б).

Полученные результаты указывают на то обстоятельство, что тромбоциты вовлечены в патогенез COVID-19. Это проявляется как количественными (относительная тромбоцитопения), так и качественными (экспрессия и секреция Р-селектина, сниженная экспрессия активного интегрина αIIbβ3 при морфологических признаках активации клеток) изменениями.

Дисфункция тромбоцитов в сочетании с нарушением контракции сгустков крови и гиперкоагуляцией по данным рутинной коагулограммы, которые развиваются на фоне профилактических и лечебных доз НМГ, свидетельствуют о персистирующей внутрисосудистой активации свёртывания крови у пациентов с COVID-19 и требуют поиска дополнительных методов её коррекции. Речь может идти как о более раннем назначении, наряду с антикоагулянтами, глюкокортикоидов, обладающих косвенным антитромботическим эффектом, так и о применении дезагрегантов, прежде всего у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и артериальными тромбозами в анамнезе. Наличие корреляционной связи между активацией тромбоцитов и воспалительными изменениями (нейтрофилёз, моноцитоз и гиперпродукция цитокинов) позволяет рассматривать воспаление как фактор риска тромботических осложнений и служит дополнительным основанием для иммуносупрессивной терапии.

Заключение. Изучены гемограмма и морфология клеток крови, а также функцио-

нальное состояние тромбоцитов в остром периоде COVID-19 в сопоставлении с клинической картиной и лабораторными показателями воспаления на фоне антикоагулянтной и иммуносупрессивной терапии. У большинства обследованных пациентов, наряду с признаками анемии, нейтрофилёза и лимфопении, в крови присутствуют незрелые формы эритроцитов и лейкоцитов, что указывает на регенераторную и/или воспалительную активацию гемопоэза.

Для интегральной оценки количества и качества тромбоцитов использовали тест кинетики контракции (ретракции) сгустков крови, угнетение которой, по данным литературы, сочетается с предрасположенностью к тромбозам. У пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой обнаружено выраженное торможение контракции сгустков крови, которое прямо коррелирует с тяжестью заболевания и вероятностью летального исхода. Снижение скорости и полноты контракции сгустков крови усугубляется наличием сопутствующих заболеваний, включая гемобластозы, ишемическую болезнь сердца и острые нарушения мозгового кровообращения.

У пациентов-мужчин с COVID-19 параметры контракции достоверно снижены по сравнению с пациентками, что указывает на более высокий риск тромботических осложнений у мужчин. Степень контракции сгустков прямо коррелирует с количеством тромбоцитов в крови, а также с лабораторными признаками анемии и коагулопатии, включая уровень D-димера, что подтверждает патогенетическую значимость контракции и информативность теста кинетики контракции сгустков при COVID-19.

В основе нарушенной контракции сгустков крови у пациентов с COVID-19 лежит снижение суммарного сократительного потенциала тромбоцитов на фоне умеренной тромбоцитопении в сочетании с хронической активацией и вторичной дисфункцией тромбоцитов, выявляемых по повышенной секреции P-селектина, сниженной экспрессии активного интегрина αIIbβ3 и морфологическим признакам активации клеток.

По данным сканирующей электронной микроскопии сгустков крови, их строение и клеточный состав зависят от полноты контракции. При неполной контракции сгустков, которая выявлена у 53% обследованных пациентов, сгустки отличаются высокой порозностью, низким содержанием деформированных многогранных эритроцитов (полиэдроцитов) и равномерным распределением фибрина, тогда как при полноценной контракции порозность сгустков снижена, преобладают полиэдроциты, фибрин аккумулируется на периферии сгустка. Эти данные раскрывают структурные механизмы патогенетической связи нарушенной контракции сгустков крови с высоким риском тромботических осложнений при COVID-19.

Результаты указывают на то обстоятельство, что в патогенез COVID-19 вовлечены все клетки крови, которые претерпевают как количественные, так и качественные изменения. Предрасположенность к тромботическим осложнениям при COVID-19 может быть связана с образованием несжатых, некомпактных сгустков крови, что увеличивает тромботическую обтурацию сосудов, уменьшает чувствительность к фибринолизу и усиливает эмбологенность прижизненных сгустков крови и тромбов.

Совокупность полученных данных подтверждает важную патогенетическую роль клеток крови при COVID-19 и обосновывает информативность лабораторного контроля гематологических показателей, включая кинетику контракции сгустков крови. Важно отметить что, несмотря на применение антикоагулянтов, у большинства обследованных пациентов с COVID-19 сохраняются признаки активации как клеточного, так и плазменного компонентов системы гемостаза, а значит, сохраняется риск тромботических осложнений.

Недостаточный эффект гепаринопрофилактики и гепаринотерапии способствует стойким нарушениям микроциркуляции, что предопределяет длительное течение заболевания и может быть причиной перехода в более тяжёлую форму, вплоть до полиорганной недостаточности и неблагоприятного исхода. Причиной малоэффективной антикоагулянтной и противовоспалительной терапии при COVID-19 может быть недооценка клеточных механизмов активации системы гемостаза, особенно у больных с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями и осложнённым тромботическим анамнезом.

Понимание важной роли гематологических нарушений и лабораторный мониторинг способны помочь в определении степени тяжести, прогноза и выборе персонифицированного медикаментозного лечения пациентов с COVID-19 для улучшения течения и исходов заболевания.

ВЫВОДЫ

1. В патогенезе COVID-19 участвуют клетки крови, которые претерпевают как количественные, так и качественные изменения.

2. Одним из протромботических механизмов может быть нарушение контракции сгустков крови.

3. Полученные результаты подтверждают важную патогенетическую роль клеток крови при COVID-19 и обосновывают информативность лабораторного мониторинга гематологических показателей, включая кинетику контракции сгустков крови.

Участие авторов. Р.И.Л. и С.И.С. — концепция и дизайн исследования; С.С.С. — сбор клинического материала; Н.Г.Е., И.А.А. и Г.Р.Т. — проведение лабораторных исследований; Р.И.Л., Н.Г.Е., А.Д.П., И.А.А., Р.Р.Х. и Ш.М.А. — обработка и анализ данных; Р.И.Л., С.И.С., Н.Г.Е., А.Д.П., Р.Р.Х. и И.А.А. — написание статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена за счёт средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета, гранта 21-75-00010 Российского научного фонда и грантов Российского фонда фундаментальных исследований 19-015-00075 и 18-415-160004 (совместный с Республикой Татарстан).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

Благодарности. Авторы выражают благодарность компании ООО «ГемаКор» (Москва) за предоставление регистратора тромбодинамики, использованного в данной работе. Сканирующая электронная микроскопия проведена на базе Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bhatraju P.K., Ghassemieh B.J., Nichols M., Kim R., Jerome K.R., Nalla A.K., Greninger A.L., Pipavath S., Wurfel M.M., Evans L., Kritek P.A., West T.E., Luks A., Gerbino A., Dale C.R., Goldman J.D., O'Mahony S., Mikacenic C. Covid-19 in critically ill patients in the Seattle region — Case Series. *N. Engl. J. Med*. 2020; 382: 2012–2022. DOI: 10.1056/NEJMoa2004500.

2. *Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»*. Министерство здравоохранения РФ. Версия 10 (08.02.2021). 261 с. https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/054/588/original/%D0%92%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.10%29-08.02.2021_%281%29.pdf (дата обращения: 09.02.2021). [*Temporary guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of the new coronavirus infection (COVID-19)"*. Ministry of Health of the Russian Federation. Version 10 (08.02.2021). 261 p. https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/054/588/original/%D0%92%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B5_%D0%9C%D0%A0_COVID-19_%28v.10%29-08.02.2021_%281%29.pdf (access date: 09.02.2021). (In Russ.)]

3. *COVID-19 dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU)*. ArcGIS. Johns Hopkins University. https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6 (access date: 01.02.2021).

4. Levin A.T., Hanage W.P., Owusu-Boaitey N., Cochran K.B., Walsh S.P., Meyerowitz-Katz G. Assessing the age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *Eur. J. Epidemiol*. 2020; 35 (12): 1123–1138. DOI: 10.1007/s10654-020-00698-1.

5. Dudel C., Riffe T., Acosta E., Dudel C., Riffe T., Acosta E., van Raalte A., Strozza C., Myrskylä M. Monitoring trends and differences in COVID-19 case-fatality rates using decomposition methods: Contributions of age structure and age-specific fatality. *PLoS One*. 2020; 15 (9): e0238904. DOI: 10.1371/journal.pone.0238904.

6. Linssen J., Ermens A., Berrevoets M., Seghezzi M., Previtali G., van der Sar-van der Brugge S., Russcher H., Verbon A., Gillis J., Riedl J., de Jongh E., Saker J., Münster M., Munnix I.C., Dofferhof A., Scharnhorst V., Ammerlaan H., Deiteren K., Bakker S.J., Van Pelt L.J., Kluiters-de Hingh Y., Leers M.P., van der Ven A.J. A novel haemocytometric COVID-19 prognostic score developed and validated in an observational multicentre European hospital-based study. *eLife*. 2020; 9: e63195. DOI: 10.7554/eLife.63195.

7. Qu R., Ling Y., Zhang Y.H., Wei L.Y., Chen X., Li X.M., Liu X.Y., Liu H.M., Guo Z., Ren H., Wang Q. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J. Med. Virol*. 2020; 92 (9): 1533–1541. DOI: 10.1002/jmv.25767.

8. Gasparyan A.Y., Ayvazyan L., Mukanova U., Yessirkepov M., Kitas G.D. The platelet-to-lymphocyte ratio as an inflammatory marker in rheumatic diseases. *Ann. Lab. Med*. 2019; 39 (4): 345–357. DOI: 10.3343/alm.2019.39.4.345.

9. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Elalamy I., Kastritis E., Sergentanis T.N., Politou M., Psaltopoulou T., Gerotziafas G., Dimopoulos M.A. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am. J. Hematol*. 2020; 95 (7): 834–847. DOI: 10.1002/ajh.25829.

10. Murphy P., Glavey S., Quinn J. Anemia and red blood cell abnormalities in COVID-19. *Leukemia & Lymphoma*. 2021; 22: 1–2. DOI: 10.1080/10428194.2020.1869967.

11. Tang N., Bai H., Chen X., Gong J., Li D., Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J. Thromb. Haemost*. 2020; 18 (5): 1094–1099. DOI: 10.1111/jth.14817.

12. Thachil J., Tang N., Gando S., Falanga A., Cattaneo M., Levi M., Clark C., Iba T. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J. Thromb. Haemost*. 2020; 18 (5): 1023–1026. DOI: 10.1111/jth.14810.

13. Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J.H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020; 7 (6): e438–e440. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.

14. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost*. 2020; 18 (4): 844–847. DOI: 10.1111/jth.14768.

15. Сафиуллина С.И., Литвинов Р.И. Рекомендации по профилактике и коррекции тромботических осложнений при COVID-19. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (4): 485–488. [Safiullina S.I., Litvinov R.I. Recommendations for the prevention and correction of thrombotic complications in COVID-19. *Kazan Medical Journal.* 2020; 101 (4): 485–488. (In Russ.)] DOI: 10.17816/KMJ2020-485.

16. Alban S., Welzel D., Hemker H.C. Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of a medium-molecular-weight heparin in comparison with UFH and LMWH. *Semin. Thromb. Hemos.* 2002; 28 (4): 369–378. DOI: 10.1055/s-2002-34306.

17. Tutwiler V., Litvinov R.I., Lozhkin A.P., Peshkova A.D., Lebedeva T., Ataullakhanov F.I., Spiller K.L., Cines D.B., Weisel J.W. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by molecular and cellular blood composition. *Blood*. 2016; 127 (1): 149–159. DOI: 10.1111/jth.14370.

18. Weisel J.W., Litvinov R.I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost*. 2019; 17 (2): 271–282. DOI: 10.1111/jth.14360.

19. Peshkova A.D., Malyasyov D.V., Bredikhin R.A., Le Minh G., Andrianova I.A., Tutwiler V., Nagaswami C., Weisel J.W., Litvinov R.I. Reduced contraction of blood clots in patients with venous thromboembolism is a possible thrombogenic and embologenic mechanism. *TH Open*. 2018; 2 (1): e104–e115. DOI: 10.1055/s-0038-1635572.

20. Tutwiler V., Peshkova A.D., Andrianova I.A., Khasanova D.R., Weisel J.W., Litvinov R.I. Blood clot contraction is impaired in acute ischemic stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2017; 37 (2): 271–279. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308622.

21. Le Minh G., Peshkova A.D., Andrianova I.A., Khasanova D.R., Weisel J.W., Litvinov R.I. Impaired contraction of blood clots is a novel prothrombotic mechanism in systemic lupus erythematosus. *Clin. Sci. (Lond.).* 2018; 232 (2): 243–254. DOI: 10.1042/CS20171510.

22. Peshkova A.D., Safiullina S.I., Evtugina N.G., Baras Y.S., Ataullakhanov F.I., Weisel J.W., Litvinov R.I. Premorbid hemostasis in women with a history of pregnancy loss. *Thromb. Haemost.* 2019; 119 (12): 1994–2004. DOI: 10.1055/s-0039-1696972.

23. Takahashi T., Ellingson M.K., Wong P., Israelow B., Lucas C., Klein J., Silva J., Mao T., Oh J.E., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Liu F., Meir A., Sun J., Wang E.Y., Casanovas-Massana A., Wyllie A.L., Vogels C.B.F., Earnest R., Lapidus S., Ott I.M., Moore A.J., Shaw A., Fournier J.B., Odio C.D., Farhadian S., Dela Cruz C., Grubaugh N.D., Schulz W.L., Ring A.M., Ko A.I., Omer S.B., Iwasaki A. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*. 2020; 588 (7837): 315–320. DOI: 10.1038/s41586-020-2700-3.

24. Gebhard C., Regitz-Zagrosek V., Neuhauser H.K., Klein S.L. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol. Sex Differ.* 2020; 11: 29. DOI: 10.1186/s13293-020-00304-9.

25. Tutwiler V., Mukhitov A.R., Peshkova A.D., Le Minh G., Khismatullin R.R., Vicksman J., Nagaswami C., Litvinov R.I., Weisel J.W. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 17907. DOI: 10.1038/s41598-018-35849-8.

26. Cines D.B., Lebedeva T., Nagaswami C., Hayes V., Massefski W., Litvinov R.I., Rauova L., Lowery T.J., Weisel J.W. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood*. 2014; 123 (10): 1596–1603. DOI: 10.1182/blood-2013-08-523860.

27. Tutwiler V., Peshkova A.D., Le Minh G., Zaitsev S., Litvinov R.I., Cines D.B., Weisel J.W. Blood clot contraction differentially modulates internal and external fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost*. 2019; 17 (2): 361–370. DOI: 10.1111/jth.14370.

28. Danzi G.B., Loffi M., Galeazzi G., Gherbesi E. Acute pulmonary embolism and COVID-19 pneumonia: a random association? *Eur. Heart J.* 2020; 41 (19): 1858. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa254.

29. Bonow R.O., Fonarow G.C., O'Gara P.T., Yancy C.W. Association of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with myocardial injury and mortality. *JAMA Cardiol*. 2020; 5 (7): 751–753. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1105.

30. Caine G.J., Blann A.D. Soluble p-selectin should be measured in citrated plasma, not in serum. *Br. J. Haematol*. 2003; 121: 527–532. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04320.x.