

Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України
Тернопільський національний медичний університет імені
І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

«Погоджено»
Заступник Міністра – головний державний
санітарний лікар України
І. В. Кузін

Визначення загрози внутрішньосудинного тромбоутворення у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19

Методичні рекомендації

Київ – 2024
Тернопіль – ТНМУ – 2024

УДК 616.13/.14-005.6:616.98:578.834.1-06
B42

Установа розробник: Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України

Рекомендовано Міністерством охорони здоров'я України

Автори:

С. В. Комісаренко, М. М. Корда, Ш. Г. Варі, Т. М. Платонова, Д. С. Корольова, В. О. Чернищенко, О. О. Шевчук, А. І. Войтович, Т. А. Яценко, С. І. Романюк

Рецензенти:

Задорожна Вікторія Іванівна, епідеміолог, доктор медичних наук, професор, член-кореспондент НАМН України;

Кузін Ігор Володимирович, заступник міністра охорони здоров'я – головний державний санітарний лікар України. Лікар-епідеміолог, магістр з громадського здоров'я, магістр за спеціальністю «Публічне управління та адміністрування», спеціалізація за фахом «Організація і управління охороною здоров'я», «Епідеміологія».

Визначення загрози внутрішньосудинного тромбоутворення у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19 : метод. рек. / [С. В. Комісаренко, М. М. Корда, Ш. Г. Варі та ін.]. – Тернопіль : ТНМУ, 2024. – 40 с.

ISBN 978-966-673-497-9

Методичні рекомендації присвячено розкриттю молекулярних механізмів розвитку тромбофілії у осіб, які перехворіли на COVID-19. Запропоновано діагностичний алгоритм для вчасного виявлення загрози внутрішньосудинного тромбоутворення, детально описано доступні методичні підходи та наведено приклади, які допоможуть у інтерпретації результатів. Видання призначено насамперед для лікарів та дослідників, які прагнуть поглибити свої знання про причини розвитку тромбофілії та покращити якість життя своїх пацієнтів.

УДК 616.13/.14-005.6:616.98:578.834.1-06

Рекомендації підготовлено за підтримки Національного Фонду Досліджень України відповідно до Договору про надання гранту №98/0208 від 01.05.2023 р.

Роботу частково профінансовано Медичним центром «Cedars-Sinai» (CSMC) та Асоціацією RECOOP HST у рамках гранту для Старших наукових співробітників # 026 FUS 2020-2021.

ISBN 978-966-673-497-9

©С. В. Комісаренко, М. М. Корда,
Ш. Г. Варі та ін., 2024



Зміст

Епідеміологічні та патофізіологічні особливості COVID-19	4
Запалення при COVID-19 та його зв'язок з патологією системи гемостазу.....	7
Маркери загрози внутрішньосудинного тромбоутворення	9
Визначення концентрації фібриногену	11
Визначення концентрації розчинного фібрину	13
Визначення концентрації D-димеру	16
Визначення вмісту протеїну С.....	17
Визначення концентрації протромбіну-1	20
Аналіз стану системи зсідання крові у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19	23
Висновки	37
Рекомендований список літератури	38



Епідеміологічні та патофізіологічні особливості COVID-19

З початку XXI століття дедалі частіше реєструють спалахи вірусних інфекцій, які мають потенціал до переростання у пандемію. Серед них найбільших масштабів досягли епідемії, викликані коронавірусами.

Перша епідемія (2002-2004) була спричинена коронавірусом SARS-CoV, що перейшов до людей від цивет, викликав тяжкий гострий респіраторний синдром (SARS) і за 5 місяців поширився з Китаю на 37 країн усіх континентів, інфікувавши понад 8400 людей, з яких 916 – з летальним результатом.

Друга епідемія, що виникла у 2012 році у Саудівській Аравії, була викликана коронавірусом MERS-CoV, який перейшов до людей від верблюдів і викликав середньосхідний респіраторний синдром (MERS). Епідемія MERS охопила 26 країн (передусім Середнього Сходу) і спричинила 2519 випадків захворювання, з яких 866 були летальними. Епідемії SARS і MERS вражали своїми летальними наслідками (на щастя, вони не досягли України), однак наступна епідемія, яка поширилася з китайського міста Ухань у листопаді 2019 року, значно перевершила за своїми масштабами попередні та змінила життя людей у всьому світі.

Нове респіраторне захворювання здобуло назву коронавірусна хвороба 2019 року (COVID-19), його викликав коронавірус SARS-CoV-2, який перейшов до людей, ймовірно, від кажанів. За три чверті року від моменту появи перших випадків інфікування SARS-CoV-2, вірус поширився у 188 країнах, інфікувавши близько 28 млн людей і спричинивши майже 1 млн смертей. Станом на 10 березня 2023 року, коли Університет Джона Гопкінса в Балтиморі припинив збір статистичних даних щодо пандемії COVID-19, зафіксована кількість інфікованих становила понад 676 млн, а померлих – майже 6,9 млн. В Україні зареєстровано



понад 5,7 млн випадків зараження, з яких близько 120 тисяч виявилися летальними, хоча ці дані, ймовірно, занижені, оскільки після 24 лютого 2022 року збір статистичних даних по всій території України став неможливим у зв'язку з початком відкритої збройної агресії росії проти України.

Вірус SARS-CoV-2 став сьомим відомим коронавірусом людини, серед яких чотири викликають легкі хвороби верхніх дихальних шляхів, а три – є летальними для людей (SARS-CoV-1, MERS-CoV і SARS-CoV-2). Характерною (і вкрай небезпечною) особливістю SARS-CoV-2 є здатність до розповсюдження від інфікованих людей, які ще не мають ніяких проявів захворювання. Ця властивість не притаманна коронавірусам SARS і MERS, що викликали епідемії 2002 і 2012 років відповідно, під час яких хворі ставали контагіозними лише через 1-2 доби після появи у них явних клінічних проявів захворювання, як правило, вже після госпіталізації. Можливо, що саме ця відмінність стала причиною значно більшого поширення SARS-CoV-2 під час останньої пандемії.

Попри те, що COVID-19 вважають переважно респіраторним захворюванням, вірус SARS-CoV-2 може завдати відчутної шкоди ниркам, печінці, серцю та й загалом – майже кожній системі органів. У 30 % важкохворих пацієнтів спостерігаються ускладнення, що призводять до активації системи зсідання крові та до таких смертельно небезпечних хвороб як легенева емболія, інсульти, інфаркти міокарду тощо. Причиною цього може бути запалення ендотелію, яке призводить до внутрішньосудинного мікрозсідання крові і як наслідок ушкодження різних органів, що пояснює безліч симптомів COVID-19. Численні дослідження у всьому світі виявили, що серед хворих на COVID-19 є поширеними неврологічні відхилення, зокрема, цереброваскулярна патологія (ішемічні інсульти, внутрішньомозкові крововиливи, васкуліт), зміни психічного статусу (психоз новонароджених, нейрокогнітивний синдром, афективні та психічні розлади), енцефалопатія або енцефаліт. Накопичено значну кількість доказів на користь того, що SARS-CoV-2 може долати гематоенцефалічний бар'єр, проникати в мозок і



призводити до тяжких наслідків. Підвищення проникності судин, яке призводить до набряків периваскулярного простору, пов'язують з розвитком цитокінового «шторму», що є важливим компонентом патогенезу COVID-19.

Найбільш небезпечними ускладненнями COVID-19, які можуть призвести до смерті, є пневмонія, гострий респіраторний дистрес-синдром, поліорганна недостатність, септичний шок. Часто виникають такі серцево-судинні ускладнення, як серцева недостатність, аритмія, запалення серця, тромбоз.

Оскільки процеси гіперкоагуляції та тромбоутворення відіграють важливу роль у патогенезі COVID-19, для лікування цього захворювання пропонують використовувати препарати, що запобігають згортанню крові. Відомо, що антикоагулянтна терапія фракціонованим гепарином приводила до поліпшення стану хворих з важким перебігом COVID-19, у яких спостерігалися ознаки тромбофілії.

Факторами ризику COVID-19 є літній вік, деякі супутні захворювання (насамперед гіпертензія, діабет, серцево-судинні хвороби, ожиріння, онкологічні та респіраторні захворювання). Припускають, що SARS-CoV-2 проникає в клітини різних типів (епітеліальні, імунні тощо) завдяки різним рецепторам і допоміжним молекулам, а зміни експресії цих рецепторів, пов'язані з віком, ожирінням, курінням та іншими факторами ризику, можуть зумовити тяжкий перебіг COVID-19. Однак, досі залишається незрозумілим, чому в одних людей інфікування SARS-CoV-2 проходить безсимптомно, а в інших – викликає важку форму COVID-19 і смерть, навіть якщо вони не мають згаданих вище факторів ризику. Тому тривають пошуки маркерів, які допомогли б передбачити розвиток захворювання при інфікуванні SARS-CoV-2.

Слід зазначити, що особливістю COVID-19 є розвиток пост-ковідного синдрому, відомого також як «довгий COVID», за якого спостерігають порушення багатьох систем організму, зокрема системи гемостазу. Тривалість цього патологічного стану та способи виявлення факторів ризику ускладнень є нагальним питанням, вирішенню якого присвячено наші методичні рекомендації.



Запалення при COVID-19 та його зв'язок з патологією системи гемостазу

Цитокінетичний шторм, ендотеліальна дисфункція, набряк тканин, які є характерними для COVID-19, обумовлені гострим запальним процесом, який є пусковим механізмом патологічної активації системи гемостазу. В свою чергу, процеси, пов'язані з порушенням рівноваги у системі гемостазу, посилюють запалення за принципом позитивного зворотного зв'язку.

Взаємозв'язок між імунною системою та системою гемостазу відбувається на рівні всіх їхніх компонентів. Прозапальні цитокіни викликають дисфункцію ендотеліальних клітин, збільшення реактивності тромбоцитів, активацію проензимів каскаду системи зсідання крові, порушення функції фізіологічних антикоагулянтів, формування фібринових депозитів, зростання кількості фібриногену та пригнічення фібринолітичної активності.

Ендотелій після пошкодження експресує адгезивні протеїни (зокрема фактор фон Віллебрандта і Р-селектин), індуктори та рецептори, які приймають участь як у згортанні крові, так і у запаленні. Тромбоцити в результаті активації вивільняють зі своїх гранул низку прозапальних інтерлейкінів та тромбоцитарних факторів. До них зокрема належать інтерлейкін-1, фактор 4 тромбоцитів (PF4) та тромбомодулін.

Комплекс тканинного фактора та фактора VIIa, поруч із калікреїн-кініновою системою та фактором XIIa, ініціює генерацію серинових протеїназ системи зсідання крові та, як наслідок, внутрішньосудинне тромбоутворення. Утворені у результаті каскаду коагуляції активний фактор Ха та тромбін, не лише викликають формування фібриново-тромбоцитарного згустку, але і стимулюють активацію низки клітин через протеїназа-активовані рецептори (PAR-1 та PAR-4).

У відповідь на активацію компонентів системи зсідання крові та розвиток запального процесу, відбувається активація протеїну C – ключового компонента антикоагулянтної системи. Ця серинова



протеїназа також активує клітини імунної системи через протеїназа-активовані рецептори. Також у процесі запалення завдяки зменшенню експресії тромбомодуліну і ендотеліального рецептора протеїну С (EPCR), знижується функція антикоагулянтної системи, що може призводити до розвитку тромботичних ускладнень.

Наслідком активації коагуляційного каскаду є формування полімерного фібрину, який складає основу тромбу. Твердофазний фібрин у вигляді фібринових депозитів або як компонент атеросклеротичних бляшок взаємодіє з клітинами імунної системи. Встановлено, що мононуклеарні клітини атеросклеротичних бляшок експресують набагато більше тканинного фактора, ніж нативні мононуклеарні клітини.

Крім того, фактором ризику розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення є зростання у плазмі крові хворих концентрації попередника фібрину – фібриногену, який є протеїном гострої фази запалення.

Також запалення супроводжується локальною активацією плазміну (ключової фібринолітичної протеїнази). Поява плазміну на поверхні уражених клітин призводить до порушення цілісності тканин та активації запальних цитокінів, посилюючи цитокіновий «шторм». Як наслідок, у крові хворих підвищується рівень комплексу плазміну з α_2 -антиплазміном. У відповідь на зростання концентрації факторів запалення, підвищується експресія основного інгібітора фібринолізу (PAI-1) та сповільнюється вивільнення тканинного активатора плазміногену (tPA), який забезпечує активацію фібринолізу на поверхні фібринового згустку. Таким чином, інтенсивне запалення може призводити до розвитку гіпофібринолітичного стану, що сприяє продовженню часу існування вже існуючих тромбів і появі нових.

Оскільки механізми регуляції запалення та системи гемостазу тісно пов'язані, визначення маркерів загрози внутрішньосудинного тромбоутворення дає змогу не лише попередити тромботичні ускладнення, але і спрогнозувати перебіг захворювання.



Маркери загрози внутрішньосудинного тромбоемболізму

Одним з основних маркерів, який загальноприйнято використовувється для діагностики тромботичних ускладнень при COVID-19 є D-димер (рис. 1, А). Однак, варто пам'ятати, що утворення D-димеру є результатом не лише активації системи зсідання крові, але й наслідком розщеплення стабілізованого фібрину фібринолітичною системою. Тобто, цей маркер свідчить про розщеплення згустку і опосередковано про наявність фібринових депозитів.

Важливішими для діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоемболізму є маркери, що прогнозують утворення згустку заздалегідь, до його появи. Зокрема, діагностичні тести повинні виявляти у кровотоці наслідки дії активного тромбіну, оскільки саме цей ензим відповідальний за перетворення фібриногену на фібрин, який полімеризується з формуванням тривимірної сітки фібрину – каркасу тромбу.

Оскільки пряма детекція активності тромбіну у плазмі крові ускладнена, у лабораторній діагностиці застосовують непрямі методи. Для виявлення ознак утворення тромбіну зокрема визначають вміст фрагмента протромбіну F1+2, який з'являється *in vivo* в результаті активації протромбіну фактором Ха. Альтернативно можна детектувати інший продукт розщеплення протромбіну – претромбін-1 (Рис. 1, Б). Цей маркер утворюється завдяки автолізу протромбіну активним тромбіном.

Основним субстратом тромбіну є фібриноген. Концентрація фібриногену в кровотоці різко зростає під час запалення та є додатковим фактором ризику тромботичних ускладнень (Рис. 1, В).

Продукт розщеплення фібриногену тромбіном – мономерний фібрин – може формувати комплекси з фібриногеном та його похідними без утворення твердофазного фібрину.





Олігомери фібрину та фібриногену, які вільно циркулюють у кровотоці, отримали назву розчинний фібрин (Рис. 1, Г). Саме розчинний фібрин є основним маркером загрози внутрішньосудинного тромбоутворення.

Тромбін у комплексі з тромбомодуліном активує протеїн С – ключовий протеїн антикоагулянтної системи. Тому наслідком дії тромбіну є зниження вмісту протеїну С за рахунок його споживання, що також є ознакою появи активного тромбіну в кровотоці (Рис. 1, Г).

Розгляньмо детально підходи до визначення ключових маркерів загрози внутрішньосудинного тромбоутворення.

Визначення концентрації фібриногену

Фібриноген під дією тромбіну перетворюється на фібрин з наступним утворенням волокон фібрину, що складають основу кров'яного згустку та припиняють крововтрату. Окрім формування основи тромбу, фібриногену притаманні інші важливі функції у репаративних та запальних процесах. Його концентрація значно зростає за умов запалення та корелює з ризиком внутрішньосудинного тромбоутворення.

У здорових донорів концентрація фібриногену в плазмі крові складає 2,0-3,5 мг/мл. При різних патологічних станах концентрація фібриногену може коливатися від 1 мг/мл до 10 мг/мл.

Для точного визначення концентрації фібриногену в кровотоці доцільно використовувати спектрофотометричний метод з використанням тромбіноподібного ензиму (Рептилаза, Анцистрон, Анкрод). Суть методу полягає в перетворенні всього фібриногену плазми крові на згусток фібрину, який після полімеризації розчиняють в оцтовій кислоті та визначають концентрацію за допомогою спектрофотометра.

Хід виконання: плазму крові (0,2 мл) та 0,05 М трис-НCl буфер рН 7,4 з 0,13 М NaCl (1,7 мл) змішують у скляній пробірці.



Коагуляцію ініціюють додаванням 0,1 мл тромбіноподібного ензиму (активність еквівалентна 2 NIH/мл). Суміш інкубують протягом 30 хв при 37 °С. Фібриновий згусток видаляють (наприклад, за допомогою притертої скляної палички, відтискаючи рідину) і розчиняють в 5 мл 1,5 % оцтової кислоти. Концентрацію фібриногену вимірюють на спектрофотометрі при 280 нм (відносно 320 нм) та визначають за формулою (1):

$$[\Phi] = \frac{OP_{280} - OP_{320}}{1,5} \cdot P, \text{ де} \quad (1)$$

[Φ] – концентрація фібриногену, мг/мл;

OP₂₈₀ – оптичне поглинання розчину фібриногену за довжини хвилі 280 нм, відносно 1,5 % оцтової кислоти, о.о.;

OP₃₂₀ – оптичне поглинання розчину фібриногену за довжини хвилі 320 нм, відносно 1,5 % оцтової кислоти, о.о.;

1,5 – коефіцієнт поглинання фібриногену, о.о.·мл/мг ;

P – розведення проби (в 25 разів).

Перевага використання тромбіноподібного ензиму в тому, що цей ензим не активує фактор XIII та не призводить до появи нерозчинного стабілізованого фібрину. Крім того, тромбіноподібні ензими не інгібуються антитромбіном III та можуть застосовуватись для визначення концентрації фібриногену при гепаринотерапії. Втім, тромбіноподібний ензим у тесті можна замінити на тромбін, який застосовують в тій же кількості – 0,1 мл тромбіну (2 NIH/мл). Однак, в такому випадку у пробу попередньо вносять 0,1 мл 40 мМ моноіодоцтової кислоти.

Для визначення концентрації фібриногену часто використовують інші методи: за часом зсідання плазми крові (метод Клауса), ваговий (метод Рутберг), імунохімічні методи (специфічні тест-системи, розроблені на основі антитіл до фібриногену).



Визначення концентрації розчинного фібрину

Розчинний фібрин є комплексом олігомерів мономерного фібрину та фібриногену, який вільно циркулює у кровотоці. Накопичення розчинного фібрину свідчить про появу активного тромбіну в кровотоці, що є наслідком порушення динамічної рівноваги у системі гемостазу.

Збільшення концентрації розчинного фібрину є раннім прогностичним показником активації внутрішньосудинної коагуляції, тому визначення його рівня є важливим для попередження внутрішньосудинного тромбоутворення.

У здорових донорів концентрація розчинного фібрину в плазмі крові не перевищує 3 мкг/мл. Концентрація розчинного фібрину понад 6 мкг/мл свідчить про суттєву небезпеку розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення.

Визначення розчинного фібрину ґрунтується на методі твердофазного імуноензимного аналізу з використанням з моноклонального «catch»-антитіла, специфічного до фібрину desAB (I-3C), та моноклонального «tag»-антитіла, специфічного до фібриногену та його похідних (II-4d).

Хід виконання: в лунки 96-лункового планшету з іммобілізованим моноклональним антитілом I-3C вносять по 0,09 мл 0,01 М KH_2PO_4 з 0,14 М NaCl , 0,05 % TWIN-20 (буфер ТФБ) з додаванням 5 % знежиреного молока та 4,3 % цитрату натрію (буфер ТФБМ). Для калібратора залишають порожніми перший та другий ряди планшету. В лунки першого та другого ряду, крім першої лунки A₁, A₂, вносять по 0,1 мл ТФБМ.

Безпосередньо перед використанням ліофілізований калібратор (фібрин desAB) розчиняють в 0,2 мл 0,15 % оцтової кислоти; опісля додають 1,8 мл ТФБМ. Робоче розведення калібратора розчинного фібрину становить 6,4 мкг/мл.

Розчин калібратора вносять в об'ємі 0,1 мл в лунки A₁, B₁ і A₂, B₂. Потім титрують, послідовно переносячи по 0,1 мл з



лунки В₁ в лунку С₁, з лунки С₁ в лунку D₁ і т.д. в першому ряду, а також з лунки В₂ в лунку С₂, з лунки С₂ в лунку D₂ і т.д. у другому ряду до передостанніх лунок G₁ і G₂, в яких залишають по 0,1 мл розчину калібратора, а по 0,1 мл – видаляють. У калібрувальних рядах останні лунки H₁ і H₂ залишають заповненими 0,1 мл ТФБМ (нульова точка калібрування). В лунки (крім двох калібрувальних рядів), що заповнені 0,09 мл ТФБМ, вносять по 0,01 мл досліджуваних зразків плазми крові.

Інкубують при температурі 37 ± 2 °C протягом 60 хвилин, а потім промивають планшет 3 рази ТФБ.

На наступному етапі вносять в лунки по 0,1 мл біотинільованого моноклонального антитіла II-4d та інкубують при температурі 37 ± 2 °C протягом 30 хвилин, а потім промивають планшет 3 рази ТФБ.

На наступному етапі вносять в лунки по 0,1 мл кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому в робочому розведенні, відповідно до рекомендацій виробника, та інкубують при температурі 37 ± 2 °C протягом 30 хвилин, а потім промивають планшет 3 рази ТФБ.

На наступному етапі вносять в лунки по 0,1 мл 0,1 мг/мл тетраметилбензидину (ТМБ). Для цього 1 мг ТМБ розчиняють в 1 мл диметилсульфоксиду, а потім безпосередньо перед використанням розводять в 0,05 М Na₂HPO₄, титрованому лимонною кислотою до рН 5,0, у співвідношенні 1:9 та додають 0,002 мл 30 % перекису водню.

Планшет інкубують при кімнатній температурі в темному місці протягом 15 хвилин, а потім вносять в лунки по 0,1 мл 2 н H₂SO₄ для зупинки кольорової реакції (в тій же послідовності внесення, що і ТМБ). Не більше ніж через 5 хвилин після зупинки кольорової реакції вимірюють оптичну густину за допомогою мікропланшетного спектрофотометра у двоххвильовому режимі (450 нм відносно 630 нм).

Для отримання кількісного результату (в мкг/мл) будують калібрувальну криву: відкладають по осі Y значення оптичного поглинання розведеного калібратора, а на осі X – відповідні їм концентрації - 6,4 (A₁, A₂), 3,2 (B₁, B₂), 1,6 (C₁, C₂), 0,8 (D₁, D₂), 0,4 (E₁, E₂), 0,2 (F₁, F₂), 0,1 (G₁, G₂), 0 (H₁, H₂) мкг/мл.

Зразок калібрувальної кривої представлено на рисунку 2.

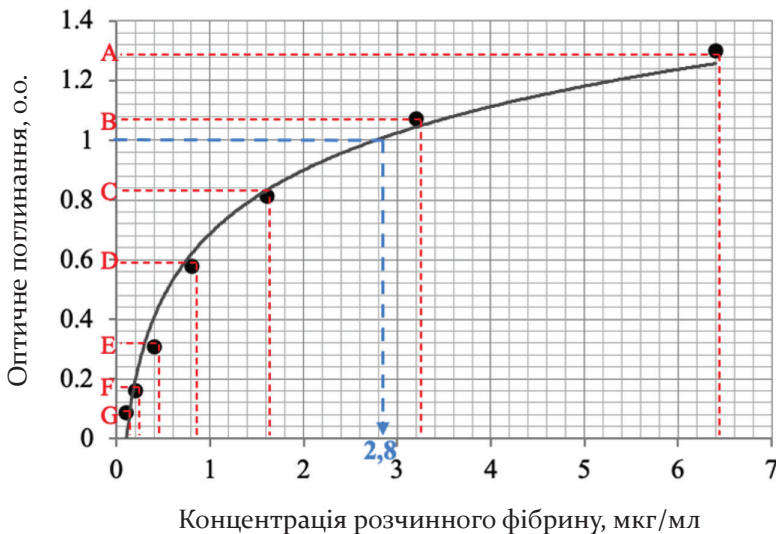


Рис. 2. Залежність оптичного поглинання від концентрації розчинного фібрину (калібрувальна крива). Червоним позначено оптичне поглинання лунок з калібратором в рядах A, B, C, D, E, F, G. Синім показано визначення концентрації досліджуваної проби з оптичним поглинанням 1 о.о.

Використовуючи побудовану калібрувальну криву, визначають концентрацію розчинного фібрину для кожного досліджу-



ваного зразка плазми крові, згідно з отриманим значенням оптичного поглинання, і розраховують за формулою (2):

$$[C] = K \cdot P, \text{ де} \quad (2)$$

[C] – концентрація розчинного фібрину в досліджуваному зразку плазми крові, мкг/мл;

K – концентрація розчинного фібрину, що відповідає оптичному поглинанню досліджуваної проби;

P – розведення проби (в 10 разів).

Для визначення концентрації розчинного фібрину недоцільно використовувати напівкількісні методи, такі як β -нафтоловий, протамінсульфатний або етаноловий тести, оскільки вони можуть давати суттєво занижені результати. У разі неможливості застосування імуноензимних методів аналізу, можна застосовувати метод фосфатних буферів, як найбільш точний спосіб визначення вмісту розчинних фібрин-мономерних комплексів, який, однак, не є прямим аналогом імуноензимному тесту. Для виконання цього тесту у скляній пробірці до 0,25 мл досліджуваного зразка плазми крові додають рівний об'єм 0,1 М KH_2PO_4 буферу рН 7,5; після обережного перемішування до проби додають 0,4 мл 1 М KH_2PO_4 буферу рН 7,5. Зразки інкубують протягом 30 хв при кімнатній температурі, результати оцінюють напівкількісно: відсутність видимого помутніння – 0 мкг/мл; чітке помутніння – 35 мкг/мл; нитки – 70 мкг/мл; пластівці – 90 мкг/мл, гелеподібний осад – 150 мкг/мл.

Визначення концентрації D-димеру

Тест на визначення D-димеру сьогодні є обов'язковим елементом усіх алгоритмів діагностики патологій, пов'язаних з внутрішньосудинним тромбоутворенням. Втім, як продукт гідролізу стабілізованого фібрину, D-димер не дозволяє виявити загрозу тромбоутворення, а лише свідчить про те, що тромб чи фібриновий депозит вже утво-



рився і тепер зазнає гідролізу плазміном. Цей показник слід розглядати як посттромботичний маркер, і тільки одночасне кількісне визначення розчинного фібрину та D-димеру дає змогу комплексно охарактеризувати стан системи гемостазу пацієнта.

У здорових донорів концентрація D-димеру в плазмі крові не перевищує 100 нг/мл. Однак, залежно від використаного тесту, цей показник може варіювати.

Визначення D-димеру ґрунтується на методі твердофазного імуноензимного аналізу з використанням моноклонального «catch»-антитіла, специфічного до D-димеру (III-3B), та моноклонального «tag»-антитіла, специфічного до фібриногену та його похідних (II-4d).

Хід виконання: в лунки 96-лункового планшету з іммобілізованим моноклональним антитілом III-3B вносять послідовно реагенти, як описано для визначення розчинного фібрину, з такою зміною: безпосередньо перед використанням ліофілізований калібратор (D-димер) розчиняють в 0,5 мл ТФБМ. Робоче розведення калібратора D-димеру становить 400 нг/мл.

Для отримання кількісного результату (в нг/мл) будують калібрувальну криву, для чого відкладають по осі Y значення оптичного поглинання розведеного калібратора, а на осі X – відповідні їм концентрації: 400 (A₁, A₂), 200 (B₁, B₂), 100 (C₁, C₂), 50 (D₁, D₂), 25 (E₁, E₂), 12,5 (F₁, F₂), 6,25 (G₁, G₂), 0 (H₁, H₂) нг/мл.

Зразок калібрувальної кривої представлено на рисунку 3.

Використовуючи побудовану калібрувальну криву, визначають концентрацію D-димеру для кожного досліджуваного зразка, згідно з отриманим значенням оптичного поглинання, і розраховують за формулою (3):

$$[D] = K \cdot P, \text{ де} \quad (3)$$

[D] – концентрація D-димеру в досліджуваному зразку плазми крові, нг/мл;

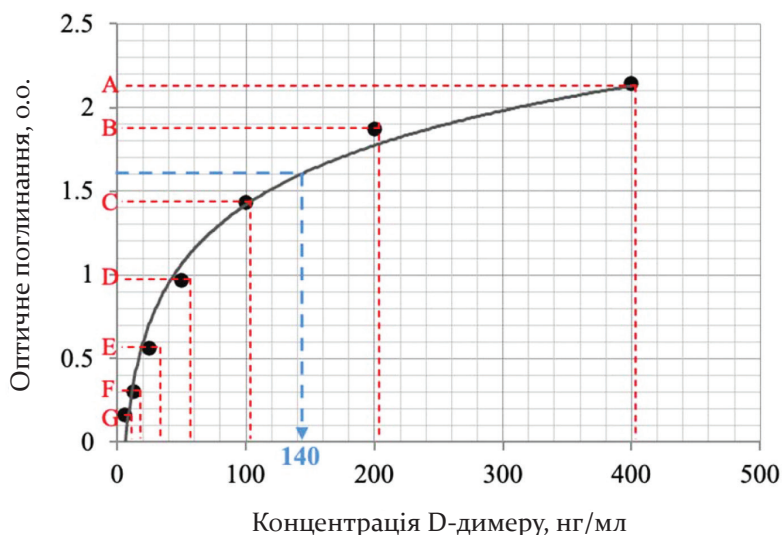


Рис. 3. Залежність оптичного поглинання від концентрації D-димеру (калібрувальна крива). Червоним позначено оптичне поглинання лунок з калібратором в рядах А, В, С, D, E, F, G. Синім показано визначення концентрації досліджуваної проби з оптичним поглинанням 1,6 о.о.

К – концентрація D-димеру, що відповідає оптичному поглинанню досліджуваної проби;

Р – розведення проби (в 10 разів).

На сьогодні існують численні тест-набори для імуноензимного визначення D-димеру. Виконуючи їх, слід уважно дотримуватися інструкції виробника та оцінювати результати, відповідно до референтних значень для обраного тесту. Також варто з обережністю порівнювати результати, отримані за допомогою різних тест-систем.



Визначення вмісту протейну С

Протеїн С є основним фізіологічним антикоагулянтом, який активується у відповідь на внутрішньосудинну генерацію тромбіну та знижує прокоагулянтний потенціал шляхом інактивації факторів VIIIa та Va. Зниження вмісту протейну С в результаті його споживання є маркером передтромботичного стану.

Концентрація протейну С в плазмі крові здорових донорів складає 3,7-5 мкг/мл. У функціональних тестах його вміст оцінюють у відсотках, порівняно з контрольним зразком плазми крові. В такому разі контрольне значення становить 100 ± 10 %.

Обраний нами метод визначення протейну С ґрунтується на застосуванні нефізіологічного активатора, який здатен активувати увесь доступний протейн С плазми крові, кількість якого можна оцінити за швидкістю розщеплення активованим протейном С специфічного хромогенного субстрату S2236.

Хід виконання: у лунку 96-лункового планшету вносять 0,02 мл досліджуваного зразка плазми крові, 0,03 мл розчину S2236 (0,25 мМ), 0,03 мл розчину активатора протейну С, 0,01 мл CaCl_2 (0,025 М) та 0,16 мл 0,05 М трис-НСІ буфера з 0,13 М NaCl рН 7,4. Генерацію забарвленого *p*-нітроаніліну (pNa) контролюють за допомогою мікропланшетного спектрофотометра у двохвильовому режимі (405 нм відносно 492 нм). Вимірювання можна проводити протягом 15 хв, маючи на увазі, що для отримання коректних результатів оптична густина проби повинна знаходитися у діапазоні від 0,3 до 0,8 о.о. Результати обраховують за формулою (4):

$$[\text{ПС}] = \frac{\text{ОПд}}{\text{ОПк}} \cdot 100, \text{ де} \quad (4)$$

[ПС] – вміст протейну С в досліджуваній плазмі крові, %;

ОПд – оптичне поглинання у зразку з використанням досліджуваної плазми крові, о.о.;

ОПк – оптичне поглинання у зразку з використанням контрольної плазми крові, о.о.



Альтернативно можна застосовувати метод визначення функціональної активності протеїну С, у якому фіксують час зсідання плазми крові в тесті активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) за присутності та у відсутності активатора протеїну С. В нормі додавання активатора протеїну С призводить до подовження часу зсідання плазми крові в тесті АЧТЧ. Крім того, існують імунохімічні методи, які дозволяють виявити зниження концентрації протеїну С, але не характеризують його функціональну активність.

Визначення концентрації претромбіну-1

Претромбін-1 є продуктом автолізу протромбіну тромбіном, що утворюється за патологічної активації системи зсідання крові та свідчить про надмірну продукцію тромбіну в кровотоці. Тому виявлення претромбіну-1 може бути інформативним маркером загрози внутрішньосудинного тромбоутворення.

Концентрація претромбіну-1 в плазмі крові здорових донорів не перевищує 0,5 мкг/мл.

Метод визначення концентрації претромбіну-1 базується на визначенні співвідношення між часом коагуляції, ініційованої нефізіологічним активатором протромбіну (Екамулін, Екарин), та часом коагуляції, ініційованої тромбопластином. Нefізіологічні активатори протромбіну, зокрема Екамулін, здатні активувати як інтактний протромбін так і його функціонально неактивні форми, зокрема, претромбін-1. Тромбопластин, який використовується в тесті протромбіновий час, запускає каскад зсідання крові через зовнішній шлях, що активує лише інтактний протромбін.

Хід виконання: в кювету коагулометра або у конічну пробірку вносять 0,1 мл CaCl_2 (0,025 М), 0,1 мл Екамуліну (активність еквівалентна 0,15 NIH/мл) або 0,1 мл тромбопластину, а потім 0,1 мл досліджуваного зразку плазми крові, та фіксують час утворення згустку.

Співвідношення результатів екамулінового та тромбопластинового коагуляційних тестів розраховують за формулою (5):



$$EI/PI = \frac{\frac{Ч_{Ек}}{Ч_{Ед}}}{\frac{Ч_{Тк}}{Ч_{Тд}}}, \text{ де} \quad (5)$$

ЕІ – екамуліновий індекс; відношення часу зсідання контрольної плазми крові під дією екамуліну (Ч_{Ек}) до часу зсідання досліджуваної плазми крові під дією екамуліну (Ч_{Ед});

ПІ – протромбіновий індекс; відношення часу зсідання контрольної плазми крові під дією тромбопластину (Ч_{Тк}) до часу зсідання досліджуваної плазми крові під дією тромбопластину (Ч_{Тд}).

Більшої точності та автоматизації результатів можна досягнути із застосуванням у цьому тесті хромогенного субстрату тромбіну S2238, за умови використання високоякісних препаратів тромбопластину.

Для виконання тесту в лунку 96-лункового планшету вносять 0,025 мл хромогенного субстрату S2238 (2 мМ), 0,01 мл досліджуваного зразка плазми крові, 0,02 мл тромбопластину або Екамуліну (активність еквівалентна 0,5 NIH/мл) та 0,195 мл 0,05 М трис-НСІ буферу рН 7,4 з 0,13 М NaCl.

Генерацію забарвленого *n*-нітроаніліну (pNa) контролюють за допомогою мікропланшетного спектрофотометра у двохвильовому режимі (405 нм відносно 492 нм). Вимірювання можна проводити протягом 10 хв, маючи на увазі, що для отримання коректних результатів оптична густина проби повинна знаходитися у діапазоні від 0,3 до 0,8 о.о.

Співвідношення результатів екамулінового та тромбопластинного тестів, отриманих з використанням хромогенного субстрату, розраховують за формулою (6):

$$EI/PI = \frac{\frac{ЕЕ_{д}}{ЕЕ_{к}}}{\frac{ЕТ_{д}}{ЕТ_{к}}}, \text{ де} \quad (6)$$



ЕІ – екамуліновий індекс; відношення оптичного поглинання у зразку досліджуваної плазми крові під дією Екамуліну (ЕЕк) до оптичного поглинання у зразку контрольної плазми крові під дією Екамуліну (ЕЕд);
ПІ – екамуліновий індекс; відношення оптичного поглинання у зразку досліджуваної плазми крові під дією тромбопластину (ЕТк) до оптичного поглинання у зразку контрольної плазми крові під дією тромбопластину (ЕТд).

Концентрацію претромбіну-1 у плазмі крові визначають за допомогою калібрувальної кривої, яку можна застосовувати як у випадку коагуляційного тесту, так і у випадку тесту з використанням хромогенного субстрату (рис. 4).

Альтернативно похідні протромбіну визначають у плазмі крові, детектуючи появу фрагмента протромбіну 1+2. Для цього застосовують імунодіагностичні методи, які можуть надати інформацію про активацію протромбіну, однак не вказують на існування активного тромбіну в кровотоці.

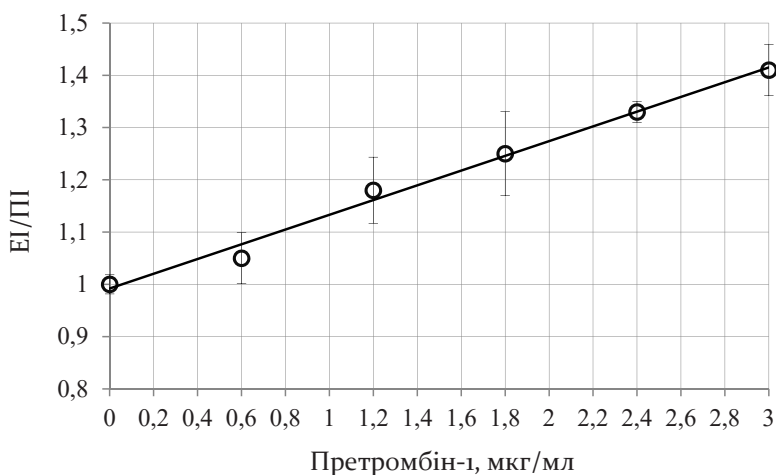


Рис. 4. Калібрувальна крива для визначення концентрації претромбіну-1 за співвідношенням результатів екамулінового та тромбопластинового тестів. ЕІ – екамуліновий індекс; ПІ – протромбіновий індекс.



Аналіз стану системи зсідання крові у пацієнтів, які перехворіли на COVID-19

Авторами проаналізовано стан системи зсідання крові у пацієнтів, що перенесли COVID-19 (58 чоловіків і 133 жінки). Усі пацієнти підписали форму інформованої згоди. На момент забору крові пацієнти одужали від захворювання на COVID-19 і були серопозитивними та не мали у крові збудника хвороби за даними ПЛР.

Лабораторне підтвердження інфекції SARS-CoV-2 проведено на базі комунальних некомерційних підприємств: «Монастирська міська лікарня»; «Гусятинська комунальна районна лікарня»; «Шумська міська лікарня»; «Тернопільська комунальна міська лікарня №2».

Відповідно до рекомендацій ВООЗ визначено низку факторів, які збільшують ризик ускладнень за COVID-19, зокрема літній вік (понад 65 років), ожиріння та супутні захворювання. Саме ці фактори, а також час з моменту перенесеного захворювання та тяжкість перебігу хвороби, було взято нами до уваги під час аналізу.

Насамперед серед пацієнтів було обрано **групу молодих осіб – від 18 до 45 років (в середньому 37 ± 8 років, $n = 86$) та осіб літнього віку – від 65 до 80 (в середньому 69 ± 7 років, $n = 25$)**. У постковідних пацієнтів, незалежно від віку, концентрація D-димеру лишалася у межах норми (рис. 5А). Водночас, концентрація розчинного фібрину у пацієнтів обох груп достовірно зростала відносно значень референтної групи. Група літніх осіб мала достовірно вищу концентрацію розчинного фібрину, порівняно з групою молодих осіб (рис. 5Б).

Таким чином, спостерігали активацію системи зсідання крові, про що свідчить накопичення розчинного фібрину.

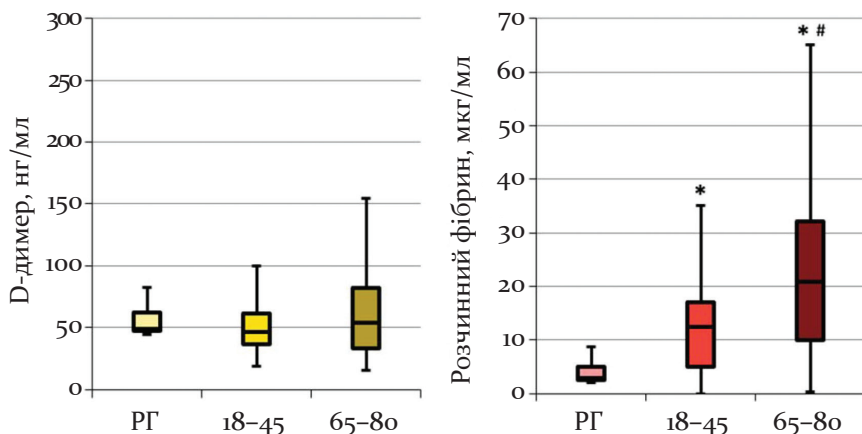


Рис. 5. Концентрація D-димеру та розчинного фібрину у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до віку: 18-45 років (n = 86) та 65-80 років (n = 25). РГ – референтна група (n = 19).

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

– достовірно відносно групи 18-45 років при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

Натомість, нормальна концентрація D-димеру може свідчити як про відсутність внутрішньосудинних фібринових депозитів, так і про те, що існуючі фібринові депозити не руйнуються компонентами системи фібринолізу. Тому слід з обережністю ставитися до D-димеру як до маркера нормалізації стану системи гемостазу.

Також у більшості пацієнтів, які перенесли COVID-19, виявлено чітку тенденцію до підвищення концентрації фібриногену, однак у осіб літнього віку вона більш виражена (рис. 6).

Концентрація фібриногену також зростає, до того ж достовірно, у осіб з ожирінням, які перенесли COVID-19 (ІМТ > 30;

34,1±4,3; $n = 85$). Натомість у осіб з нормальною вагою ($IMT < 25$; 22,4±1,8; $n = 42$), після перенесеного захворювання концентрація фібриногену зростає недостовірно (рис. 7).

Рис. 6. Концентрація фібриногену у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до віку: 18-45 років ($n = 86$) та 65-80 років ($n = 25$). РГ – референтна група ($n = 19$).

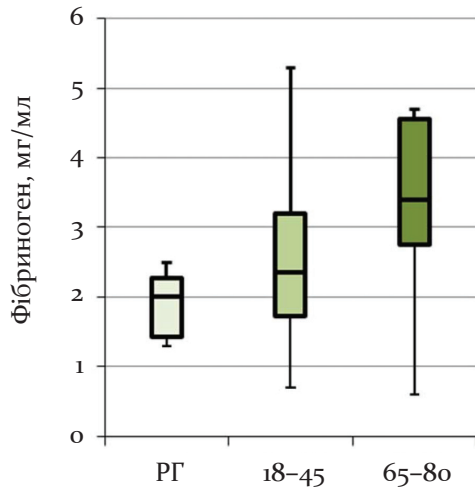
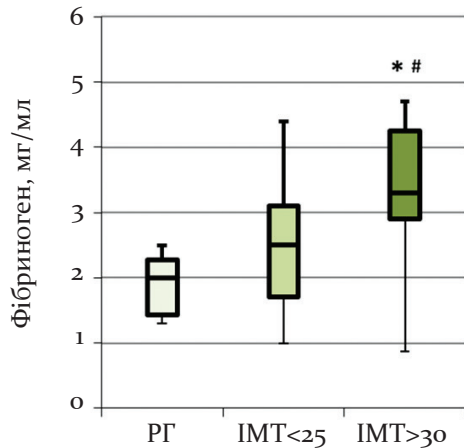


Рис. 7. Концентрація фібриногену у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до індексу маси тіла: $IMT < 25$ ($n = 42$) та $IMT > 30$ ($n = 85$). РГ – референтна група ($n = 19$).
* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.
– достовірно відносно групи $IMT < 25$ при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.





Ожиріння вносить негативний вклад до перебігу COVID-19 головним чином призводячи до низькорівневого хронічного запалення. Відомо, що концентрація фібриногену зростає під час запального процесу, тому виявлений ефект можна пов'язати саме з вищою інтенсивністю постковідного запалення у осіб з надмірною вагою.

Іншим компонентом системи гемостазу, концентрація якого може знижуватися при запаленні, є протеїн С. І справді, у пацієнтів з $IMT > 30$ спостерігали чітку тенденцію до зниження вмісту протеїну С, що пов'язано зі споживанням цього проензиму (рис. 8).

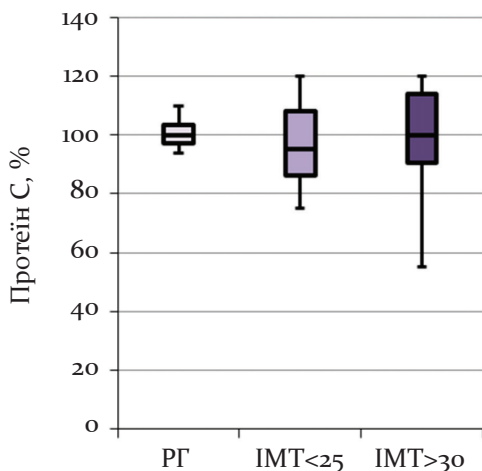


Рис. 8. Вміст протеїну С у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до індексу маси тіла: $IMT < 25$ ($n = 42$) та $IMT > 30$ ($n = 85$). РГ – референтна група ($n = 19$).

Варто нагадати, що ми аналізували стан гемостазу у постковідний період, коли гостра фаза хвороби була позаду. Однак, зниження вмісту протеїну С, поруч із зростанням концентрації фібриногену, підтверджує розвиток запального процесу, а на тлі зростання концентрації розчинного фібрину – вказує на внутрішньосудинну генерацію тромбіну.

У більшості осіб, що перенесли COVID-19, спостерігали зростання концентрації фібриногену, яке чітко корелювало з **тяжкістю захворювання відповідно до класифікації ВООЗ: легкий, середній, тяжкий і критичний перебіг захворювання**¹.

Концентрація фібриногену достовірно зростала у пацієнтів із перебігом захворювання середньої тяжкості та у пацієнтів групи «тяжкі та критичні» (рис. 9). Таке зростання концентрації фі-

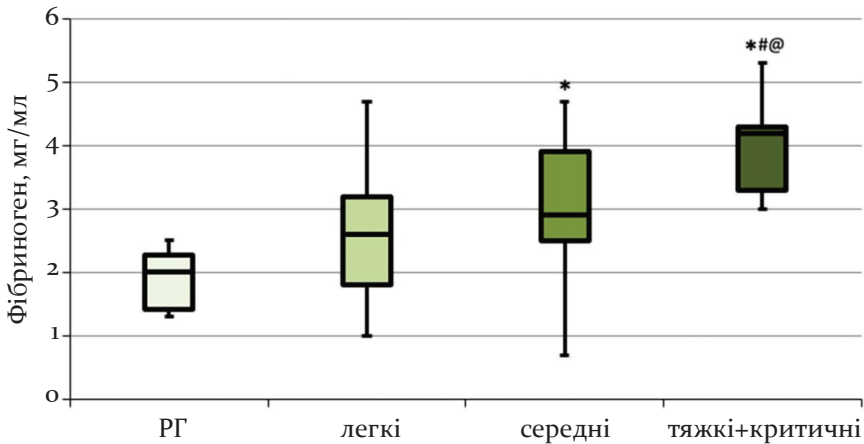


Рис. 9. Концентрація фібриногену у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до тяжкості еренесеного захворювання: легке (n = 79), середнє (n =74) та тяжке і критичне (n= 38). РГ – референтна група (n = 19).

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

– достовірно відносно групи пацієнтів з легким перебігом захворювання при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

@ – достовірно відносно групи пацієнтів з перебігом захворювання середньої тяжкості при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

¹ (World Health Organization. (2020). Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: interim guidance. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330893>)



бриногену пов'язане зі ступенем запалення, може сприяти розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення, а отже – має важливе діагностичне значення.

Також виявлено тенденцію до зниження вмісту протеїну С у пацієнтів з важким та критичним перебігом захворювання, що є по-перше результатом появи тромбін у кровотоці, а по-друге – фактором ризику внутрішньосудинного тромбоутворення (рис. 10).

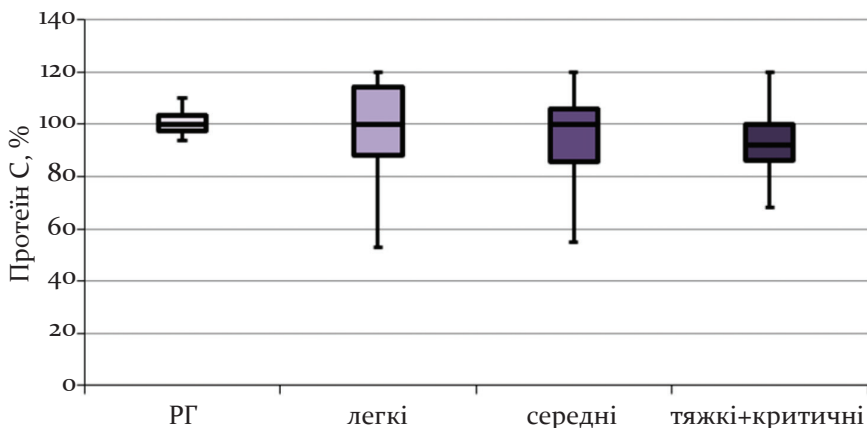


Рис. 10. Вміст протеїну С у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до тяжкості перенесеного захворювання: легке (n = 79), середнє (n = 74) та тяжке і критичне (n = 38). РГ – референтна група (n = 19).

В той же час, незалежно від тяжкості перенесеного захворювання, у більшості пацієнтів було виявлено підвищену концентрацію розчинного фібрину (рис. 11). Важливо відзначити, що навіть особи, які легко перехворіли на COVID-19, мають достовірно підвищену концентрацію розчинного фібрину, порівняно з референтною групою. Це свідчить про те, що COVID-19 здатен

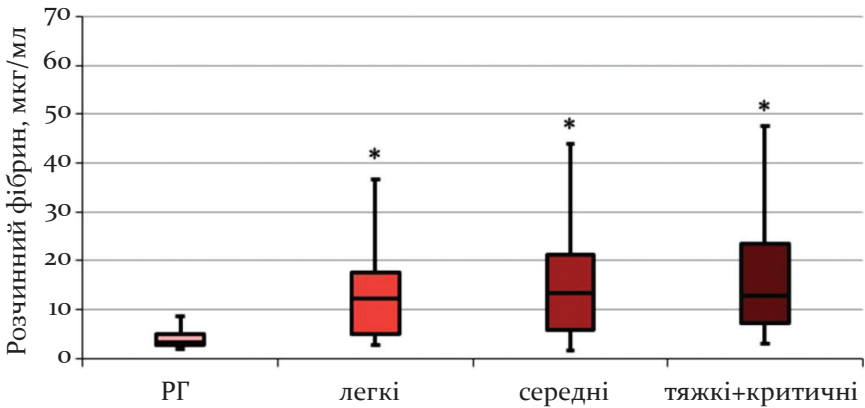


Рис. 11. Концентрація розчинного фібрину у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до тяжкості перенесеного захворювання: легке (n=79), середнє (n=74) та тяжке і критичне (n= 38). РГ – референтна група.

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

спричиняти ризик тромбоутворення незалежно від тяжкості перенесеного захворювання.

Іншим важливим аспектом, який потрібно враховувати, є **час, що пройшов після перенесеного захворювання**. Зокрема, ми аналізували стан системи гемостазу у **групах пацієнтів через 14, 28, 60 та понад 60 днів з моменту першого негативного тесту ПЛР**.

Найбільш показовим маркером виявилася концентрація претромбіну-1, що є безпосереднім наслідком надпродукції тромбіну. З плином часу концентрація претромбіну-1 зменшувалась і майже нормалізувалась через 3 місяці після одужання (рис. 12).

Аналізували також стан системи гемостазу у осіб, що **мали супутні патології**, такі як цукровий діабет (n = 19); серцево-су-

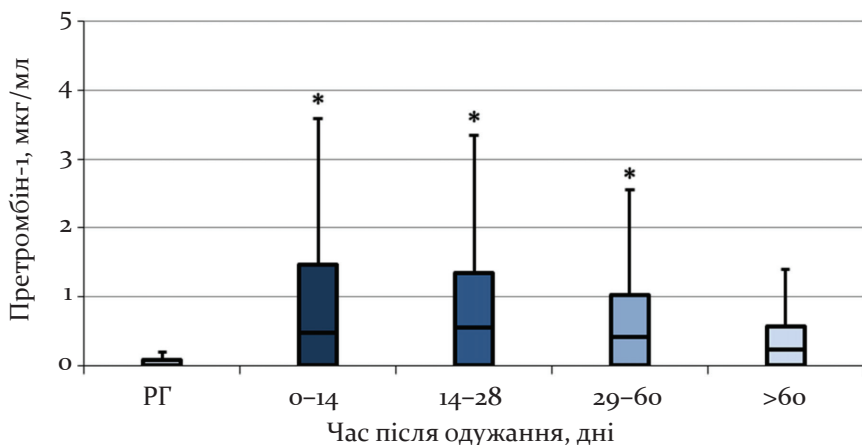


Рис. 12. Концентрація претромбіну-1 у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до часу, що минув після одужання: 0-14 (n = 34), 14-28 (n = 37), 29-60 (n = 59) та понад 60 (n = 61) днів. РГ – референтна група (n = 19).

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

динні захворювання, включаючи тромбоз глибоких вен, варикозне розширення вен, атеросклероз, серцеву недостатність, аритмію, вроджені вади серця, ішемічну хворобу серця, кардіоміопатію, розсіяний склероз, стенокардію (n = 83); захворювання органів дихання, включаючи хронічний бронхіт, бронхіальну астму, дифузний пневмофіброз, хронічне обструктивне захворювання легень (n = 18); ревматоїдний артрит (n = 11); високий артеріальний тиск (n = 81); **або ж не мали жодної з перелічених патологій** (n = 56).

Дослідження концентрації маркерів внутрішньосудинної генерації тромбіну, якими є насамперед претромбін-1 та розчинний фібрин, вказує на високу загрозу внутрішньосудинного тромбоутворення навіть за відсутності супутніх патологій у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19 (рис. 13 і 14).

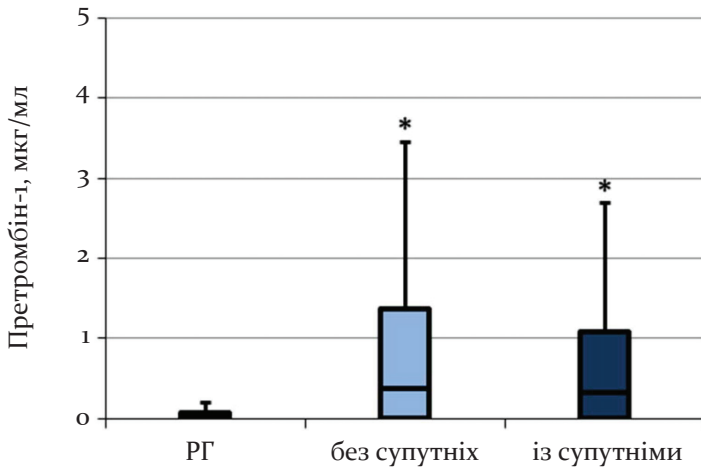


Рис. 13. Концентрація претромбіну-1 у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до наявності супутніх патологій: без супутніх патологій (n = 56); із супутніми патологіями (n = 133). РГ – референтна група (n = 19).

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

В той же час, у пацієнтів, що мають супутні патології, виявлено достовірне підвищення концентрації фібриногену (рис. 15). Поруч із такими показниками як розчинний фібрин або претромбін-1, підвищення концентрації фібриногену може свідчити про значний ризик внутрішньосудинного тромбоутворення.

Таким чином, проведений аналіз стану системи зсідання крові дозволив обрати перелік діагностичних тестів, які вказують на загрозу розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення. Надалі автори застосували створений алгоритм для аналізу стану пацієнтів, розподілених на групи з урахуванням розробленої ВООЗ класифікації: **пацієнти з групи високого ризику**

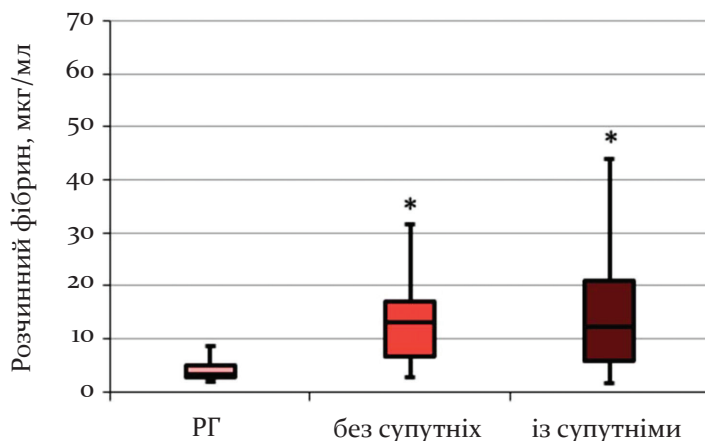


Рис. 14. Концентрація розчинного фібрину у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до наявності супутніх патологій: без супутніх патологій (n = 56); із супутніми патологіями (n = 133). РГ – референтна група (n = 19).
* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

(ГВР) мали принаймні один з факторів ризику ускладнень (вік більше 65 років, надмірну вагу або супутні патології); пацієнти з групи без ризику (ГБР) не мали жодної зі згаданих ознак.

У осіб, що перехворіли на COVID-19, концентрація D-димеру знаходиться у межах норми, тоді як концентрація розчинного фібрину є високою, що особливо помітно в групі високого ризику (рис. 16).

Зростання концентрації розчинного фібрину, яке свідчить про активацію системи зсідання крові, на тлі відсутності D-димеру, поява якого свідчить про гідроліз фібринових депозитів, може вказувати як на відсутність внутрішньосудинного тромбоутворення, так і на існування фібринових depo-

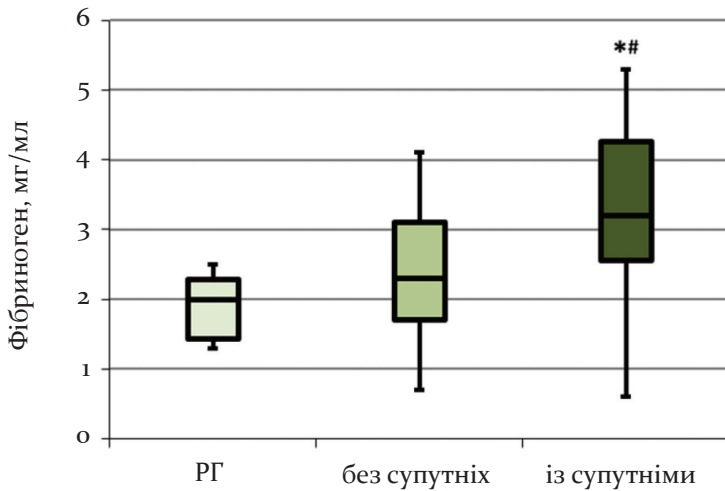


Рис. 15. Концентрація фібриногену у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до наявності супутніх патологій: без супутніх патологій ($n = 56$) та із супутніми патологіями ($n = 133$). РГ – референтна група ($n = 19$).

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

– достовірно відносно групи пацієнтів без супутніх патологій при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

зитів, які не гідролізуються системою фібринолізу та становлять загрозу ішемізації та емболізації. Тому для комплексного аналізу стану системи гемостазу ми вважаємо необхідним одночасне визначення концентрації D-димеру та розчинного фібрину.

У пацієнтів, які перехворіли на COVID-19 та належать до групи високого ризику, достовірно зростає концентрація фібриногену (рис. 17). Це результат запального процесу, що водночас підвищує ризик розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення. Тому визначення концентрації фібриногену безумовно повинно

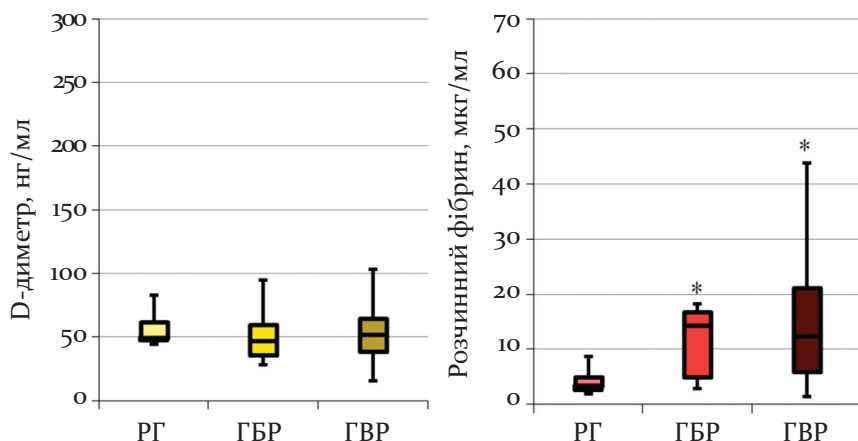


Рис. 16. Концентрація D-димеру та розчинного фібрину у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до ризику ускладнень: група без ризику – ГБР (n = 28) та група з високим ризиком – ГБР (n = 161). РГ – референтна група (n = 19).

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

входити до всіх алгоритмів діагностики пост-ковідних розладів системи гемостазу.

Важливо, що у пост-ковідний період відновлюється і підтримується баланс між антикоагулянтами і прокоагулянтами. Про це свідчить відновлення нормального рівня протейну С. Нормалізація рівня протейну С може компенсувати підвищений прокоагулянтний потенціал (рис. 18). Однак, у разі виявлення низького (нижче 70 %) рівня протейну С, слід контролювати інші параметри системи гемостазу (розчинний фібрин, претромбін-1, фібриноген) таких пацієнтів у динаміці та розглянути можливість призначення антикоагулянтної терапії.

Поява у кровотоці претромбіну-1, поруч із розчинним фібрином, вказує на генерацію внутрішньосудинного активного

тромбіну. Його концентрація була достовірно вищою, порівняно з показниками референтної групи (рис. 19). Однак, навіть пацієнти, що не входили до групи ризику, часто мали високий вміст

Рис. 17. Концентрація фібриногену у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи, відповідно до ризику ускладнень: група без ризику – ГБР (n = 28) та група з високим ризиком – ГВР (n = 161). РГ – референтна група (n = 19).

* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

– достовірно відносно групи без супутніх патологій при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

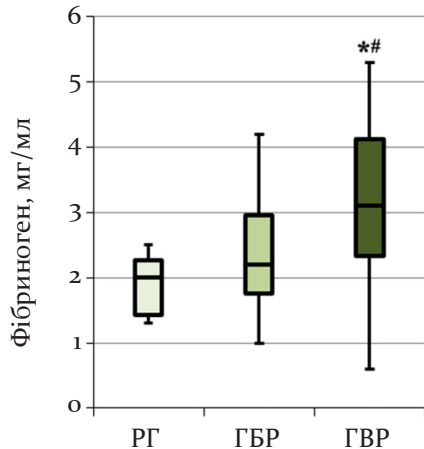
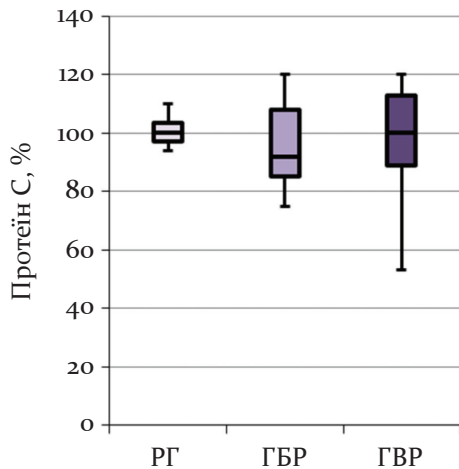


Рис. 18. Вміст протеїну С у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до ризику ускладнень: група без ризику – ГБР (n = 28) та група з високим ризиком – ГВР (n = 161). РГ – референтна група (n = 19).



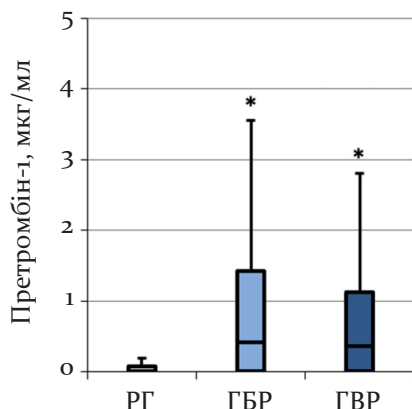


Рис. 19. Концентрація претромбіну-1 у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, розподілених на групи відповідно до ризику ускладнень: група без ризику – ГБР (n = 28) та група з великим ризиком – ГВР (n=161). РГ – референтна група (n = 19).
* – достовірно відносно референтної групи при $p \leq 0,05$ відповідно до критерію Манна-Вітні.

претромбіну-1. Це вкотре підтверджує, що загроза внутрішньосудинного тромбоутворення може спостерігатися у всіх, хто перехворів на COVID-19, незалежно від віку, наявності супутніх захворювань, та навіть від часу, який минув з моменту одужання (до 3 місяців).



Висновки

Аналіз стану системи зсідання крові осіб, що перехворіли на COVID-19, виявив значне накопичення в плазмі крові маркерів тромбофілії. Моніторинг стану системи гемостазу може не лише надати інформацію про загрозу розвитку внутрішньосудинного тромбоутворення, але і дати змогу спрогнозувати перебіг реабілітації, що набуває особливого значення в умовах триваючої пандемії.

Відсутність D-димеру у осіб, що перенесли COVID-19, не обов'язково свідчить про відсутність у них загрози внутрішньосудинного тромбоутворення. Поглиблений аналіз є необхідним для коректного прогнозу розвитку тромботичних ускладнень у таких пацієнтів.

Лише одночасне визначення концентрації розчинного фібрину та D-димеру може надати інформацію про те, чи існували у кровотоці фібринові депозити, чи формуються вони в даний час та чи руйнує їх система фібринолізу.

Поява претромбіну-1, так само як і розчинного фібрину, є прямим наслідком внутрішньосудинної генерації активного тромбіну, та свідчить про активацію системи зсідання крові.

Підвищення концентрації фібриногену та зниження вмісту протеїну С слід розглядати як додаткові ознаки підвищення прокоагулянтного потенціалу, яке поруч із появою розчинного фібрину та/або претромбіну-1 може свідчити про загрозу внутрішньосудинного тромбоутворення та повинне бути враховано при супроводі таких пацієнтів.



Рекомендований список літератури



Комісаренко С.В. Світова коронавірусна криза. Київ: ЛА-Т&К, 2020. 120 с.



Комісаренко С. В. Дослідження коронавірусу SARS-CoV-2 та захворювання COVID-19, яке він викликає. Вісник Національної академії наук України. 2021, 6: 37-41.



Komisarenko S.V. Scientists' pursuit for SARS-COV-2 coronavirus: strategies against pandemic. Ukr Biochem J. 2020, 92(6): 5-52.



Vari S.G. COVID-19 infection: disease mechanism, vascular dysfunction, immune responses, markers, multiorgan failure, treatments, and vaccination. Ukr Biochem J. 2020, 92(3): 6-21.



Методичні рекомендації «Застосування імуноензимних методів для діагностики загрози внутрішньосудинного тромбоутворення» / Комісаренко С.В. та ін. Київ: Видавець Бихун В.Ю., 2019. 36 с.



Korolova D., Shevchuk O., Kostiuchenko O., Chernyshenko T., Klymenko K., Platonova T., Ivankiv Y., Palii S., Pak A., Chernyshenko V., Korda M., Komisarenko S., Vari S. Hematological Findings in Post-COVID-19 Recovery Period: Three-Month Follow-Up Study. SSRN 27.10.2022; <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4234239>



Stark K., Massberg S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. Nature reviews. Cardiology. 2021, 18(9): 666-682.



Pagotto A., Uliana F., Nordio G. et al. The main protease (Mpro) from SARS-CoV-2 triggers plasma clotting in vitro by activating coagulation factors VII and FXII. *BioRxiv* 2024.09.05.611400; doi: 10.1101/2024.09.05.611400.



Negrier C, Shima M, Hoffman M. The central role of thrombin in bleeding disorders. *Blood Rev.* 2019, 38:100582.



Refaai M.A., Riley P., Mardovina T., Bell P.D. The Clinical Significance of Fibrin Monomers. *Thromb Haemost.* 2018, 118(11): 1856-1866.



Lugovskoy E.V., Kolesnikova I.N., Komisarenko S.V. Usage of monoclonal antibodies for determination of localization of antigenic determinants and fibrin polymerization sites within fibrinogen and fibrin molecules and their application in test-systems for diagnostics and the threat of thrombus formation. *Biotechnologia Acta.* 2013, 6(4): 33-42.



Schafer K., Goldschmidt E., Oostra D. et al. The clinical significance of ultra-high D-dimer levels. *Journal of vascular surgery. Venous and lymphatic disorders.* 2022, 10(1): 8-13.



Poudel A., Poudel Y., Adhikari A. et al. D-dimer as a biomarker for assessment of COVID-19 prognosis: D-dimer levels on admission and its role in predicting disease outcome in hospitalized patients with COVID-19. *PLoS one.* 2021, 16(8): e0256744.



Al-Samkari H., Song F., Van Cott E.M. et al. Evaluation of the prothrombin fragment 1.2 in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Am J Hematol.* 2020, 95(12): 1479-1485.

Виробничо-практичне видання

**Комісаренко Сергій Васильович
Корда Михайло Михайлович
Шандор Г. Варі та ін.**

**ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГРОЗИ ВНУТРІШНЬОСУДИННОГО
ТРОМБОУТВОРЕННЯ У ПАЦІЄНТІВ, ЯКІ ПЕРЕХВОРИЛИ НА COVID-19**

Методичні рекомендації

Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 2,33. Тираж 150 пр. Зам. № 175.

Видавець і виготовлювач
Тернопільський національний медичний
університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, Україна.

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру суб'єктів
видавничої справи ДК № 7242 від 02.02.2021 р.