

# АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ КАК ОТВЕТ НА ДИСФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ И ПРОДУКТЫ ДЕГРАДАЦИИ ФИБРИНА ПРИ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

## THE PLATELETS AGGREGATION IS RESPONSE ON AN ENDOTHELIUM DISFUNCTION AND FIBRIN MONOMERS COMPLEXES IN NEW CORONAVIRUS INFECTION

V. Dubinina  
S. Pavlova

*Summary.* There are four years from the pandemic start. The data published by World health Organization on its official page "As of 8 January 2023, over 659 million confirmed cases and over 6.6 million deaths have been reported globally" [1]. Despite on active findings of effective treatment and vaccines no one hasn't yet found Therefore the understandings of coronavirus infection pathogenesis and pathological reactions by both immune and hemostasis systems is very important especially the comprehensive of processes named immuno- thrombosis [2,3]. So the appearance aggregation of platelets and fibrin- related markers is on early stage of pathology process and authors try to underline the actuality of those investigations for adequate both treatment and sequels prevention.

*Keywords:* coronavirus infection, Sars-cov-2, immuno- thrombosis, platelets, fibrin-monomers complexes.

**Дубинина Виктория Васильевна**

Доцент, Дальневосточный государственный  
медицинский университет, г. Хабаровск  
vickdoctor@gmail.com

**Павлова Светлана Павловна**

Доцент, Дальневосточный государственный  
медицинский университет, г. Хабаровск  
sp-pavlova@mail.ru

*Аннотация.* С начала пандемии коронавирусной инфекции прошло 3 года и на 8 января 2023 года общее количество заболевших соответствует 659 миллионам, количество тотальной смертности 6,6 миллионов человек [1]. Несмотря на активные поиски фармакологических компаний не найдены ни эффективные препараты, ни вакцины, которые предотвратили бы распространение инфекции. Важно понимание патофизиологии коронавирусной инфекции, участие иммунной системы и системы гемостаза в процессе, который уже назвали иммунотромбозом [2,3], и который можно обнаружить уже на ранних стадиях инфекции в виде агрегации тромбоцитов и продуктов фибринолиза, анализ данных показателей будет актуален для адекватного патогенетического лечения и профилактики осложнений.

*Ключевые слова:* инфекция, тромбоциты, агрегация, фибринолиз, растворимые фибрин- мономерные комплексы, иммунотромбоз.

**П**андемия новой коронавирусной инфекции (НКИ) для всего мира поставила множество вопросов, на которые и спустя три года нет достаточно точного ответа. Патофизиологические механизмы, обусловленные металлопротеиназами, одной из которых является ангиотензинпревращающий фермент, и именно рецепторы для него представляют входные ворота для НКИ, они присутствуют практически во всех тканях организма; и те каскадные реакции многих систем, которые развиваются на распад того же белка тромбина или реакции других сериновых протеаз, приводят к тяжелым последствиям, так как антипротеаз самого организма недостаточно и компенсаторный механизм ответных реакций приводит к еще большим последствиям. Страшен не вирус, а запуск той же системы комплемента и гемостаза, ответный каскад которых активируется протеазами и сопровождается рядом запрограммированных клеточных и системных процессов, приводящих к тромбозу и в дальнейшем к деграда-

ции продуктов фибринолиза, и уже защитные реакции реализуют более негативные последствия для организма хозяина, в этом, помимо других клеток, активное участие принимают и тромбоциты.

Тромбоциты- удивительные клетки, и даже не клетки- в них нет ядра, синтезировать белки они могут и при помощи одной мРНК, это — по сути своей пластины- части мегакариоцитов, но помимо костного мозга, на сегодняшний день доказано их образование и в легких, где они генерируются из мегакариоцитов, для последних легкие являются резервуаром. Тромбоциты участвуют во многих реакциях организма, помимо своей известной функции в процессах гемостаза, они участвуют в воспалительных реакциях, выделяя белки для привлечения макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов, непосредственно сами способны участвовать в реакциях врожденного иммунитета, при помощи набора биологически активных веществ, содержащихся

в их гранулах. Тромбоциты способствуют целостности базального барьера альвеолярных капилляров, что избирательно ограничивает перенос воды, белков и эритроцитов из сосудов. Тромбоциты также способствуют восстановлению сосудов легких [3]. Хотя тромбоциты усиливают кровоостанавливающую и воспалительную защиту здорового легкого, экспериментальные и клинические данные показывают, что эти клетки крови являются эффекторами повреждения при различных легочных расстройствах и синдромах [3,5].

Помимо этого, тромбоциты участвуют в иммунных реакциях, дополняя нейтрофильное воспаления, которому способствует провоспалительные цитокины, хемокины и липидные медиаторы. Самое важное условие для восстановления тканей после острого воспаления — это производство противовоспалительных факторов тромбоцитами, кооперация и кросс реакции с теми же альвеолярными макрофагами и фибробластами. Как известно, тромбоцит на своей клеточной мембране несет ряд рецепторов, посредством которых он общается с окружающими клетками или воспринимает информацию от высоко аффинных молекул, каковыми являются, например, молекулы адгезии эндотелия [4]. На мембране тромбоцитов присутствует огромное количество рецепторов, что подчеркивает их активное участие в большинстве процессов организма:  $\alpha$ - и  $\nu$ -адренорецепторы, рецепторы для тромбина, ламинина, витронектина, фибриногена, фибронектина, молекул адгезии, серотонина, стоит отметить, что до 99% всего серотонина организма депонировано в плотных гранулах тромбоцитов [5]. Для нашей работы важно упомянуть пуриноэргические рецепторы P<sub>2</sub>Y и они же для фактора Виллебранда, и гликопротеиновые рецепторы к коллагену, которые важны именно при эндотелиальной дисфункции. Известно, что тромбоциты способны к генерации отпочковыванием новых пластин и всегда быстро реагируют на внеклеточные сигналы и клеточное окружение [5]. Учитывая то, что резервуаром для мегакариоцитов является легкое, степень взаимодействия с эндотелиальными клетками легочных капилляров новой генерации тромбоцитов при коронавирусной инфекции может быть показателем прогноза, в том числе и осложнений в виде фиброза. Так как недостаточно механизмов, тормозящих и влияние самих сериновых протеаз, так и механизмов, уменьшающих негативные последствия компенсации от запрограммированных клеток- тромбоцитов и фибробластов. Недавно обнаруженные биологические способности тромбоцитов изучаются в контексте защиты легких, болезней и ремоделирования. Взаимодействия со многими клетками- особенно с макрофагами и фибробластами и активацию под действием молекул адгезии выброса тканевого фактора моноцитами или под действием трансформирующего фактора роста бета преоб-

разование фибробластов в миофибробласты, которые будут продуцировать коллаген и, как следствие, возникает необратимый фиброз. В одной из работ показано взаимодействие тромбоцитов и моноцитов в сравнении тяжелой и среднетяжелой НКИ, выявлена корреляция увеличения фибриногена, ИЛ-6, С — реактивного протеина и D- димера с агрегацией тромбоцитов и их взаимодействием через селектины с моноцитами [6]. В другой работе обсуждается роль нейтрофилов и фибробластов, как мезенхимальных клеток с продукцией коллагена. их взаимодействие с клетками эндотелия и доступностью того же соединительнотканного белка для активации тромбоцитов в процесс алгезии и дальнейшей агрегации [7] В работе китайских исследователей из Уханьского центра было показано, что продукты деградации фибринолиза в высоких измеряемых величинах являются предиктом худшего прогноза у больных с НКИ [8]. Поэтому изучение роли тромбоцитов играет ключевую роль в понимании патогенеза новой коронавирусной инфекции, также, как и изучение показателей не только тромбоцитарного гемостаза, но и фибринолиза для того, чтобы оценить тяжесть и прогноз у конкретного больного.

Таким образом, целью данной работы явилось исследование одной из важных функций- агрегации тромбоцитов. В качестве исследуемых стимулов в первую очередь был выбран белок коллаген, так как именно агрегация тромбоцитов с коллагеном покажет выраженность эндотелиальной дисфункции, так же, как и агрегация с ристомицином, реакция на аденозиндифосфат покажет работу рецептора фактора Виллебранда и его активацию при гиперкоагуляции. Показатели фибринолиза были изучены с использованием анализа на D — димер и фибрин- мономерные комплексы как продукты деградации фибрина.

## Материалы и методы

Было обследовано 26 больных, в возрасте 28–48 лет без хронических заболеваний, по гендерному признаку 14 женщин и 12 мужчин. с подтвержденной НКИ методом полимеразно — цепной реакции с чувствительностью 500 генокопий в мл, тест- система «Виктор Бест», соответственно все больные были разделены на 2 группы: с легким (I группа) и средне-тяжелым (II группа) течением коронавирусной инфекции по критериям временных методических рекомендаций [9]. Пневмонит был подтвержден у 18 человек с легким и средне-тяжелым клиническим течением НКИ и соответствовал лучевой КТ тяжести 1–2. В группе 1–11 человек с легкой клинической степенью тяжести и в группе II- 8 человек со средне-тяжелой степенью. Остальные 7 пациентов (группа III) наблюдались с превалированием аносмии и автоматически отнесены к легкому течению новой

коронавирусной инфекции. Все наблюдаемые пациенты были обследованы в период с 4 по 8 день болезни, находились на амбулаторном лечении и не получали антиагреганты или антикоагулянты на момент обследования.

Агрегация тромбоцитов была воспроизведена на современном агрегометре, принцип определения в котором оптическая агрегатометрия. Венозную кровь смешивали с цитратом натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами при скорости 1000 оборотов в минуту в течении 10 минут. Через активированную индукторами агрегации плазму пропускали свет, и при активном построении конгломератов из тромбоцитов оптическая плотность изменяется, прозрачность плазмы без тромбоцитов увеличивается, этот процесс четко регистрируется прибором в виде волн и рассчитывается далее автоматически в количественных единицах. Аденозиндифосфат позволяет судить о работе пуриnergических рецепторов, коллаген и ристомицин об имеющейся эндотелиальной дисфункции, адреналин соответственно стимулирует тромбоциты через адренорецепторы.

Помимо теста на агрегацию, были изучены и продукты фибринолиза и фибриноген. Метод изучения фибрин-мономерных комплексов достаточно прост, но требует четкого временного промежутка — от забора крови до выполнения анализа должно быть менее 60 минут. РФМК определяют при помощи альфа-фенантролина, который добавляют к обеднённой тромбоцитами плазме и смотрят как образуется фибрин. В норме содержание РФМК в плазме по количественному варианту методики составляет в среднем  $3,38 \pm 0,02$  мг/100 мл (или 3,38 мг%), с верхним пределом нормы 4,0 мг/100 мл или 4 мг%. Повышение уровня РФМК характерно для активации свертывания крови, причем, чем больше их концентрация, тем выше риск внутри-сосудистого тромбообразования. В нашем случае мы попытались выявить корреляционную зависимость между повышением РФМК и тяжестью состояния про НКИ, при чем с наличием выраженной эндотелиальной дисфункции или без неё.

Статистическая обработка результатов была произведена на программе «Statistica –5» с использованием средних арифметических значений с ошибкой и степенью свободы в том числе для непараметрических данных, критерия Стьюдента. Корреляционный индекс Пирсона рассчитывали по формуле в программе и интерпретировали коэффициент корреляции от нуля до единицы и выше, как положительную прямую связь с градацией: слабая (0,01–0,24), средняя (0,25–0,49) высокая (0,50–0,74) или очень высокая (0,75–1).

## Результаты и обсуждение

Продукты фибринолиза были обнаружены повышенными у всех обследованных пациентов без исключения, с минимальными цифрами в 7,5 мг/% и максимальными 22,4 мг%. Все полученные показатели мы разделили на 2 группы: с умеренно повышенными цифрами от 7,5 до 10 мг%, что по времени образования паракоагулята в виде фибрина соответствовало от 30 секунд до 19 секунд; и повышенными от 11 мг% до 20 мг%, что соответствовало от 18 секунд до 9 секунд времени образования фибрина. Результаты исследования приведены в таблице 1.

У больных II группы зафиксирован высокий уровень продуктов деградации в виде фибрин-мономерных комплексов, который соответствовал показателям от 11 до 22,4 мг%, средний показатель при этом  $15,13 \pm 3,51$ . Также отметим: что в большинстве наблюдений, что соответствовало 92,3% D-димер в пределах нормы. У пациентов 1 группы с легким клиническим течением пневмонита уровень РФМК был в пределах умеренных цифр и в среднем составил  $8,13 \pm 0,45$  мг%. У пациентов с аносмией (III группа) показатели достоверно не отличались от пациентов с легкой степенью тяжести при наличии пневмонита и соответствовали  $8,21 \pm 2,12$  мг%. D-димер был повышенным в 2 случаях клинически средне-тяжелого течения пневмонита, рентгенологически КТ-1 — при этом уровень РФМК был умеренно повышенным: в одном случае. 8 мг% и в другом- 9 мг%. Исходя из проведенного анализа, можно сделать вывод о значительном повышении РФМК при средне-тяжелой степени течения пневмонита, достоверно отличающимся от нормы и от показателей РФМК при легком течении и при аносмии. Рассчитанный коэффициент корреляции Пирсона выявил прямую положительную связь тяжелого клинического течения пневмонита и уровня РФМК и соответствовал  $r=0,77$  и не выявил такой же по силе связи в зависимости от поражения легких в 10, 25 или 40 процентов поражения и уровнем РФМК.

Уровень фибриногена был нормальным, не превышал 4 г/л у всех наблюдаемых пациентов, этому соответствовало и отсутствие лейкоцитоза, и повышенной СОЭ. Однако согласно исследованию, проведенному китайскими учеными в Ухани, уровень фибриногена был достоверно ниже ( $<1$  г/л) у скончавшихся пациентов по сравнению с выжившими пациентами [8]. Возможно, активное потребление этого острофазового белка при нейтрофильных ловушках или нетозе и дальнейшей гиперкоагуляции вплоть до развития ДВС у умерших пациентов.

Также стоит отметить, по данным многочисленных исследований, что несмотря на гиперкоагуляцию,

Таблица 1.

Показатели	I n=11	II n=8	III=7	Норма
РФМК, мг/%	8,13±0,45	15,13±3,51*	8,21±1,12	До 4
Фибриноген, г/л	2,5±0,55	3,11±1,25	2,5±0,76	2–4
Д- димер, нг/ мл	150,35±78,51	1782,3±102,1** ^	145:24±80,67	33,7–746

Примечание к таблице: ^- повышение у 2 пациентов; \* t= 1,997, p<0,05; \*\*t= 14,1; p<0,001

Таблица 2. Агрескрин

Показатель	Группа I, n=6	Группа II, n=5	Группа III	Норма
Агрегация с ристомидином	—	15,30, n=1	14,71, n=1	7,50–10,20
Агрегация с коллагеном	15,62, n= 4	17,53, n=4	—	6,60–12,80
Агрегация с АДФ	12,30, n=2	11,58, n=1	—	5,70–9,50
Агрегация с адреналином	—	13,26, n=1	—	5,40–8,50

развертывание стадий ДВС наблюдается только при присоединении вторичной бактериальной инфекции и развитии сепсиса. В нашем исследовании уровень фибриногена у пациентов с легкой и тяжелой степенями течения НКИ достоверно не отличался и соответствовал  $2,5 \pm 0,9$  и  $3,11 \pm 1,25$  и в каждом случае укладывался в норму. Данные показатели наблюдались при высоком уровне РФМК и даже у 2 пациентов с повышенным уровнем Д- димера.

Агрегация тромбоцитов выявила неоднозначные нарушения, которые показали себя различными при использовании индукторов, повышение агрегации на стимул коллагена и/ или ристомидина свидетельствует о выраженной эндотелиальной дисфункции, и требует профилактики фиброза в дальнейшем. Повышение агрегации на аденозиндифосфат показывает ответ пуриnergических рецепторов и обосновывает препараты, работающих на уменьшении агрегации тромбоцитов через эти рецепторы, например, клопидогрел. В нашем исследовании на агрегацию, в отличие от 100 процентного повышения РФМК, активация агрегации тромбоцитов была зафиксирована всего у 12 больных, при чем всего лишь у 5 со средне-тяжелой и у 7 с легкой степенью тяжести инфекции. У восьми пациентов выявлено моно повышение агрегации тромбоцитов с коллагеном, у двух с аденозиндифосфатом, у одного с ристомидином, при чем при легкой степени тяжести и при клинически выраженной аносмии, но не пневмоните. и у одного пациента со средне-тяжелым клиническим течением повышение агрегации было зафиксировано с коллагеном, с ристомидином, адреналином и с АДФ. Полученные данные отражены в таблице № 2.

## Выводы

Согласно результатам нашего исследования наилучшим прогностическим фактором и легко воспроизводимым лабораторно, являются продукты деградации фибрина, при чем для амбулаторного звена значимыми оказались фибрин- мономерные комплексы, нежели чем Д — димер. При этом контроль через месяц от заболевания показывал уровень РФМК в норме и что коррелировало с рентгенологической картиной- не было выявлено фиброзирующих изменений после адекватного лечения, направленного именно на купирование изменений показателей, в том числе агрескина. При выявлении повышения агрегации с коллагеном нами опытным путем, согласно патофизиологическому механизму, были назначены препараты, блокирующие серотониновые рецепторы тромбоцитов, которые тормозили выработку трансформирующего фактора роста бета для фибробластов, далее продуцирующих коллаген одного типа и способствующих фиброзу. И самое интересное, что тромбоциты — те клетки, которые участвуют в генерализованном процессе воспаления посредством взаимодействия с другими клетками и биологически активными веществами и уже без участия вируса, последний лишь запустил процесс. По данным литературы в некоторых посмертных исследованиях пациентов с COVID-19 было обнаружено мультифокальное микрососудистое эндотелиальное повреждение мозга без каких-либо признаков SARS-CoV-2 в мозге, что указывает на косвенное воздействие через защитные механизмы хозяина. Найдены доказательства того, что ковид-ассоциированная коагулопатия предполагает сложные дисрегулируемые взаимодействия между воспалительной, иммунной, коагуляционной, фибринолитической,

ческой, комплементарной и калликреин-кининовой системами. Эта связь врожденного иммунного ответа со свертыванием крови — в частности, в микрососудах, где дисфункция эндотелиальных клеток способствует образованию тромбов и воспалению,— была названа «иммунотромбозом» [2]. Таким образом, авторами доказана важная роль данных методов исследования,

в частности продуктов распада фибринолиза и агрегации тромбоцитов, особенно с коллагеном и ристомидином. Данные требуют дальнейшего исследования и назначения терапии, согласно выявленным изменениям в системе коагуляции, дифференцированный подход к антиагрегантам, направленными на определенные рецепторы тромбоцитов или антикоагулянтам.

---

#### ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization/ официальный сайт who.int/ situation report, weekly epidemiology report 11–18.01.2023.
2. Григорьева О.В. Исследование ковид- ассоциированной коагулопатии. Что известно и что предстоит узнать? Медицинский вестник, Беларусь, сентябрь 2022.
3. Andrew S., Weyrich 1, Guy A Zimmerman. Platelets in lung biology// Epub 2012. Oct 1. PMID: 23043249 PMCID: PMC3670819 DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183752. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23043249/>
4. Алиев М.А., Купша Е.И. Эндотелий. Его роль в миграции лейкоцитов// Международный студенческий научный вестник. — 2018. — № 6.
5. <https://eduherald.ru/ru/article/view?id=19278> (дата обращения: 07.01.23) .
6. Серебрянная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Янцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы различных воспалительных и иммунных реакций// Медицинская иммунология.2018.Т. 20,№ 6.С.785–796.
7. Eugenio D. Hottz, Isaclaudia G. Azevedo-Quintanilha, Lohanna Palhinha, Lívia Teixeira, Ester A. Barreto, Camila R.R. Pão, Cassia Righy, Sérgio Franco, Thiago M.L. Souza, Pedro Kurtz, Fernando A. Bozza, Patrícia T. Bozza Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19// J. Blood, September 10, 2020.
8. 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.
9. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] . — Text (visual): unmediated // Lancet. — 2020. — Vol. 395. — P. 497–506.
10. Временные методические рекомендации по лечению новой коронавирусной инфекции 16 пересмотра, август 2022.

---

© Дубинина Виктория Васильевна ( vickdoctor@gmail.com ), Павлова Светлана Павловна ( sp-pavlova@mail.ru ).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»