

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ВОЛИНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЛЕСІ УКРАЇНКИ

Кафедра фізіології людини і тварин

Тимошук Анна Олександрівна

ВПЛИВ COVID-19 НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗУ ЛЮДИНИ

Спеціальність: 091 «Біологія»

Освітня програма: Лабораторна діагностика

Робота на здобуття освітнього рівня «Магістр»

Науковий керівник:

Мотузюк Олександр Петрович,
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри фізіології людини і тварин

РЕКОМЕНДОВАНО ДО ЗАХИСТУ

Протокол №__

засідання кафедри фізіології людини і тварин

від_____2023 р.

Завідувачка кафедри _____

ЛУЦЬК – 2023

ЗМІСТ

Вступ.....	6
Розділ 1. Огляд літератури.....	8
1.1. Патфізіологія COVID-19.....	8
1.2. Фізіологія системи гемостазу.....	16
1.3. Вплив COVID-19 на систему гемостазу людини.....	19
1.4. Показники системи гемостазу, що змінюються при COVID-19..	24
Розділ 2. Методи та методики.....	28
2.1. Контингент та схема дослідження.....	28
2.2. Визначення вмісту фібриногену у зразках крові методом Клаусса.....	29
2.3. Визначення рівня Д-димеру у зразках крові пацієнтів методом ELISA..	31
2.4. Визначення кількості тромбоцитів референсним методом.....	35
Розділ 3. Результати дослідження та їх обговорення.....	37
3.1. Рівень Д-димеру у хворих на COVID-19 пацієнтів.....	37
3.2. Зміна кількості розчинних фібрин-мономерних комплексів у хворих на COVID-19 пацієнтів.....	39
3.3. Зміна рівня тромбоцитів у хворих на COVID-19 пацієнтів.....	41
3.4. Зміна швидкості активного часткового тромбoplastинового часу у вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів.....	43
3.5. Зміна кількості фібриногену у хворих на COVID-19 пацієнтів.....	45
3.6. Зміна МНВ у вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів.....	47
3.7. Зміна рівня протромбінового індекса на вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів.....	48
Висновки.....	50
Список використаних джерел.....	51

АНОТАЦІЯ

Тимощук А. О. Вплив COVID-19 на систему гемостазу людини.

Робота на здобуття освітнього рівня «Магістр». – Луцьк, 2023. – с

Роботу проводили на базі клініко-діагностичної лабораторії комунального підприємства “Волинська обласна клінічна лікарня” у 2023 році.

Описані основні патофізіологічні особливості перебігу захворювання, а також вплив COVID-19 на систему гемостазу. Проаналізовані літературні джерела, щодо показників гемостазу, які змінюються при COVID-19. Проведені лабораторні дослідження із визначення рівня фібриногену методом Клаусса, та Д-димеру методом ELISA. Проаналізовані зміни основних (фібриногену, тромбоцитів, РФМК МНВ, ПТІ, АЧТЧ) показників системи гемостазу, у відповідь на інфікування COVID-19

На вибірці пацієнтів було показано, що при коронавірусній інфекції відбувається збільшення рівня Д-димеру, при чому підвищення рівня Д-димеру сильно варіює. Рівень РФМК підвищується при коронавірусній інфекції. Рівень фібриногену також збільшується. Частина наших пацієнтів мали тромбоцитопенію. Мала місце зміна часу АЧТЧ та ПТІ.

Проаналізовані основні причини збільшення рівня фібриногену, РФМК, Д-димеру.

Ключові слова: COVID-19, система гемостазу.

SUMMARY

Tymoshchuk A. O. The impact of COVID-19 on the human hemostatic system.

Work to obtain the educational level "Master". - Lutsk, 2023. - p

The work was performed on the topic: Impact of COVID-19 on the human hemostasis system. The work was carried out on the basis of the clinical diagnostic laboratory of the communal enterprise "Volyn Regional Clinical Hospital" in 2023. The main pathophysiological features of the course of the disease are described, as well as the impact of COVID-19 on the hemostasis system.

Literary sources were analyzed regarding hemostasis indicators that change during COVID-19. Laboratory studies were conducted to determine the level of fibrinogen by the Clauss method and D-dimer by the ELISA method.

Analyzed changes in the main (fibrinogen, platelets, SFMC INR, PTI, aPTT) indicators of the hemostasis system in response to infection with COVID-19

It was shown in a sample of patients that during covid infection there is an increase in the level of D-dimer, and the increase in the level of D-dimer varies greatly. The level of SFMC increases with covid infection. The level of fibrinogen also increases. Some of our patients in our sample had thrombocytopenia. There was a change in the time of aPTT and PTI.

The main reasons for the increase in the level of fibrinogen, RFMK, and D-dimer were analyzed.

Key words: COVID-19, hemostasis system.

Перелік умовних скорочень

ACE – **angiotensin converting enzyme** (ангіотензин-перетворюючий фермент)

ELISA – **enzyme-linked immunosorbent assay** (імуноферментний аналіз)

SARS-CoV-2 – **Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2** (Важкий гострий респіраторний синдром, викликаний коронавірусом)

MERS-CoV – **Middle East respiratory syndrome** (близькосхідний респіраторний синдром)

SFMC – **soluble fibrin monomeric complex** (розчинні фібрин-мономерні комплекси)

aPTT – **activated partial thromboplastic time** (активований тромбопластиновий час)

MHB – міжнародне нормалізоване відношення

Вступ

Актуальність теми. У грудні 2019 року ряд гострих атипових респіраторних захворювань виник у місті Ухань, Китай. Захворювання швидко розповсюдилося до інших країн. Слід за тим, це захворювання було класифіковане як новий вид коронавірусу. Власне, новий вид коронавірусу отримав назву SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2), у наслідок його високої гомології до SARS-COV, що викликав гострий респіраторний дистресс-синдром, з високою смертністю у 2002-2003 роках. Власне, SARS-CoV-2 швидко розповсюдився на більше ніж 200 країн. Станом на 7 квітня 2020 року, у світі зареєстровано 1 400 000 випадків захворювання на дану хворобу [2].

Хоча більшість пацієнтів страждали від легкого або помірного перебігу хвороби, 15-20% пацієнтів починали страждати від важкої пневмонії, що могла призводити до респіраторного дистресс-синдрому, та поліорганної недостатності [6].

Окрім цього, пацієнти з важким перебігом хвороби мали підвищений ризик розвитку тромбозів, включаючи легенову емболію, тромбоз глибоких вен, та тромбоз артерій [10]. Таким чином, вивчення впливу COVID-19 на систему гемостазу є актуальним.

Мета дослідження: аналіз показників системи гемостазу (рівня фібриногену, кількості тромбоцитів, часу АЧТЧ, РФМК, МНВ) при COVID-19.

Відповідно до мети, були поставлені наступні **завдання:**

1. Визначити вміст Д-димеру у крові хворих на COVID-19 пацієнтів.
2. Визначити рівень РФМК у крові хворих на COVID-19 пацієнтів.
3. Визначити рівень тромбоцитів у крові хворих на COVID-19 пацієнтів.
4. Визначити час АЧТЧ у крові хворих на COVID-19 пацієнтів.
5. Визначити кількість фібриногену у крові хворих на COVID-19 пацієнтів.

6. Визначити відсоток ПТІ у крові хворих на COVID-19 пацієнтів.

Об'єктом дослідження були хворі на COVID-19, з порушеннями системи гемостазу.

Предмет дослідження: зміна в системі гемостазу після захворювання COVID-19.

Методи дослідження: визначення фібриногену методом Клаусса, визначення рівня Д-димеру методом ELISA.

Наукова новизна. У роботі проаналізовано основні маркери системи коагуляції при COVID-19. Проаналізовано можливі причини таких змін. Враховуючи, що ці маркери є індикаторами вираженості патологічного процесу, їх визначення дуже важливе. Дані, отримані в результаті проведення даного експерименту, дозволили виділити специфічні маркери, які можуть бути використані лабораторними діагностами та лікарями в діагностиці при дослідженні системи гемостазу у пацієнтів із COVID-19.

Практичне значення одержаних результатів у тому, що рівень Д – димеру корелює із важкістю перебігу захворювання. Таким чином, підвищення рівня Д-димеру є свого роду маркером важкості патологічного процесу. Збільшення рівня SFMC асоційоване із збільшенням ризику розвитку тромбозів. Таким чином, можна використовувати рівень Д-димеру та SFMC як моніторинг успішності терапії, та ризик розвитку ускладнень.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Патофізіологія COVID-19

SARS-CoV-2 належить до родини коронавірусів та зазвичай інфікує дихальну систему, хоча й інші системи органів можуть бути інфіковані. Часто наслідком інфікування дихальної системи є поява сухого кашлю, задишки. До загальних проявів відносять ще лихоманку, головні болі, головкружіння, слабкість. До проявів зі сторони шлунково-кишкового тракту відносять нудоту і діарею [2].

Власне, коронавіруси є одно ланцюговими РНК-вірусами (30кБаз), що інфікують величезну кількість видів. Їх класично поділяють на 4 класи α , β , γ , δ на основі геномної структури. А α , β інфікують лише ссавців. Людські коронавіруси, такі як 229E та NL63 викликають звичайну простуду, та належать до альфа-коронавірусів. На противагу, (MERS-CoV) і SARS-CoV-2 належать до бета корона вірусів [2].

Життєвий цикл вірусу включає наступні 5 етапів: прикріплення, проникнення, біосинтез, дозрівання, вихід із клітини. Коли вірус прикріплюється до рецепторів клітин хазяїна, він піддається ендоцитозу, або зливається з мембраною (стадія проникнення). Як тільки вірусний вміст виділився в клітину, вірусна РНК входить в ядро для реплікації. Вірусна мРНК використовується для продукування вірусного білка (стадія біосинтезу). Таким чином, нові вірусні частинки дозрівають і виділяються. Коронавіруси складаються із чотирьох структурних білків: S-spike, мембранних (M), оболонки (E), нуклеокапсиду (N). S-білок – це трансмембранний глікопротеїн [2].

SARS-CoV-2 потрапляє до клітин господаря завдяки взаємодії свого S білка із ACE2 рецепторами на поверхні клітин. Для проникнення вірусу потрібна також TMPRSS2 протеаза. Взаємодія вірусу із ACE2 рецепторами може блокувати протизапальну функцію. Для протидії взаємодії вірусу із ACE2 рецепторами, у хворих на артеріальну гіпертензію, пропонують

використовувати блокатори рецепторуангіотензинуII(AT-1), та інгібітори АСЕ [1].

У відповідь на проникнення вірусу, своєчасна, локалізована та добре скоординована імунна відповідь є першою лінією фізіологічного захисту від інфекції SARS-CoV-2. Подібно до інших цитопатичних вірусів, інфекція SARS-CoV-2 викликає загибель і пошкодження епітеліальних клітин дихальних шляхів через різні процеси, такі як піроптоз. Вірусно-опосередкована загибель клітин викликає вивільнення різних молекулярних патернів, пов'язаних з пошкодженням (DAMP) і молекулярних патернів, пов'язаних з патогенами (PAMP), які, як вважають, розпізнаються рецепторами розпізнавання патернів на альвеолярних макрофагах і ендотеліальних клітинах [52].

Наприклад, Toll-подібні рецептори (TLR) розпізнають PAMP переважно у позаклітинному просторі, запускаючи індукцію факторів транскрипції прозапальних цитокінів, таких як NF- κ B, а також активуючи регуляторні фактори інтерферону, які опосередковують інтерферон-залежну протівірусну відповідь типу I [52].

Навпаки, білки нуклеотид-зв'язуючого домену, багаті лейцин-повторами (NLR), розпізнають DAMP. Ці NLR експресовані внутрішньоклітинно і можуть викликати активацію інфламасом і перетворення proIL-1 β в активний IL-1 β . Циркулюючі рівні IL-1 β у пацієнтів з COVID-19 свідчать про локальну активацію запалення [52].

Вважається, що пряме вірусне зараження макрофагів та/або дендритних клітин сприяє подальшому вивільненню цитокінів і хемокінів, згодом активуючи пізню фазу рекрутингу імунними клітинами антиген-специфічних Т-клітин для знищення інфікованих вірусом альвеолярних клітин. На додаток до вивільнення цитокінів і залучення імунних клітин, іншим потенційним механізмом, який може сприяти успішному виведенню вірусу, є нейтралізація антитіл. Сучасна література свідчить про те, що

сероконверсія у пацієнтів з COVID-19 відбувається приблизно через 7–14 днів після появи симптомів [52].

АСЕ2-карбоксіпептидаза, що розщеплює ангіотензин-1, ангіотензин-2, та слугує як гомеостатичний регулятор артеріального тиску. Окрім цього, АСЕ2 нейтралізує близько 80-90% циркулюючого брадикініну. Надлишок брадикініну призводить до розширення капілярів, та органної недостатності. В умовах запалення, брадикінін взаємодіє зі своїми рецепторами порушуючи функціонування капілярного ендотеліального бар'єру, полегшуючи проникнення імунних клітин до легеневої інтерстиціальної тканини [6,51].

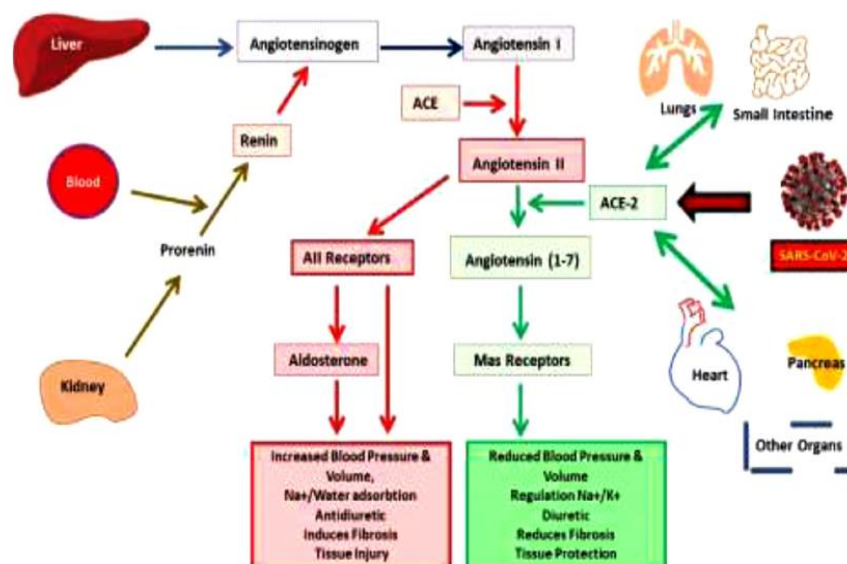


Рис.1.1. Роль АСЕ2 у фізіології організму [20].

Як бачимо, ангіотензіноген синтезується в печінці. Ренін позитивно впливає на трансформацію ангіотензиногену в ангіотензин I. Ангіотензин I під дією фермента АСЕ перетворюється у ангіотензин II. Ангіотензин II через свої рецептори стимулює підвищення артеріального тиску, абсорбцію натрію та води, володіє антидіуретичною функцією, індукує фіброз, стимулює пошкодження тканин. Ангіотензин II під дією АСЕ2 перетворюється у ангіотензин 1-7, що взаємодіючи зі своїми рецепторами зменшує артеріальний тиск, зменшує фіброз, володіє діуретичними властивостями [20].

Окрім цього, ACE2 генерує ангіотензин 1-9, шляхом розщеплення ангіотензину I, в той час як ACE перетворює ангіотензин I в ангіотензин II. ACE2 також метаболізує ангіотензин II у ангіотензин 1-7. Пептиди, що синтезовані ACE2 зв'язують G-білки і стимулюють важливі внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, такі як-фосфоліпазу А, фосфоліпазу 3 кіназу. Фосфоліпаза А потрібна для синтезу арахідонової кислоти, а фосфоліпаза 3 кіназа для роботи синтази оксиду азоту(NO). Окрім цього, ці пептиди активують фосфоліпазу С, та збільшують вміст внутрішньоклітинного кальцію [13].

Враховуючи, що SARS-CoV-2 тропний до ACE2, що експресуються також і на ендотеліальних клітинах. Результатом зв'язування є активація ендотеліальних клітин і апоптоз. Існують докази, впливу SARS-CoV-2 на ACE2 рецептори нирок та тонкого кишечника [21].

Передача вірусу відбувається повітряно-крапельним шляхом. Також можлива передача фекально-оральним шляхом. Наявність вірусу може підтверджуватися у зразках мокротинні, мазках з глотки, калі. Повідомлялося також про вертикальну передачу вірусу. Середній інкубаційний період для SARS-CoV-2 становить 5,2 дні, а більшість пацієнтів мають інкубаційний період тривалістю від 11,5 до 15,5 днів, тому, рекомендований карантин тривалістю 14 днів [1,15].

Проникнення вірусу до легневих, мязевих, ендотеліальних клітин судин призводить до появи запалення, що включає в себе набряк, дегенерацію, некротичні зміни. Ці запальні процеси є наслідком продукції прозапальних цитокінів, включаючи інтерлейкін-6, інтерлейкін-10, фактор некрозу пухлин, MAP (monocyte chemoattractant protein-1), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (granulocyte colony stimulating factor), MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1 alpha) [1].

Збільшення продукції цих цитокінів призводить до патогенезу легеневого запалення, пошкодження м'язів шляхом гіпоксії, збільшення пошкодження клітин міокарду, а також змін на рівні роботи кишечника [1].

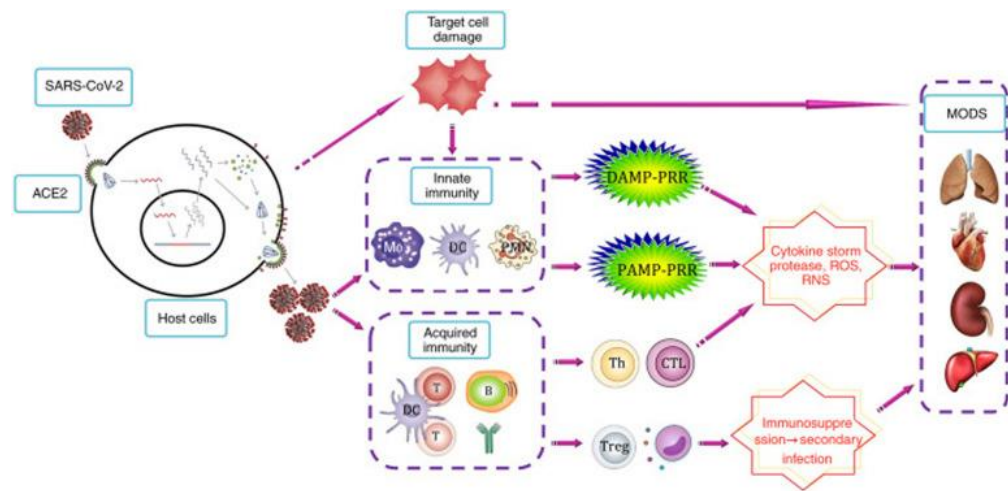


Рис.1.2. Роль імунної системи у пошкодженні органів і тканин організму [3].

Внаслідок зараження легеневиx клітин збільшується кількість вірусних частинок, що розпізнаються клітинними вродженої імунної системи за участі PAMP рецепторів. Це імунне розпізнавання призводить до генерації величезної кількості цитокінів, активних форм кисню, активних форм нітрогену, що можуть пошкоджувати власні клітини організму і призводити до аутоксичності [3,4].

Окрім цього, дослідження показують, що інфіковані вірусом епітеліальні клітини продукують інтерлейкін-8, та інтерлейкін-6. Відомо, що інтерлейкін-8 сильний хемоатрактант для нейтрофілів та Т-клітин. Внаслідок залучення великою кількістю нейтрофілів формуються інфільтрати, утворені скупченням великої кількості імунних клітин, зокрема нейтрофілів та цитотоксичних Т-клітин. Відомо, що цитотоксичні Т-клітини вбивають вірус, але можуть також і викликати пошкодження легеневої тканини [2].

Для COVID-19 характерна поява цитокінового шторму, що проявляється у 10-20% пацієнтів. Власне, термін цитокіновий шторм вказує на порушення експресії прозапальних цитокінів. Цитокіновий шторм негативно впливає на життєдіяльність власних клітин організму. При цитокіновому шторму збільшується секреція таких цитокінів як інтерлейкін - 6, GM-CSF,

інтерлейкіну-2, інтерлейкіну-7, фактору некрозу пухлин альфа, причому важкість захворювання напряду корелює із вмістом цих цитокінів [8,12].

Інфікування SARS-CoV-2 також може призводити до гіпоксемії. Це явище є наслідком аккумуляції активних форм киню, змін внутрішньоклітинного рН, аккумуляції молочної кислоти, змін балансу електролітів [1].

Симптоми SARS-COV-2 сильно варіюють між мінімальною симптоматикою та значною дихальною недостатністю, з поліорганною недостатністю. Враховуючи, що ACE2 широко експресуються на апікальній поверхні легневих епітеліальних клітин альвеол, вірус може легко проникати в порожнини альвеоли і руйнувати їх.

Цікаво, що серед дорослих та дітей існує різна статистика щодо важкості перебігу захворювання. Взагалі, діти більш схильні до вірусних захворювань, і частіше потрапляють до лікарні. Однак, діти хворі на COVID-19 мали більш м'які симптоми, в порівнянні із дорослими. Це можна пояснити різницею в експресії ACE2 серед дітей та дорослих [2].

SARS-CoV-2 може інфікувати серцевий м'яз погіршуючи вже існуючу серцеву недостатність. Таким чином, люди, із хворобами серцево-судинної системи в анамнезі є у групі підвищеного ризику. Взагалі, для даної хвороби характерно пошкодження серця. Так, у вибірці із 29 пацієнтів, 33% мали кардіоміопатію [19].

Існують певні стадії захворювання SARS-CoV-2 проілюстровані на рисунку нижче [3]:

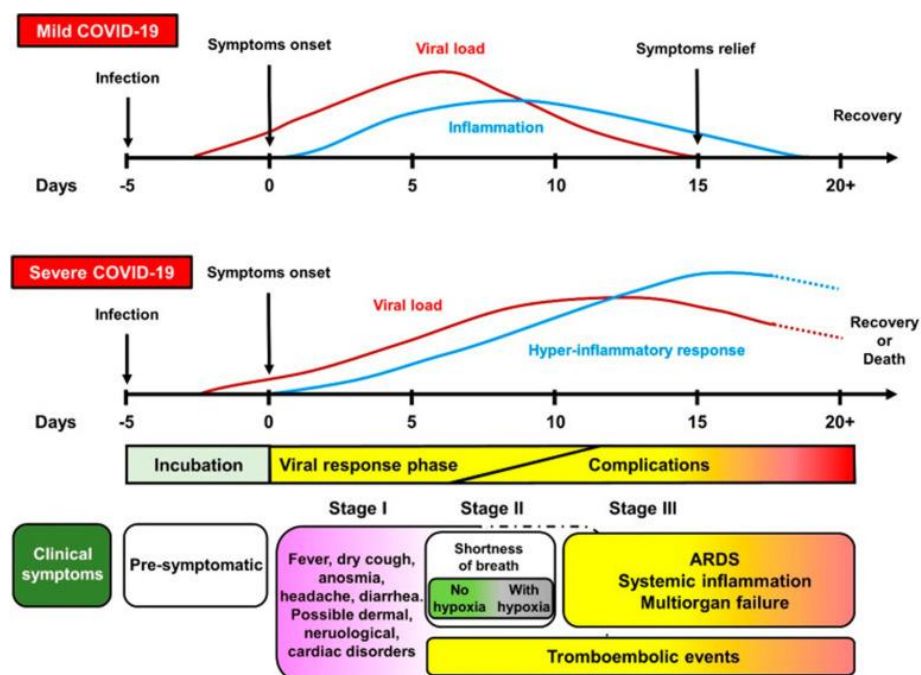


Рис.1.3. Стадії захворювання SARS-CoV-2 [3].

Інфікування SARS-CoV-2 можна поділити на три стадії. Стадія 1 – рання інфекція характеризується лихоманкою, лімфопенією, сухим кашлем, діареєю, головною біллю. Вірусне навантаження високе, причому наявна тенденція до його зростання. Стадія 2 – легенева фаза, що характеризується задишкою. Можлива поява гіпоксії. У випадку м'якого перебігу захворювання на 3 стадії вірусне навантаження зменшується, продукція прозапальних цитокінів зменшується. Ризик ускладнень, таких як тромбоемболії мінімальний. У випадку важкого перебігу захворювання, на стадії 3 вірусне навантаження трохи зменшується, однак продукція прозапальних цитокінів продовжує хростати, призводячи до розвитку тромбоемболій, а також гострого респіраторного дистресс-синдрому [3].

Цікаво, що COVID-19 призводить до змін на біохімічному рівні. Так, рівень С-реактивного білка був підвищений у 60,7% пацієнтів. Рівень прокальцитоніну у 5,5% пацієнтів, а рівень лактат дегідрогенази у 41% пацієнтів [17].

Власне, підвищення рівня С-реактивного білка асоційовано із

розвитком гострого респіраторного дистресс-синдрому, високого рівня тропоніну, пошкодження міокарда та смерті [17].

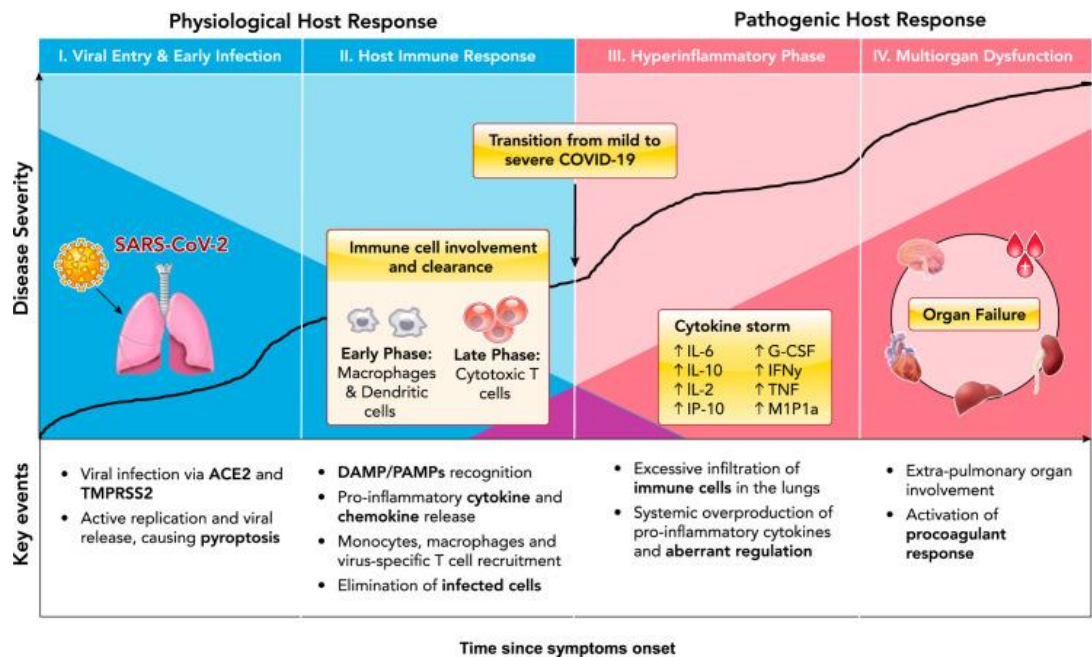


Рис.1.4. Підсумовуючий рисунок патофізіології коронавірусної інфекції [52].

Спочатку вірус потрапляє до легеневої тканини за участі ACE2 рецептора та TMPRSS2 протеази. Активна реплікація вірусу що викликає піроптоз. Далі відбувається імунне розпізнавання, за участі DAMP/PAMP, виділення прозапальних цитокінів, елімінація інфікованих клітин. На цій стадії може відбуватися перехід від більш м'якої форми коронавірусної інфекції до важкого перебігу, що характеризується цитокіновим штормом (інтерлейкін-6, інтерлейкін-10, інтерлейкін-2, інтерферон гамма, фактор некрозу пухлини альфа). Що може призводити до пошкодження органів, та запуску коагуляційні каскади.

1.2. Фізіологія системи гемостазу

Гемостаз це фізіологічний процес, метою якого є перешкодження крововтраті, у місці пошкодження судини. За нормальних умов існує тонкий баланс між прокоагулянтним і антикоагулянтним шляхом. Цей механізм забезпечує контроль кровотечі за потреби та припинення активації прокоагулянтного шляху поза місцем пошкодження/або без будь-якої кровотечі. Коли ця рівновага порушується за будь-яких умов, це може призвести до ускладнень тромбозу/кровотечі. Гемостатична система також сприяє загоєнню ран [53].

Власне, крововтрата зупиняється шляхом формування згустку крові, що механічно перешкоджає витоку крові із судини. Існує два типи гемостазу Первинний гемостаз, та вторинний. Первинний гемостаз – це агрегація тромбоцитів, та формування тромбоцитарного згустку. Вторинний гемостаз це відкладення нерозчинного білка фібрину [5,8].

Вторинний гемостаз і первинний пов'язані між собою. Так, нерозчинний фібрин зв'язується із тромбоцитарним згустком, стабілізуючи його.

Тромбоцити – малі без'ядерні клітинні фрагменти, що у нормі присутні у кількості від 150 до 400 мільйонів на мілілітр крові, та циркулюють протягом десяти днів. В здоровій судині, при нормальних умовах, тромбоцити не адгезуються до поверхонь судин, або між собою. При пошкодженні судини, тромбоцити адгезуються до субендотеліального матриксу, та між собою [5].

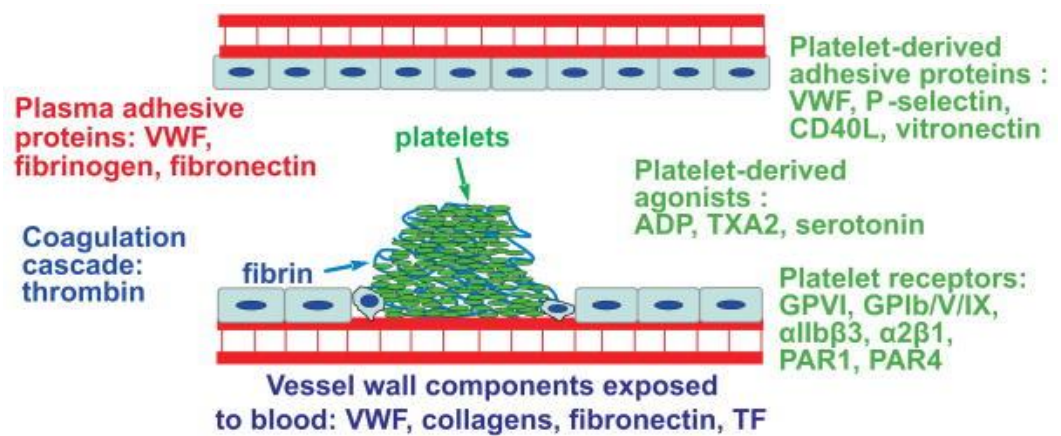


Рис.1.5. Рецептори, фактори, що залучені у адгезію тромбоцитів, та стабілізацію тромбоцитарного згустку фібрином [5]

Тромбоцити експресують величезну кількість рецепторів, що зв'язують колаген присутній у субендотеліальному матриксу, а також певні білки ендотеліальних клітин. Так, тромбоцити експресують GPVI, GPIb/GPV, GPX, α IIb β 3, PAR1, PAR4 [5,7].

Рецептор GPIb-IX-V зв'язує іммобілізований фактор фон Віллебранда, що являє собою мультимерний протеїн, що секритується ендотеліальними клітинами та мегакаріоцитами. Фактор фон Віллебранда завжди присутній у крові у розчинній формі, а також в іммобілізованій формі на субендотеліальному матриксу, таким чином, цей рецептор активно іммобілізує тромбоцити на колагені субендотеліального матриксу. Розчинний фактор Вон Віллебранда не зв'язується високоактивно із GPIb-IX-V [5,7].

Рецептор GPVI активно зв'язує колаген субендотеліального матриксу, таким чином фіксуючи тромбоцити на колагені, що стає доступним для зв'язування при пошкодженні судин [5].

Формування фібринового згустку залежить від дії тромбіну, що розщеплює фібриноген, вивільняючи А, В фібринопептиди, що формують мономери фібрину, здатні до полімеризації. Окрім цього, тромбін активує фактор FXIII (фактор тринадцятий), що зв'язується із фібрином, стабілізуючи фібриновий згусток. Власне, тромбін утворюється із протромбіну, за участі

FXa (фактор 10a) [13].

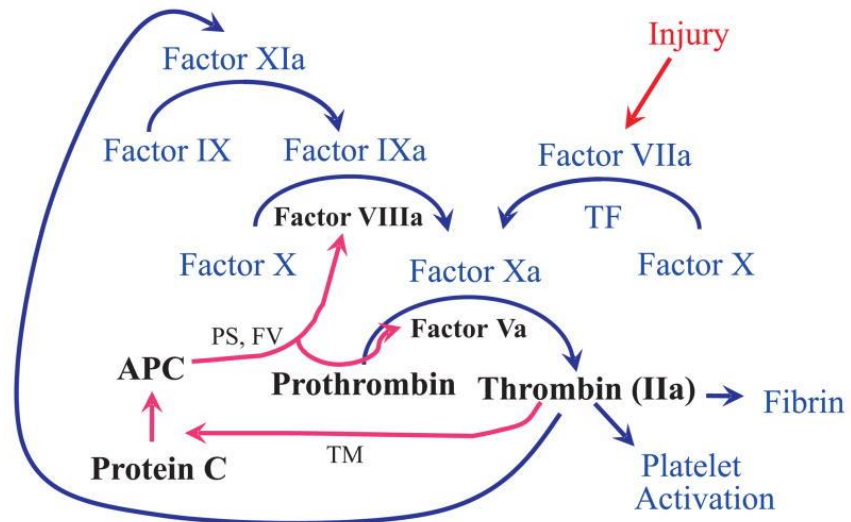


Рис.1.6. Система вторинного гемостазу [5].

Пошкодження судини активує фактор VIIa, що у свою чергу активує фактор X. Фактор X активує фактор Xa. Фактор Xa перетворює протромбін на тромбін. Що стимулює полімеризацію фібрину та активацію тромбоцитів [5].

1.3. Вплив COVID-19 на систему гемостазу людини

SARS-CoV-2 призводить до активації ендотелію. Власне, процес активації ендотелію асоційований зі збільшенням проникності капілярів, змін гемостазу. Активованій ендотелій починає синтезувати величезну кількість факторів згортання крові. Так, ендотелій починає синтезувати тканинний фактор, фактор Вон Віллебранда [22].

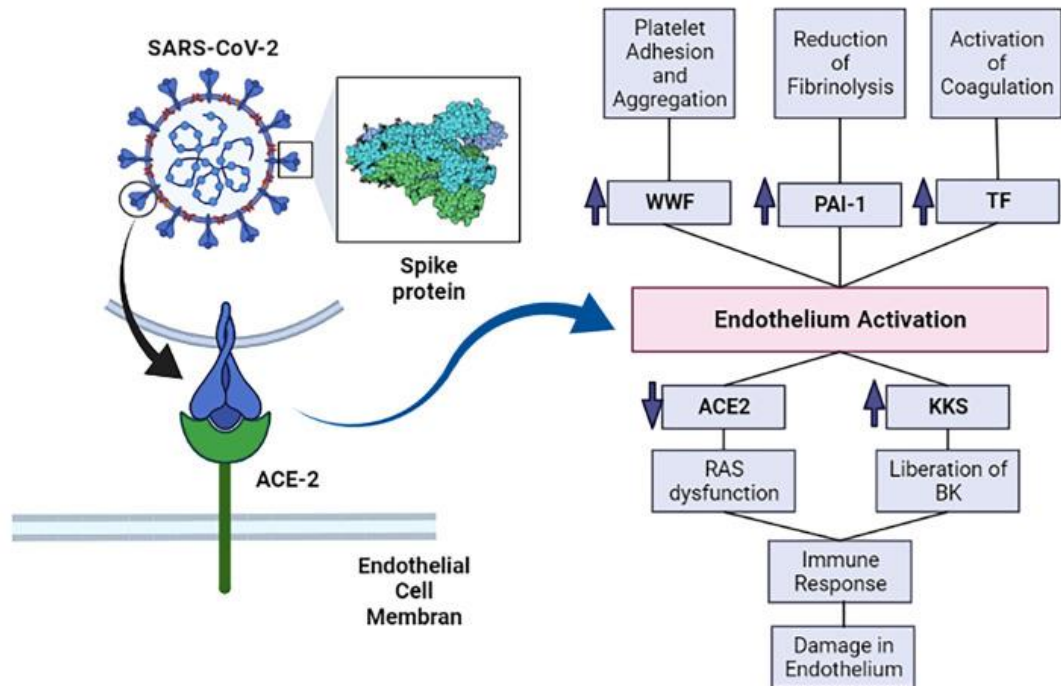


Рис.1.7. Вплив активації ендотелію на процес згортання крові [22].

Активованій ендотелій стимулює експресію PAI-1, розчинного тромбомодуліну, ангіопротейну-2, а також молекул адгезії (ICAM, VCAM-1 P-селектин). Синтезований PAI-1 інгібує процеси фібринолізу. Тканинний фактор стимулює коагуляційні каскади. Фактор фон Вілебранда стимулює адгезію тромбоцитів та їх агрегацію [22].

Не менш важливі і зміни в легеневій тканині. Відбувається активація імунних клітин і формування легневих тромбів. Ілюстрацію процесу можемо бачити на рисунку нижче [47]:

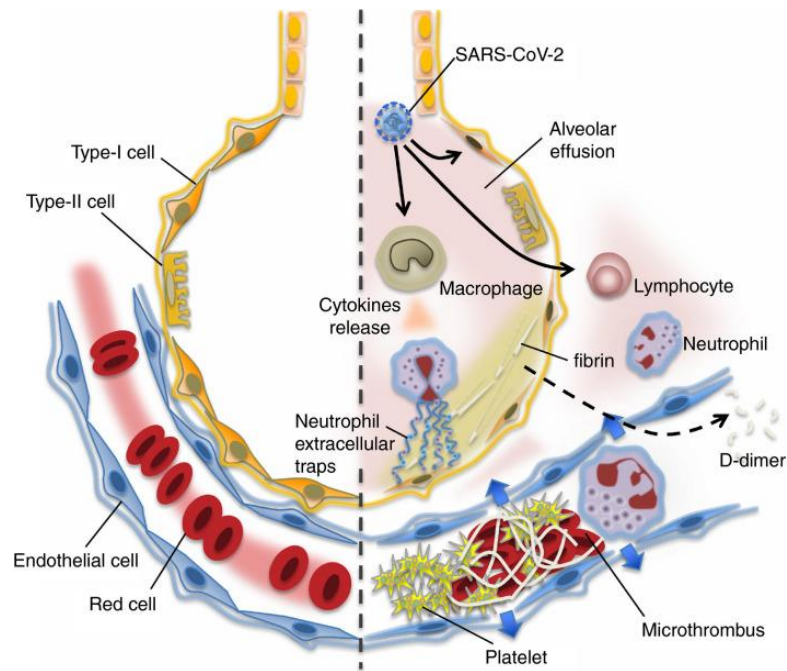


Рис. 1.8. Вплив COVID-19 на систему гемостазу легеневої тканини [47].

В непошкодженій легеневій тканині, нормальний кровотік та оксигенація проходить без проблем. При інфікуванні коронавірусною інфекцією викликає запальний процес (картинка справа). Пошкодження легеневої тканини індукується неконтрольованою активацією лімфоцитів та нейтрофілів. Збільшення продукції легневих тромбоцитів також має місце. Відбувається деградація фібрину та вихід Д-димеру у системний кровотік [47].

Власне, це є відповідю, чому рівень Д-димеру зростає при інфікуванні коронавірусною інфекцією і корелює із важкістю захворювання.

Окрім цього, SARS-CoV-2 збільшує вірогідність тромбозів, через зв'язування із ACE2 рецепторами із послідуочим зниженням їх кількості. В теорії, зменшення кількості рецепторів ACE2 може проявлятися у збільшенні концентрації прозапальних цитокінів, брадикініну, ангіотензину II, що у свою чергу може призвести до збільшення ризику розвитку тромбозів [6].

Дослідження показали, що ACE2 рецептори широко експресуються у людських легневих альвеолярних епітеліальних клітинах, при чому рівень їх

експресії зменшується при інфікуванні SARS-CoV-2, а саме при взаємодії Sбілка із епітеліальними клітинами. Окрім цього, Sбілок взаємодіє із ендотеліальними клітинами із послідуною активацією каспази, апоптозу, змін сигнальної системи за участі брадикініну та ендотеліальної дисфункції [6].

Також, інфікування SARS-CoV-2 призводить до збільшення кількості ангіотензину II [6].

Окрім цього, S-білок вірусу SARS-CoV-2 стимулює зменшення експресії ACE2 білка в легневих тканинах, призводячи до збільшення рівня ангіотензину II (оскільки ACE2 стає менше, таким чином зменшується кількість власне, ферменту), що зв'язується зі своїми рецепторами (AT-1), призводячи до вазоконстрикції, посилення запального процесу та тромбозу [13,50].

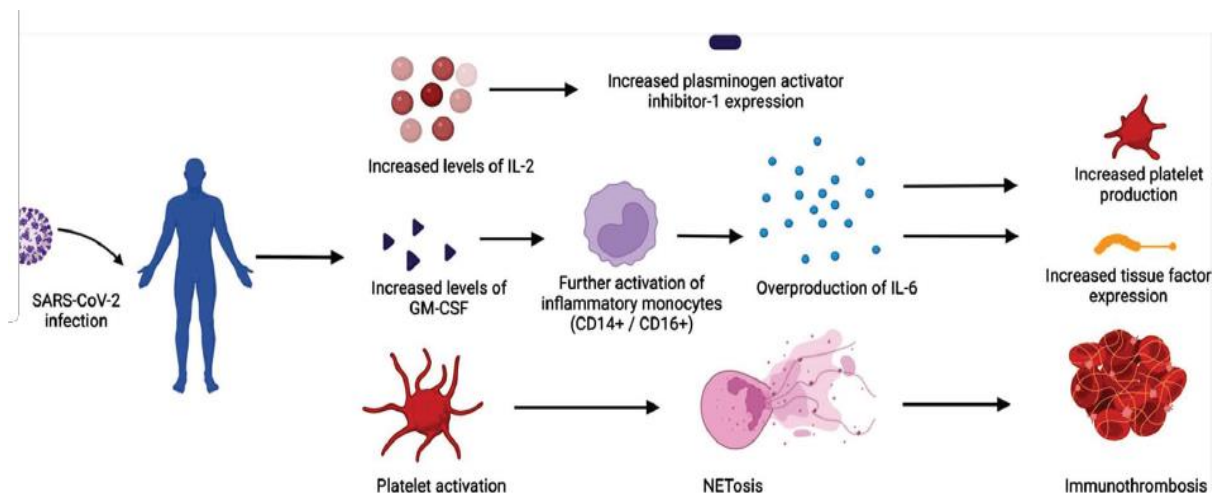


Рис.1.10. Взаємозв'язок між експресією прозапальних цитокінів та збільшенням ризику тромбозів [9].

Інфікування SARS-CoV-2 призводить до збільшення продукції інтерлейкіну 2, що у свою чергу збільшує експресію інгібітора активатора плазміногену-1 (фактор що стимулює фібриноліз). Також має місце підвищення продукції GM-CSF [9,10].

Також, збільшення продукції інтерлейкіну 6 призводить до активації

коагуляції шляхом посилення синтезу фібриногену, фактора VIII, тканинного фактора [13].

GM-CSFактивують моноцити CD14/CD16, що відповідають за продукцію інтерлейкіна – 6. Надлишкова продукція інтерлейкіну 6 призводить до активації тромбоцитів. Активовані тромбоцити стимулюють нетоз нейтрофілів, і в кінці-кінців тромбоз [9].

Збільшення продукції інтерлейкіну-1,інтерлейкіну-6 стимулює тромбоз, шляхом активації тромбоцитів, ендотеліальних моноцитів,а також фактора VIIa.Окрім цього, інтерлейкін-1,інтерлейкін-6 інгібують фібриноліз а також дію антикоагулянтів(білок C,S) [14].

Взагалі, результати досліджень показують, що існує тісний взаємозв'язок між рівнем інтерлейкіну-6 та рівнем фібриногену [14].

В іншому дослідженні було показано, що високі рівні фактору згортання крові VIII та фактору фон Віллебранда є типовими для COVID-19. Так, в одних дослідженнях високий рівень або коррелював із вираженістю COVID-19, або ні [16].

Підсумовуючи, можна навести таку схему впливу COVID-19 на систему гемостазу [18]:

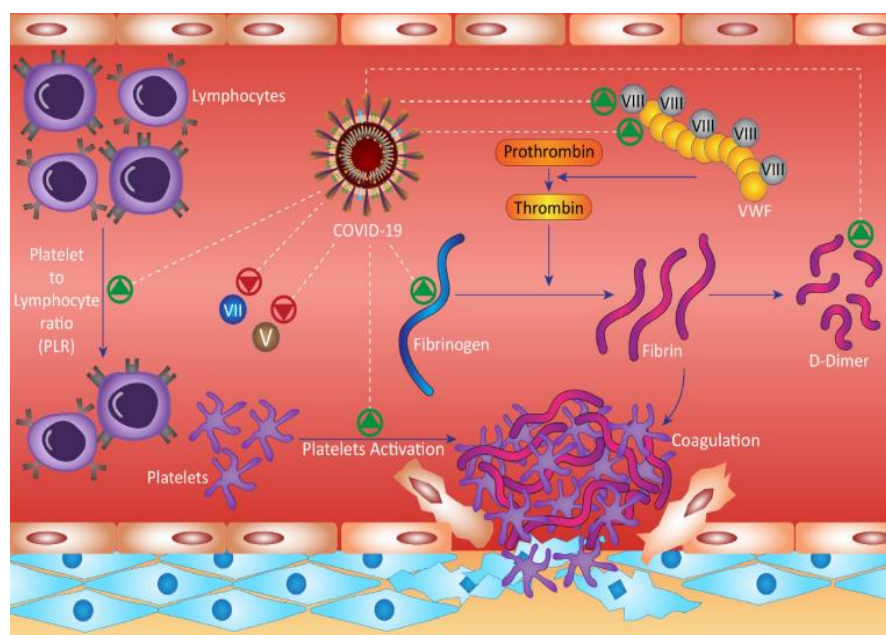


Рис.1.11. Підсумовуюча схема впливу COVID 19 на систему гемостазу [18].

COVID 19 інгібує факторизгортання крові VII, V, а також активує фактори VIII, VWF. Окрім цього, відбувається активація тромбоцитів, стимуляція полімеризації фібриногену, збільшення співвідношення тромбоцити/лімфоцити [18].

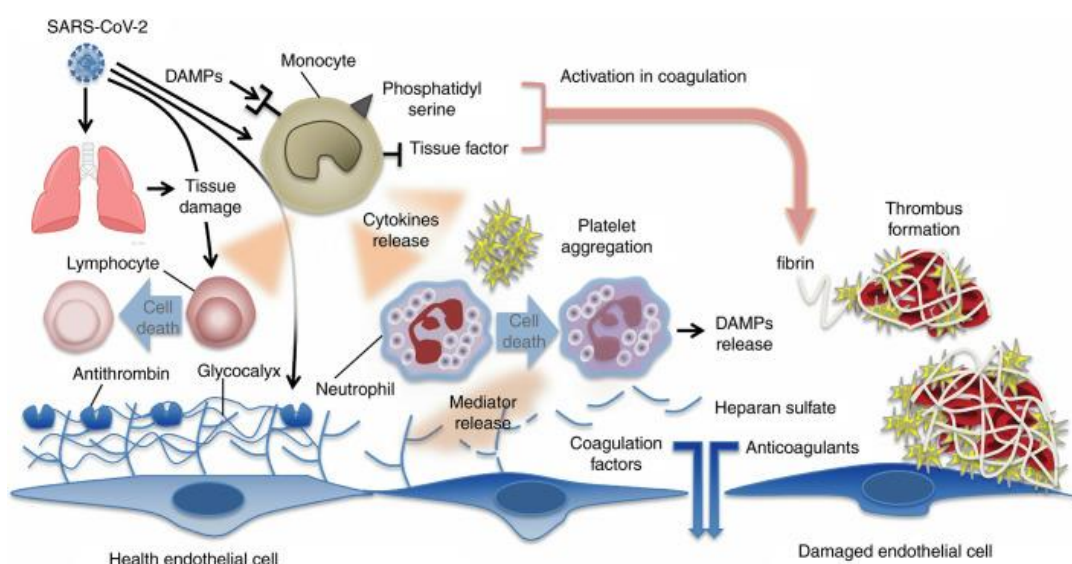


Рис.1.12. Механізм активації коагуляції при COVID-19 [47].

І вірусна частинка, а також DAMP, що вивільняються загиблими клітинами можуть активувувати моноцит. Активовані моноцити вивільняють цитокіни та хемокіни, що стимулюють нейтрофіли, лімфоцити, тромбоцити та ендотеліальні клітини. Моноцити та інші клітини експресують тканинний фактор та фосфатидилсерин на своїх мембранах і ініціюють коагуляцію. Здорові ендотеліальні клітини підтримують антитромбогенний профіль, експресуючи глікокалікс та білок антитромбін. Пошкоджені ендотеліальні судини змінюють свої властивості на прокоагулянтні шляхом пошкодження глікокаліксу та втраті антикоагулянтних білків [47].

Ендотелій відіграє важливу роль у опосередкуванні нейтрофільного запалення та мікросудинного тромбозу. Ендотеліальні клітини пригнічують коагуляцію за допомогою кількох механізмів. Вони містять кілька антикоагулянтів, таких як протеоглікани, гепарансульфат і тромбомодулін.

Крім того, вони синтезують фактор фон Віллебранда (vWF) у своїх гранулах у вигляді тілець Вейбеля-Паладе (WPB). Вони також синтезують і вивільняють оксид азоту (NO), який пригнічує активацію тромбоцитів. Ендотеліальна дисфункція переводить ендотелій судин із антикоагулянтного стану в прокоагулянтний. SARS-CoV-2 може безпосередньо інфікувати ендотеліальні клітини різних органів через рецептори ACE2 і викликати ендотеліт і його дисфункцію [49].

Аутопсія також підтвердила серйозне пошкодження ендотелію та наявність внутрішньоклітинних вірусних часток. Було показано високі рівні маркера активації ендотелію та тромбоцитів у госпіталізованих пацієнтів із COVID-19, які збільшувалися з тяжкістю захворювання [49].

1.4. Показники системи гемостазу що змінюються при COVID-19

Експерименти показали, що рівень смертності від COVID-19 позитивно корелює із такими лабораторними показниками, як: рівень D-димеру, протромбіновий час, продукти деградації фібрину [9,12].

Окрім цього, в експериментах показано, що рівень фібрину збільшується при інфікуванні COVID-19 [10].

Лабораторним показником, який є найкращим предиктором тяжкості захворювання та смертності, є рівень D-димерів у сироватці. Коли організм утворює стабільний тромб (згусток крові), що складається з фібрину та стабілізований фактором XIII, згусток згодом розщеплюється фібринолітичним ферментом плазміном з утворенням D-димерів, серед інших продуктів. Оскільки рівень D-димерів у сироватці крові пацієнта може контролювати як утворення тромбу, так і фібриноліз, підвищені рівні D-димеру вказують на наявність надмірного утворення та розпаду тромбу. Майже в кожного пацієнта, госпіталізованого з COVID-19, виявлення підвищених рівнів D-димеру відображає гіперкоагуляцію та помітне підвищення фібринолізу [48].

Деякі дослідження показали позитивну кореляцію між рівнем D-димеру та важкістю перебігу COVID-19 [11].

Пацієнти з рівнем D-димеру більше за 1000 нг/мл мають в 20 разів підвищений ризик в порівнянні з тими, що мають нижчий рівень D-димеру. Таким чином, D-димер являє собою скринінговий тест на венозний тромбоемболізм [11].

Окрім цього, збільшення рівня нейтрофілів, а також зменшення рівня лімфоцитів асоційовано з більшою смертністю від COVID-19 [12].

Було показано, що коагуляційні тести, такі як активований тромбoplastиновий час (aPTT) і протромбіновий час (PT) мають тенденцію до підвищення у пацієнтів із симптомами COVID-19, ніж у здорових людей [13].

Більше того, деякі дослідження показують, що aPTT, і ще більше PT вищі у пацієнтів що загинули від COVID-19, аніж у пацієнтів, що мали менш виражений перебіг захворювання [13].

Окрім цього, в іншому джерелі, був проведений аналіз у 1099 пацієнтів і було повідомлено, що рівень D-димеру понад 0,5 мг/л спостерігався у 260/560 (46,4%) випадків. У 43% пацієнтів із нетяжким перебігом захворювання

спостерігався підвищений D-димер, тоді як у пацієнтів у відділеннях інтенсивної терапії (ВІТ) частота становила приблизно 60%. Окрім цього, також було показано, що у тих, хто не вижив, був значно вищий рівень D-димеру та довший РТ та аРТТ порівняно з тими, хто вижив, під час госпіталізації [47].

Ці результати свідчать про те, що коагулопатія може розвинути у важкохворих пацієнтів із COVID-19, що мають подовжений час аРТТ, та підвищений рівень D-димеру. Таким чином, моніторинг D-димеру та РТ буде корисним для моніторингу та лікування пацієнтів [47].

Хоча тромбоцитопенія вважається найбільш чутливим показником коагулопатії, частота тромбоцитопенії при COVID-19 відносно низька. При госпіталізації тромбоцитопенія $<150 \times 10^9/\text{л}$ була відзначена у 36,2% усіх пацієнтів та у 57,7% з тяжкохворих пацієнтів [47].

Такий маркер, як фібриноген також був ретельно оцінений щодо його користі для прогнозування тяжкості захворювання COVID-19. Рівень фібриногену помітно підвищений у важкохворих пацієнтів із COVID-19 і корелює з вищою смертністю через його здатність сприяти згортанню. Наприклад, дослідження показують, що 90% пацієнтів із середньою та критичною формою COVID-19 мали рівень фібриногену вище референтного діапазону. Завдяки цим висновкам рівні D-димеру та фібриногену часто контролюються разом, щоб сформувати картину коагуляційного статусу пацієнта [48].

Цитокін інтерлейкін-6 є важливим учасником коагуляції, оскільки він знижує рівень інгібіторів згортання білка С, протеїну S і антитромбіну (АТ), а також є ключовим патогенним цитокіном, який бере участь у стимулюванні цитокінового шторму. Застосування інгібіторів інтерлейкіну-6 як частини раннього режиму лікування COVID-19, було запропоновано для боротьби зі значно підвищеними рівнями цитокіну. Спостереження показали, що рівні інтерлейкіну-6 були вищими за контрольний діапазон як у тих, хто пережив COVID-19, так і в тих, хто не пережив, але рівні у тих, хто не пережив, були

вважаюче вищими, ніж у тих, хто вижив [48].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ТА МЕТОДИКИ

2.1. Контингент та схема дослідження

Дослідження проводилося під час проходження виробничої (клініко-діагностичної практики на базі клініко-діагностичної лабораторії комунального підприємства «Волинська обласна клінічна лікарня» Волинської обласної ради у період з 3 липня 2023 року до 22 липня 2023 року.

У дослідженні взяли участь пацієнти у котрі перехворіли на COVID-19.

Було сформовано вибірку із 100 пацієнтів, яким було проведено визначення основних гематологічних показників: рівень фібриногену, ПТІ, час АЧТЧ, кількість тромбоцитів, рівень Д-димеру, МНВ.

Всі були ознайомлені з метою дослідження і дали добровільну згоду на участь у ньому.

Діагноз пацієнтів був поставлений сімейним лікарем, а за необхідності підтверджений профільним спеціалістом.

Набір клінічного матеріалу для дослідження проводили на базі комунального підприємства «Волинська обласна клінічна лікарня» Волинської обласної ради упродовж періоду проходження практики (з 3 липня 2023 року по 22 липня 2023 року). При виконанні дослідження керувалися загальними положеннями про порядок проведення дослідження за участі людини, а саме Гельсінської декларації щодо «Рекомендацій для лікарів з проведенням біомедичних досліджень людини» (1964), Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень (1964-2000рр.), Конвенції Ради Європи про права людини та біо-медицину (від 04.04.1997р.), та наказу МОЗ України номер 690 від 23.09.2009 р., про наявність інформованої згоди пацієнта про участь у досліджах.

2.2. Визначення вмісту фібриногену у зразках крові методом Клаусса

Фібриноген — ключовий білок, що міститься в плазмі і синтезується печінкою. Він відіграє важливу роль у гемостазі та утворенні тромбів. Фібриноген також є класичним гострофазовим реактивним білком, що підвищується у відповідь на запалення та пошкодження тканин. Нормальна концентрація фібринугену, що згортається, становить приблизно 150–400 мг/дл. Низькі концентрації фібринугену можуть бути пов'язані з вродженими патологіями, захворюваннями печінки, крововиливами, тоді як вищий рівень може спостерігатися при таких станах, як вагітність, запалення, серцево-судинні захворювання і рак. Останнім часом оцінка рівня фібринугену стала ще більш важливою у зв'язку зі зростанням пандемії коронавірусу. Підвищення рівня фібринугену може свідчити про коагулопатію, яка спостерігається у підгрупи пацієнтів із коронавірусною хворобою-2019 (COVID-19) [45].

Найбільш часто використовуваним методом визначення концентрації фібринугену є метод Клаусса. Принцип цього методу заснований на утворенні тромбу, вимірюваному механічним або фотооптичним способом. Плазма піддається впливу реагенту, що містить супрафізіологічні концентрації тромбіну, і час до виявлення згустку порівнюється зі стандартною кривою, побудованою з еталонною плазмою [45].

Визначення концентрації фібринугену визначали методом Клаусса. Для цього вносили високу концентрацію тромбіну (100 од/мл), і фіксували час формування згустку. Для визначення концентрації фібринугену за часом формування згустку робили калібрувальну криву, із відомими нам концентраціями фібринугену [23,24].

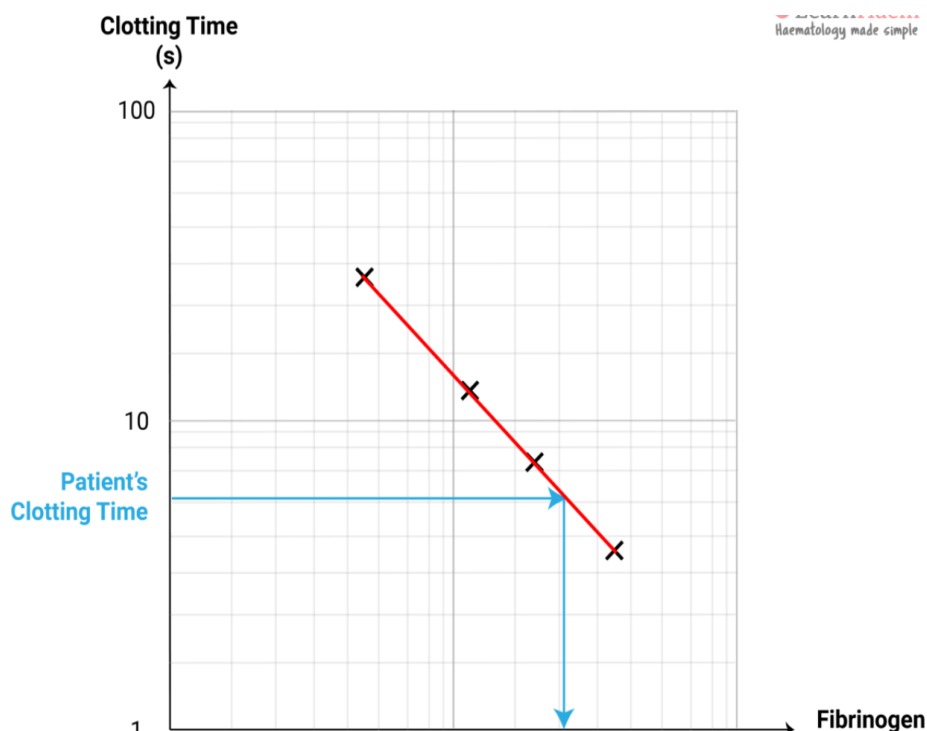


Рис. 2.1. Приклад калібрувального графіку за методом Клаусса [23].

Прокалібрувавши графік серією розведень, ми можемо за часом, що пішов на формування згустку, визначити концентрацію фібриногену [23,24].

Кров розчиняли у цитраті натрія у співвідношенні (9:1), при чому концентрація натрія цитрата становила 3,2%. Далі кров центрифугували при 2500 оборотах протягом 15 хвилин [25].

Після чого робили серію розведень. Нагрівали 200 мкл розведеної плазми до 37°C протягом 2 хвилин. Додавали 100 мкл тромбіну для визначення часу утворення згустку [25].

2.3. Визначення рівня Д-димеру у зразках крові пацієнтів методом ELISA

Рівень Д-димеру визначали методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Власне, метод ELISA використовується для визначення і оцінки кількості певної сполуки, зазвичай антигену(хоча й необов'язково) у зразку.

Імуноферментний аналіз (ELISA) — це комплекс методик ІФА, які використовуються в клінічних аналізах. У цьому типі аналізу один із компонентів реакції неспецифічно адсорбується або ковалентно зв'язується з поверхнею твердої фази, такої як лунка мікротитратора, магнітна частинка або пластикова кулька. Це приєднання полегшує розділення зв'язаних і вільно мічених реагентів [43].

У найбільш поширеному підході до використання методу ELISA аліквоту зразка або калібратора, що містить антиген (Ag), який потрібно кількісно визначити, додають і дають зв'язатися з твердофазним антитілом (Ab) [43].

Молекули з дуже низькою концентрацією, такі як пептиди/білки, гормони, вітаміни та ліки, мають високий рівень специфічності по відношенню до антитіл або антигенів, розроблених для них. Це пов'язано з тим, що антитілу майже неможливо зв'язатися з молекулою, відмінною від його власного антигену. Таким чином, цей метод може бути використаний для вимірювання навіть речовин у дуже низьких концентраціях з майже будь-яким ризиком інтерференції. Іншими словами, коли у нас є антиген, який, як ми знаємо, що є специфічним для певної речовини, ми можемо визначити тип і кількість його антитіла, а коли у нас є антитіло, ми можемо дізнатися його специфічний антиген і кількість антигену, використовуючи цей метод [44]

Дві різні дослідницькі групи одночасно винайшли прямий ELISA; вчені Енгвалл і Перлман, а також вчені Ван Вімен і Шурс. ІФА був розроблений шляхом модифікації радіоімунологічного аналізу (RIA). Це було зроблено шляхом кон'югації мічених антигенів і антитіл з ферментами, а не з радіоактивним йодом ¹²⁵. Новий метод вперше був використаний для

визначення рівня IgG у сироватці крові кролика. У тому ж році вчені визначили кількість хоріонічного гонадотропіну людини в сечі за допомогою пероксидази хрому. З тих пір метод ELISA використовувався в багатьох різних сферах і став рутинним лабораторним дослідженням і діагностичним методом у всьому світі [43].

Перша методологія ELISA включала хромогенні молекули та субстрати для генерації помітної зміни кольору, яка контролює присутність антигену [43].

Антиген, який використовується в методі ELISA, зв'язується з твердою фазою. В якості твердої фази використовуються пробірки та мікропланшети з жорсткого полістиролу, полівінілу та поліпропілену. Використовувані мікропланшети повинні бути здатні належним чином адсорбувати антиген і антитіло, але не адсорбувати компоненти в інших фазах.

Ферменти, які можна використовувати в ELISA, включають бета-галактозидазу, глюкозооксидазу, пероксидазу та лужну фосфатазу. Лужна фосфатаза може зберігатися при 4°C разом із кон'югатом азиду натрію. Лужна фосфатаза і Р-нітрофенілфосфат використовуються як субстрати, доступні в безпечних таблетованих формах і дають жовте забарвлення при позитивних реакціях. Для пероксидазного кон'югату 5-аміносаліцилова кислота та ортофенілєндіамін використовуються як субстрати, а утворення коричневого забарвлення вважається позитивною реакцією [44].

У зразок, що містить антиген, вноситься мічене ферментом антитіло, продукт реакції якого можна кількісно визначити [26].

Figure 1. Direct ELISA protocol.

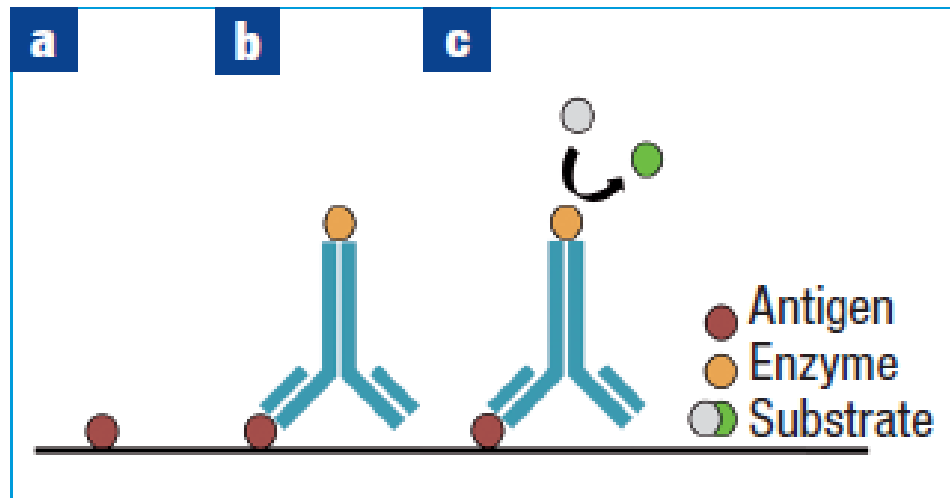


Рис. 2.2. Принцип роботи ELISA [26].

На рисунку можемо бачити принцип роботи прямого варіанту ELISA. Синім позначене антитіло, червоним-антиген, біло-зеленим-субстрат.

Існує також непрямий варіант ELISA. Деталі на рисунку нижче:

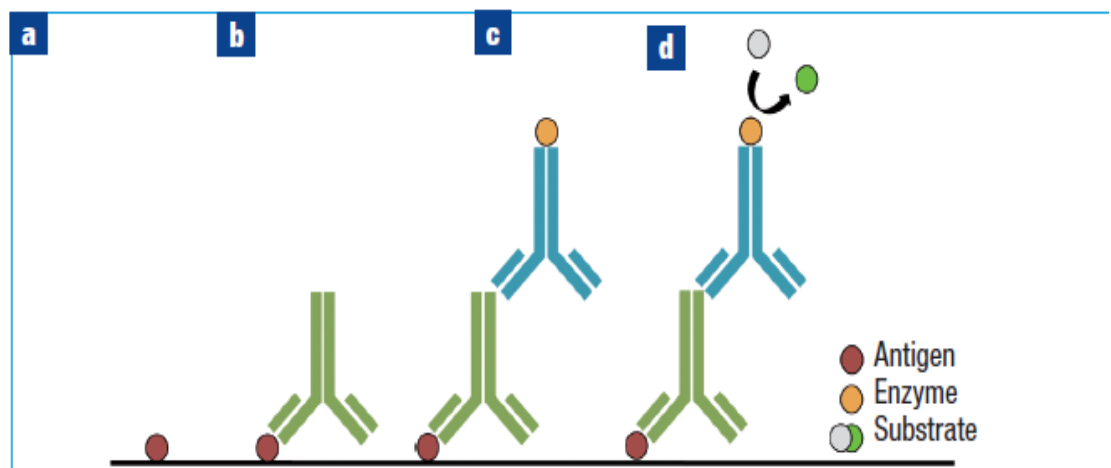


Рис. 2.3. Непрямий варіант ELISA [26].

При непрямому варіанту ELISA антиген зв'язується з первинним антитілом. Первинне антитіло зв'язується із вторинним антитілом. А вторинне

антитіло мічене ферментом [26].

Рівень Д-димеру визначали за цим протоколом [27].

Усі матеріали, що використовувалися в реакції, наведені в цій таблиці [27]:

Item	Quantity	Storage Condition
Human D-Dimer Capture Antibody 10X	600 μ L	+4°C
Human D-Dimer Detector Antibody 10X	600 μ L	+4°C
Human D-Dimer Lyophilized Native Protein	2 Vials	+4°C
Antibody Diluent 4BI	6 mL	+4°C
Sample Diluent NS	50 mL	+4°C
Wash Buffer PT 10X	20 mL	+4°C
TMB Development Solution	12 mL	+4°C
Stop Solution	12 mL	+4°C
SimpleStep Pre-Coated 96-Well Microplate	96 Wells	+4°C
Plate Seal	1	+4°C

Рис.2.4. Матеріали, що брали участь у реакції [27].

Використовували два антитіла, зв'язуюче антитіло(з антигеном), та детектуюче (що зв'язувало фермент). Окрім цього, використовували буфер PT(20мл) 10x. Розчин для зупинки реакції (12мл). Розчинник для антитіл(6мл). Мікропланшет на 96 лунок [27].

Готували буферний розчин для промивання PT, шляхом розчинення буферу 10X в деіонізованій воді (45мл). Готували “коктейль” антитіл, шляхом змішування 300 мкл 10x зв'язуючого анитіла і 300 мкл 10x детектуючого антитіла, а також розчинника для антитіла 4BI [27].

Готували стоковий розчин, шляхом змігування 500мкл розчинника для зразків (Sample diluent NS - 50 ml). Цей стоковий розчин має концентрацію 1600 нг/мл [27].

Вносимо 325 мкл розчинну для зразків у пробірку під номером 1, та 150 мл розчину для зразків у пробірки під номерами 2-8.

Відбираємо зразки плазми, розчиняємо в цитратному буфері, центрифугуємо при 2000 оборотах протягом 10 хвилин. Розводимо зразки плазми у 10 разів [27].

Вносимо 50 мкл зразків у відповідні центрифужні пробірки. Далі вносимо 50 мкл коктейля антитіл. Інкубуємо протягом одної години за кімнатної температури. Промиваємо кожну пробірку 350 мкл буфером РТ. Вносимо 100 мкл розчину ТМВ, та інкубуємо протягом 10 хвилин. Вносимо розчин для зупинки реакції. Визначаємо кількість Д-димеру спектрофотометрично [27].

2.3. Визначення рівня тромбоцитів референсним методом.

Рівень тромбоцитів оцінювали референсним методом. Для цього, зразок крові з ЕДТА-антикоагулянтном попередньо розводили в стерильному буферному розчині. Потім тромбоцити фарбували специфічними флуоресцентними антитілами. Після чого, пофарбовані тромбоцити в розчині розводили до концентрації, при якій можливий їх підрахунок. Кількість тромбоцитів і еритроцитів підраховувалиють на проточному цитометрі із певними пороговими значення, для дифференціації еритроцитів від тромбоцитів на основі амплітуди флуоресценції та амплітуди розсіювання. Визначали співвідношення еритроцити/тромбоцити, а кількість тромбоцитів розраховується на основі точного підрахунку еритроцитів у зразку [45].

Зразки свіжої венозної крові збирали у пацієнтів шприцом або вакуумованим контейнером, після чого вносили антикоагулянт ЕДТА у форма двокалієвої солі або трикалієвої солі солі, від 3,7 до 5,4 мкмоль/мл крові (K₂EDTA, безводний¹, 4-2,0 мг/мл. Контейнери повинні мати достатню кількість повітря для належного змішування. Зразок повинен бути відбракованим, якщо є візуальний гемоліз або наявність мікрозгустків. Зразки зберігали при кімнатній температурі (18-22°C) Щоб забезпечити однорідний

розподіл еритроцитів і тромбоцитів, ретельно перемішували зразок перед попереднім розведенням і маркуванням антитілами [45].

Для підрахунку тромбоцитів і еритроцитів використовувався цитометр з гідродинамічним фокусуванням і можливістю використання вимірювання прямого розсіювання світла та флуоресценції [45].

Прилад повинен мати достатню чутливість до розсіяних і флуоресцентних променів [45].

Для підрахунку еритроцитів цільної крові використовувався одноканальний лічильник частинок з апертурним опором [45].

Інструмент повинен мати діаметр отвору від 80 до 100 мкм і довжиною від 70% до 100% діаметра [45].

За даними проточної цитометрії визначали співвідношення еритроцитів та тромбоцитів -R, принаймні з 3 знаками після коми, використовуючи наступну формулу:

$$R = \text{кількість еритроцитів} / \text{кількість тромбоцитів}$$

Розділяли кількість еритроцитів, визначену в оригінальному зразку, на це співвідношення, R, щоб отримати кількість тромбоцитів.

Наприклад: кількість еритроцитів, $5,44 \cdot 10^6/\text{мкл}$ ($5,44 \cdot 10^{12}/\text{л}$); $R = 20,4896$ [45].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЙОГО ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Рівень Д-димеру у хворих на COVID-19 пацієнтів

Д-димер – це складна білкова молекула, яка утворюється під час опосередкованої плазміном поперечно-зшитого деградації фібрину. Для утворення Д-димеру, тромбін розщеплює фібриноген до фібрину, розчинного глікопротеїну, який міститься в плазмі. Молекули тромбіну залишаються зв'язаними з молекулами фібрину під час їх полімеризації. У цей момент тромбін одночасно активує зв'язаний з фібриногеном плазмовий фактор XIII. Комплекс молекул тромбіну, фактора XIII плазми та полімерів фібрину разом запускає утворення фактора XIIIa. Плазмовий фактор XIIIa бере участь у зшиванні молекул фібрину. На наступному етапі плазміноген взаємодіє з молекулами фібрину, що призводить до утворення плазміну [31].

Утворені молекули плазміну, у свою чергу, зв'язуються з молекулами фібрину та забезпечують розпад зв'язаного фібрину на різні білки з різною молекулярною масою, широко відомі як продукти розпаду фібриногену (FDP). Плазмін також опосередковує кінцеву деградацію поперечно-зшитих молекул фібрину на розчинні фрагменти, які містять такі фрагменти як DDE. Простіше кажучи, фрагмент DDE — це молекула D-димера, яка нековалентно зв'язана з фрагментом E. Молекула плазміну далі розщеплює фрагмент DDE на фрагменти DD і E. D-димер (фрагмент DD + фрагмент E) є розчинним комплексом і циркулює в плазмі, поки не буде елімінований ретикулоендотеліальним і нирковим шляхами [31].

Проаналізувавши результати замірів Д димеру у хворих на COVID-19 пацієнтів, отримали наступні результати:

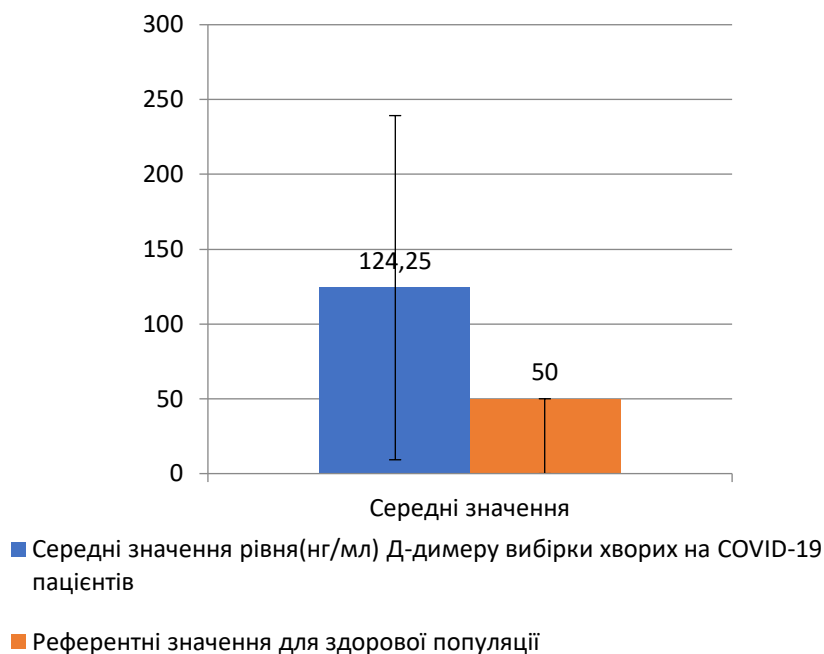


Рис.3.1. Рівень Д-димеру у хворих на COVID-19 пацієнтів.

Нами було отримані сильно варіабельні значення стандартного відхилення, тобто рівень Д-димеру приймав значення від 0 до 543. Таким чином, Д-димер дуже варіабельна ознака, що може вказувати на важкість перебігу захворювання.

Взагалі, рівень Д-димеру корелює зі смертністю від COVID-19. Таким чином, таке варіювання рівня Д-димеру у вибірці може вказувати на наявність пацієнтів із легким перебігом захворювання, середньо та важкохворих пацієнтів.

По суті, Д-димер- це білок,що утворюється при деградації фібрину, таким чином його поява пов'язана із процесами коагуляції. Враховуючи, що COVID-19 впливає на систему коагуляції, інгібує фібриноліз, стимулює ендотеліальну активацію, то його підвищення може бути індикатором важкості перебігу COVID-19 [30].

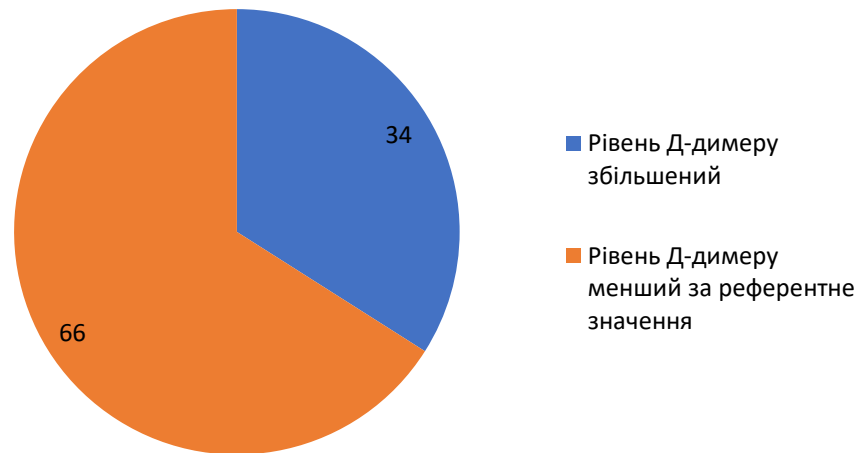


Рис.3.2. Кількість пацієнтів із підвищеним рівнем Д-димеру

Дані узгоджуються із літературними джерелами, показавшими, що у вибірці із 235 пацієнтів, рівень Д-димеру був підвищений у 175 (74,66%) [28]. В нашому випадку, рівень Д димеру був підвищений у 66% пацієнтів, що доволі близько до результатів досліджень, наведених у експериментах [28].

3.2. Зміна кількості розчинних фібрин-мономерних комплексів у хворих на COVID-19 пацієнтів

Розчинні фібринові мономери-це фібриногенові маркери, що продукуються при розщепленні фібриногену. Присутність розчинних фібринових маркерів показує що тромбін перетворив фібриноген у фібрин. Фібринові мономери мають тенденцію до полімеризації. Фібринові мономери присутні у низьких концентраціях. Коли тромбін активує фактор XIII і з'єднує фібринові мономери у полімери, частина фібринових мономерів не включаються в склад тромбоцитарного згустку а циркулюють в плазмі крові [32].



Рис.3.3. Зміна рівня фібрин-мономерних комплексів у хворих на COVID-19 пацієнтів.

Збільшення рівня SFMC (soluble fibrin monomeric complexes – розчинні фібрин-мономерні комплекси) може вказувати на більш високий ризик тромбозів, і відповідно більший важкий перебіг захворювання, із появою ускладнень. Взаємозв'язок між підвищенням рівня розчинних фібрин-мономерних комплексів і ризиком тромбозів описаний у літературі [33].

Окрім цього, в літературі описані дані, щодо збільшення рівня розчинних фібрин-мономерних комплексів в період активної фази (між 5 та 8 днем) та поступовим зменшенням рівня розчинних фібрин-мономерних комплексів на 10-12 дні [33].

Наші пацієнти мали значення, що не перевищують 8,0, що можливо вказувало на ранній COVID-19, тобто на початковій стадії захворювання.

Оскільки при своїй інвазії, COVID-19 стимулює розщеплення фібриногену, підвищення рівня SFMC може корелювати із важкістю перебігу захворювання.

Збільшення вірусного навантаження, буде призводити до відповідного збільшення рівня розчинних фібрин-мономерних комплексів, роблячи його

свого роду маркером вираженості вірусного процесу.

3.3. Зміна рівня тромбоцитів у хворих на COVID-19 пацієнтів

Тромбоцити – без'ядерні кров'яні пластинки, що походять від мегакаріоцитів. Тромбоцити підтримують гемостаз, прилипаючи до ендотелію судин, агрегуючи з іншими тромбоцитами та ініціюючи каскад коагуляції, що призводить до утворення фібринової сітки, яка ефективно запобігає значній втраті крові. Тромбоцити також мають вирішальне значення для запалення, росту тканин та імунної відповіді. Ці процеси відбуваються під посередництвом вивільнення сполук з альфа- і щільних гранул, до складу яких входять численні фактори росту, а також IgG і компоненти системи комплементу [37].



Рис.3.4. Кількість тромбоцитів у хворих на COVID-19 пацієнтів

Частина пацієнтів (9) мала тромбоцитопенію, частина (12) – збільшену кількість тромбоцитів. 79 пацієнтів мали нормальний рівень тромбоцитів.

Згідно даних досліджень, пацієнти з нижчим рівнем тромбоцитів були

старшого віку, при чому це явище було характерне для чоловічої статі. Окрім цього, пацієнти із тромбоцитопенією частіше мають супутні захворювання, включаючи хронічну хворобу нирок, ІХС та серцеву недостатність. Критичні захворювання та смертність від усіх причин були підвищені у пацієнтів з тромбоцитопенією [34].

Цікаво, що рівень тромбоцитів слабо корелює з важкістю перебігу захворювання. Так, згідно експериментальних досліджень, середній показник тромбоцитів виживших від COVID-19 пацієнтів становив $220,1 \pm 81,4$, а у померлих – $206,4 \pm 87,7$. Цікаво, що ці дані не мають сильного розкиду даних. Стандартне відхилення майже не відрізняється, що вказує на однорідність вибірки і більшу статистичну цінність [35].

Однак, зниження рівня тромбоцитів все ж є небезпечним і вказує на потенційну вищий ризик ускладнень. Таким чином, при появі тромбоцитопенії при COVID-19, слід ретельно моніторити стан пацієнта

Згідно інших даних досліджень, основна група важкохворих пацієнтів мали значення тромбоцитів або <150 , або між 150 та 450, Таким чином, підвищення рівня тромбоцитів слабо корелює із важкістю перебігу COVID-19 [36].

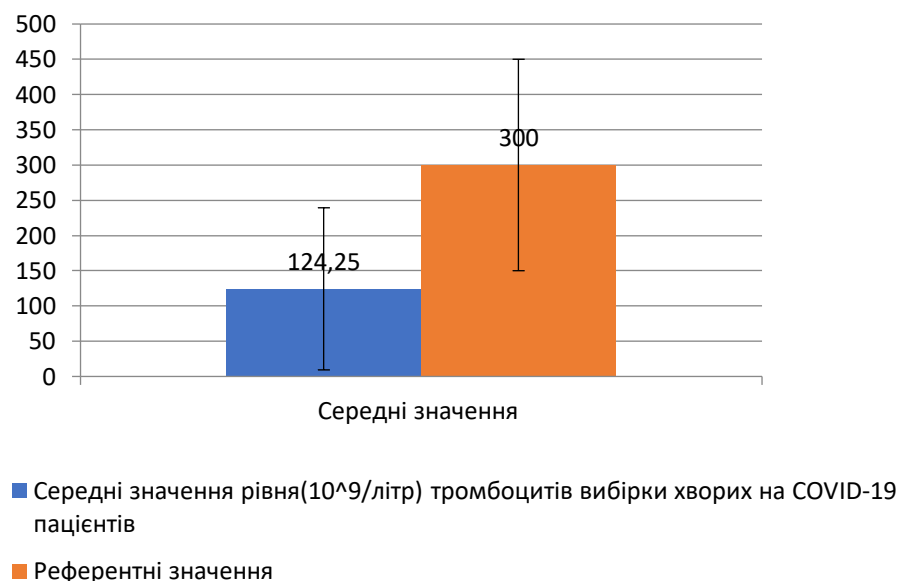


Рис.3.5. Середні значення рівня тромбоцитів вибірки хворих на COVID-19 пацієнтів (клітин $\times 10^9$).

У нашій вибірці рівень тромбоцитів сильно варіював, тобто, мало місце як тромбоцитопенія, так і збільшення кількості тромбоцитів.

Як вже було сказано, тромбоцитопенія асоційована із більш негативним прогнозом при COVID-19. Однак, можливо, що пацієнти мали хронічні захворювання, які характеризуються зниженням ірвня кількості тромбоцитів, такі як анемія, або хронічні гепатити. Тобто, не можна с упевненістю говорити, що тромбоцитопенія була викликана коронавірусом.

Збільшення рівня тромбоцитів було наслідком як наявності хронічних захворювань, так і інфікування вірусом

3.4. Зміна швидкості активного часткового тромбопластинового часу у вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів

Активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) — це широко використовуваний метод аналізу коагуляції, який простий у виконанні, є доступним і тому виконується у величезній кількості лабораторій, як клінічних, так і дослідницьких, у всьому світі. АЧТЧ базується принципі, що в цитратній плазмі додавання замітника тромбоцитів, активатора фактора XII і CaCl_2 дозволяє утворити стабільний згусток. Час, необхідний для утворення стабільного згустку, записується в секундах і представляє фактичний результат АЧТЧ [40].

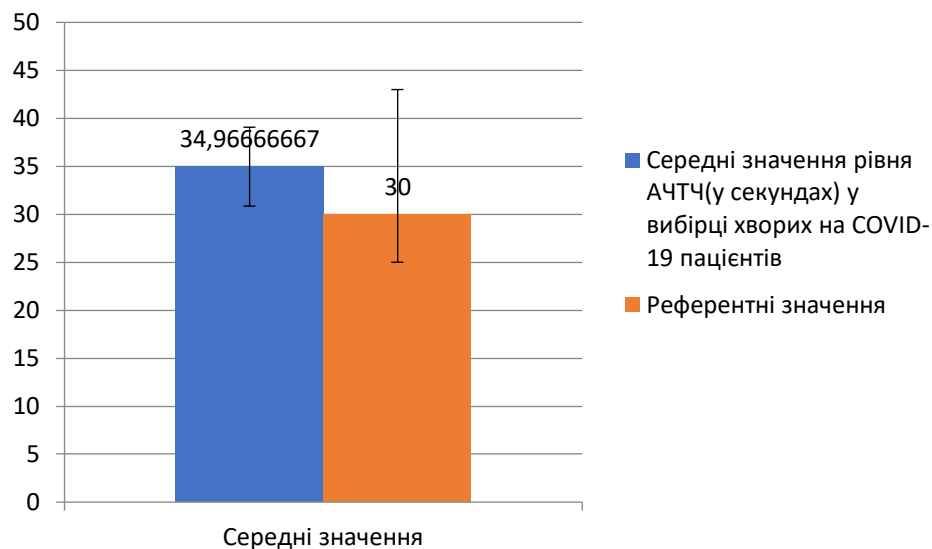


Рис. 3.6. Середні значення рівня АЧТЧ

Отримані нами данні по АЧТЧ демонстрували незначний розкид даних. Пацієнти мали значення від 28,7 до 60,9. Цікаво, що як зниження так і збільшення цього показника не бажане. Однак, ніхто з пацієнтів нашої вибірки не мав значення АЧТЧ, що менше за референтне. Проте, у 13 пацієнтів мали підвищений час АЧТЧ.



Рис. 3.7. Рівень АЧТЧ у хворих на COVID-19 пацієнтів

Взагалі, в літературі описано, що скорочення часу АЧТЧ було присутнє

у середньохворих пацієнтів, в той час як його збільшення часу було характерне для вибірки важкохворих пацієнтів [38].

В іншій літературі описані випадки кореляції між важкістю перебігу захворювання та скорочення часу АЧТЧ [39].

Таким чином, зменшення або збільшення часу АЧТЧ не бажано, та може бути асоційоване із розвитком ускладнень та погіршенням прогнозу при інфікуванні SARS-CoV-2.

3.5. Зміна кількості фібриногену у хворих на COVID-19 пацієнтів

Фібриноген є субстратом для трьох основних ферментів: тромбіну, плазміну і фактора XIIIa. Завдяки різноманітним функціональним взаємодіям він відіграє вирішальну роль у гемостазі. Фібриноген є розчинним попередником нерозчинного фібрину, а також підтримує агрегацію тромбоцитів. Фібриновий згусток також активує фібринолітичну систему [42].



Рис. 3.8. Кількість фібриногену у хворих на COVID-19 пацієнтів

У дослідженнях показано, що пацієнти, із рівнем фібриногену вище за 4,2 г/л мали вищий ризик смерті, в порівнянні із пацієнтами, чий рівень фібриногену становив 2,2-4,2 г/л [41].

В нашому дослідженні, 67 пацієнтів мали рівень фібриногену що був вищий за референтні значення, і відповідно мали вищий ризик смерті від

COVID-19.

33 пацієнти мали нормальний рівень фібриногену. Можливо, що ця група пацієнтів була представлена середньохворимим пацієнтами, або пацієнтами із мінімальним проявом захворювання, через кореляцію між рівнем фібриногену та важкістю перебігу захворювання.

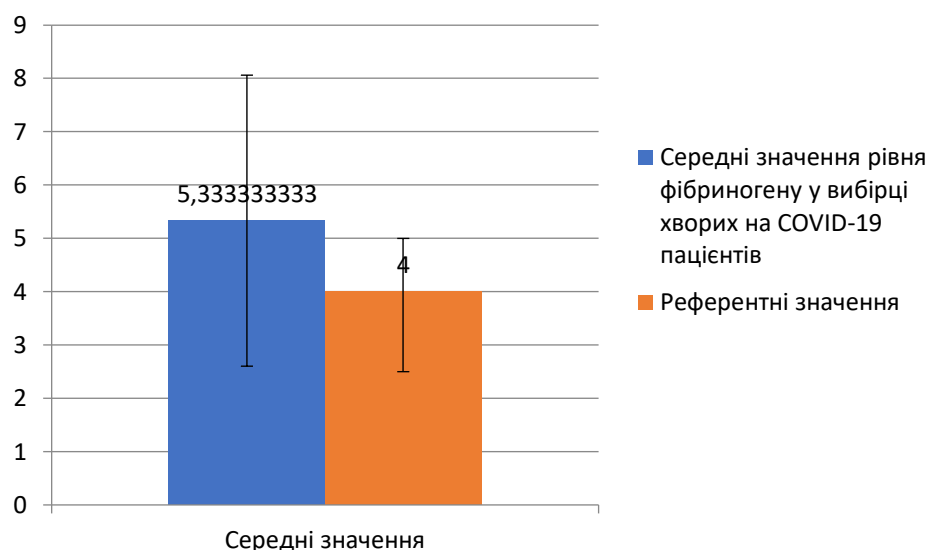


Рис. 3.9. Середнє значення рівня фібриногену у вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів

У нащій вибірці демонструвалася висока варіабельність, пов'язана із тим, що можливо, наша вибірка мала як середньохворих та важкохворих пацієнтів.

3.6. Зміна МНВ у вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів

Міжнародне нормалізоване відношення (МНВ) можна використовувати для оцінки ризику кровотечі або стану згортання крові пацієнтів. Пацієнти, які приймають пероральні антикоагулянти, повинні контролювати МНВ. МНВ розраховується на основі протромбінового часу (ПЧ), який розраховується як відношення ПЧ пацієнта до контрольного ПЧ, стандартизованого для активності тромбoplastинового реагенту, розробленого Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), за такою формулою [42]:

$$\text{МНВ} = \text{ПЧ пацієнта} \div \text{ПЧ контролю}$$

ПЧ, час у секундах, вимірюється в плазмі для утворення згустку за наявності достатньої концентрації кальцію та тканинного тромбoplastину шляхом активації коагуляції [42].



Рис. 3.10. Зміна рівня МНВ у пацієнтів, хворих на COVID-19

Нами були отримані дані, щодо збільшення рівня МНВ у 6 пацієнтів. У 94 було нормальне значення МНВ.

3.7. Зміна рівня протромбінового індекса на вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів

Протромбіновий індекс (ПТІ) – відношення часу згортання нормальної плазми до часу згортання плазми пацієнта, виражене у %. Підвищується при підвищенні згортання і схильності до тромбоутворення, а знижується при схильності до кровотеч.



Рис. 3.11. Рівень ПТІ у вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів

У нашій вибірці, мало місце як зниження, так і збільшення рівня РТІ. Можливо, що зменшення рівня ПТІ не пов'язано із коронавірусною інфекцією, а є результатом наявності хронічних захворювань, таких як, захворювання печінки, ентеропатії, дисбактеріозу. Підвищення ж показника є, швидше за все результатом коронавірусної інфекції, оскільки коронавірусна інфекція активує коагуляційні каскади.

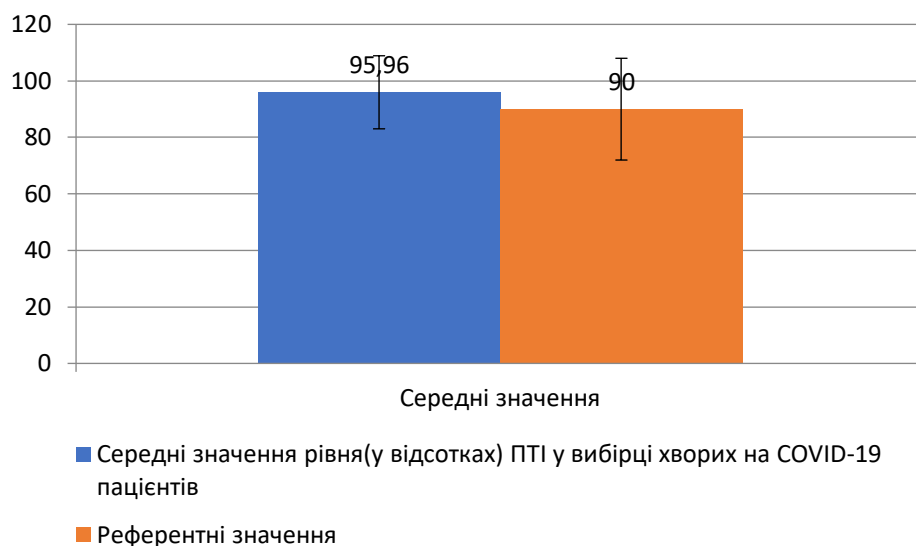


Рис. 3.12. Середні значення ПТІ у вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів.

Наша вибірка мала незначні відхилення часу ПТІ від середнього значення, що вказує на те, що у вибірці напевно не було пацієнтів із хронічними захворюваннями, пов'язаними зі змінами часу ПТІ, а зміна часу ПТІ була пов'язана із індивідуальними особливостями пацієнтів.

ВИСНОВКИ

1. В досліджуваній вибірці хворих на COVID-19 пацієнтів рівень Д димеру сильно варіював. Причина цього варіювання у тому, що рівень Д – димеру свого роду маркер важкості перебігу захворювання. Знаючи рівень Д-димеру пацієнта можна припустити ризик появи ускладнень.
2. Досліджувані пацієнти мали незначне підвищення рівня РФМК, значне підвищення рівня якого корелює зі смертністю від COVID-19
3. Дев'ятеро пацієнтів вибірки мали тромбоцитопенію, що асоційована із вищим ризиком розвитку ускладнень. Взагалі, тромбоцитопенія часто виникає при серцево-судинних захворюваннях та при старінні організму.
4. Збільшення часу АЧТЧ характерне для вибірок важкохворих пацієнтів. У нашій вибірці, тільки тринадцятеро пацієнтів мали підвищений час АЧТЧ.
5. Більшість пацієнтів (67) мали підвищенні рівні фібриногену. Власне, підвищення рівня фібриногену асоційоване із вищим ризиком смерті від COVID-19. Таким чином, ці пацієнти мають отримати ретельний догляд, оскільки вони у зоні ризику.
6. Тільки у шести пацієнтів був підвищений рівень МНВ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Azer SA. COVID-19: pathophysiology, diagnosis, complications and investigational therapeutics. *New Microbes New Infect.* 2020 Sep;37:100738. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100738. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32834902; PMCID: PMC7403867.
2. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol.* 2020 Jun;215:108427. doi: 10.1016/j.clim.2020.108427. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32325252; PMCID: PMC7169933.
3. Hernandez Acosta RA, Esquer Garrigos Z, Marcelin JR, Vijayvargiya P. COVID-19 Pathogenesis and Clinical Manifestations. *Infect Dis Clin North Am.* 2022 Jun;36(2):231-249. doi: 10.1016/j.idc.2022.01.003. Epub 2022 Feb 1. PMID: 35636898; PMCID: PMC8806149.
4. Zhu Y, Sharma L, Chang D. Pathophysiology and clinical management of coronavirus disease (COVID-19): a mini-review. *Front Immunol.* 2023 Aug 14;14:1116131. doi: 10.3389/fimmu.2023.1116131. PMID: 37646038; PMCID: PMC10461092.
5. Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol.* 2011 Jan;39(1):273-80. doi: 10.1177/0192623310389474. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21119054; PMCID: PMC3126677.
6. Panigrahi S, Goswami T, Ferrari B, Antonelli CJ, Bazdar DA, Gilmore H, Freeman ML, Lederman MM, Sieg SF. SARS-CoV-2 Spike Protein Destabilizes Microvascular Homeostasis. *Microbiol Spectr.* 2021 Dec 22;9(3):e0073521. doi: 10.1128/Spectrum.00735-21. Epub 2021 Dec 22. PMID: 34935423; PMCID: PMC8693925.
7. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5087-95. doi: 10.1182/blood-2006-12-027698. Epub 2007 Feb 20. PMID: 17311994.

8. DeSancho MT, Rand JH. Physiology of Normal Hemostasis. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13422/>
9. Jermilia Charles Victoria A. Ploplis, OVID-19 Induces Cytokine Storm and Dysfunctional Hemostasis *Current Drug Targets*, 2022, Vol. 23, No. 17
10. Saravanan Subramaniam *Issue factor in COVID-19-associated coagulopathy* *Thrombosis Research* 220 (2022) 35–47
11. Haoting Zhan, PhD^{1,2}, Haizhen Chen, *Diagnostic Value of D-Dimer in COVID-19: A Meta-Analysis and Meta-Regression* *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* Volume 27: 1-10
12. Firas Kreidieh Sally Temraz. SARS-CoV-2 Infected Patient: from a Hematologist's Perspective *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2020 12
13. Sonia Aparecida de Andrade, Daniel Alexandre de Souza *Pathophysiology of COVID-19: Critical Role of Hemostasis* *Frontiers in cellular and infection microbiology* 03 June 2022
14. Islam Eljilany Abdel-Naser Elzouki *D-Dimer, Fibrinogen, and IL-6 in COVID-19 Patients with Suspected Venous Thromboembolism: A Narrative Review* *Vascular Health and Risk Management* 2020:16 455–462
15. Anant Parasher *COVID-19: Current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment* *Postgrad Med J* 2021;97:312–320. doi:10.1136/postgradmedj-2020-138577
16. Katrien M. J. Devreese *COVID-19–related laboratory coagulation findings* *Int J Lab Hematol*. 2021;43(Suppl. 1):36–42.
17. Evangelos Terpos Ioannis Ntanasios-Stathopoulos *Hematological findings and complications of COVID-19* *Am J Hematol*. 2020;95:834–847.
18. Azadeh Teimury, Mahshid Taheri Khameneh Elahe Mahmoodi Khaledi *Major coagulation disorders and parameters in COVID-19 patients* *European Journal of Medical Research* (2022) 27:25
19. Jenn-Yeu Song, Jian-You Huang *Coronavirus disease 2019 and*

- cardiovascular disease *Tzu Chi Medical Journal* 2023; 35 (3): 213-220
20. Jean Amirala, Anne Marie Vissa, Jerard Seghatchian, Covid-19, induced activation of hemostasis, and immune reactions: Can an auto-immune reaction contribute to the delayed severe complications observed in some patients? *Transfusion and Apheresis Science* 59 (2020) 102804
 21. Florian Langer Stefan Kluge Robert Klamroth Johannes Oldenburg Coagulopathy in COVID-19 and Its Implication for Safe and Efficacious Thromboprophylaxis 2020 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart ·
 22. de Andrade SA, de Souza DA, Torres AL, de Lima CFG, Ebram MC, Celano RMG, Schattner M, Chudzinski-Tavassi AM. Pathophysiology of COVID-19: Critical Role of Hemostasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jun 3;12:896972. doi: 10.3389/fcimb.2022.896972. PMID: 35719336; PMCID: PMC9205169.
 23. <https://www.learnhaem.com/courses/coag/lessons/coagulation-tests/topic/clauss-fibrinogen-assay/#:~:text=The%20Clauss%20fibrinogen%20assay%20requires,the%20standard%20curve%20is%20linear.>
 24. Ian J. Mackie, Steven Kitchen Guidelines on fibrinogen assays, *BJHaem* 2003
 25. [https://www.diagen.co.uk/assets/IFU/Fibrinogen%20Determination%20Kit%20\(Clauss\).pdf](https://www.diagen.co.uk/assets/IFU/Fibrinogen%20Determination%20Kit%20(Clauss).pdf)
 26. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond).* 2016 Jul;77(7):C98-101. doi: 10.12968/hmed.2016.77.7.C98. PMID: 27388394.
 27. [https://www.abcam.com/ps/products/260/ab260076/documents/Human-D-Dimer-ELISA-Kit-protocol-book-v2-ab260076-lot-P4000%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/260/ab260076/documents/Human-D-Dimer-ELISA-Kit-protocol-book-v2-ab260076-lot-P4000%20(website).pdf)
 28. Rizal S, Joshi BR, Regmi S. Raised D-dimer Level among COVID-19 Patients in a Tertiary Care Hospital: A Descriptive Cross-sectional Study. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2022 Mar 11;60(247):259-262. doi: 10.31729/jnma.7311. PMID: 35633258; PMCID: PMC9226744.
 29. Rostami M, Mansouritorghabeh H. D-dimer level in COVID-19 infection: a

- systematic review. *Expert Rev Hematol*. 2020 Nov;13(11):1265-1275. doi: 10.1080/17474086.2020.1831383. Epub 2020 Oct 12. PMID: 32997543.
- 30.** Nasif WA, El-Moursy Ali AS, Hasan Mukhtar M, Alhuzali AMH, Yahya Alnashri YA, Ahmed Gadah ZI, Edrees EAA, Albarakati HAM, Muhji Aloufi HS. Elucidating the Correlation of D-Dimer Levels with COVID-19 Severity: A Scoping Review. *Anemia*. 2022 Mar 8;2022:9104209. doi: 10.1155/2022/9104209. PMID: 35310133; PMCID: PMC8924600.
- 31.** Nasif WA, El-Moursy Ali AS, Hasan Mukhtar M, Alhuzali AMH, Yahya Alnashri YA, Ahmed Gadah ZI, Edrees EAA, Albarakati HAM, Muhji Aloufi HS. Elucidating the Correlation of D-Dimer Levels with COVID-19 Severity: A Scoping Review. *Anemia*. 2022 Mar 8;2022:9104209. doi: 10.1155/2022/9104209. PMID: 35310133; PMCID: PMC8924600.
- 32.** Sridharan M, D Navitskas S, M Kock E, E Houghton D, M Heikal N, Chen D, K Pruthi R. Evaluation of soluble fibrin monomer complex in patients in SARS-CoV-2 COVID-19 infection-associated coagulopathy. *Eur J Haematol*. 2022 Apr;108(4):319-326. doi: 10.1111/ejh.13738. Epub 2022 Jan 10. PMID: 34921683.
- 33.** Bull BS, Hay KL. A macrophage attack culminating in microthromboses characterizes COVID 19 pneumonia. *Immun Inflamm Dis*. 2021 Dec;9(4):1336-1342. doi: 10.1002/iid3.482. Epub 2021 Jul 7. PMID: 34231951; PMCID: PMC8427003
- 34.** Barrett TJ, Bilaloglu S, Cornwell M, Burgess HM, Virginio VW, Drenkova K, Ibrahim H, Yuriditsky E, Aphinyanaphongs Y, Lifshitz M, Xia Liang F, Alejo J, Smith G, Pittaluga S, Rapkiewicz AV, Wang J, Iancu-Rubin C, Mohr I, Ruggles K, Stapleford KA, Hochman J, Berger JS. Platelets contribute to disease severity in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2021 Dec;19(12):3139-3153. doi: 10.1111/jth.15534. Epub 2021 Sep 29. PMID: 34538015; PMCID: PMC8646651.
- 35.** Boccatonda A, D'Ardes D, Rossi I, Grignaschi A, Lanotte A, Cipollone F, Guagnano MT, Giostra F. Platelet Count in Patients with SARS-CoV-2

- Infection: A Prognostic Factor in COVID-19. *J Clin Med*. 2022 Jul 15;11(14):4112. doi: 10.3390/jcm11144112. PMID: 35887877; PMCID: PMC9325150.
- 36.** Lucijanac M, Kreckak I, Soric E, Sedinic M, Sabljic A, Derek L, Jaksic O, Kusec R. Thrombocytosis in COVID-19 patients without myeloproliferative neoplasms is associated with better prognosis but higher rate of venous thromboembolism. *Blood Cancer J*. 2021 Nov 29;11(11):189. doi: 10.1038/s41408-021-00585-2. PMID: 34845183; PMCID: PMC8629336.]
- 37.** Fountain JH, Lappin SL. Physiology, Platelet. [Updated 2023 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470328/>
- 38.** Tekle E, Gelaw Y, Dagne M, Gelaw A, Negash M, Kassa E, Bizuneh S, Wudineh D, Asrie F. Risk stratification and prognostic value of prothrombin time and activated partial thromboplastin time among COVID-19 patients. *PLoS One*. 2022 Aug 11;17(8):e0272216. doi: 10.1371/journal.pone.0272216. PMID: 35951632; PMCID: PMC9371343.
- 39.** Lin J, Yan H, Chen H, He C, Lin C, He H, Zhang S, Shi S, Lin K. COVID-19 and coagulation dysfunction in adults: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2021 Feb;93(2):934-944. doi: 10.1002/jmv.26346. Epub 2020 Aug 2. PMID: 32706426; PMCID: PMC7405098
- 40.** Ignjatovic V. Activated partial thromboplastin time. *Methods Mol Biol*. 2013;992:111-20. doi: 10.1007/978-1-62703-339-8_8. PMID: 23546708
- 41.** Long W, Yang J, Li Z, Li J, Chen S, Chen D, Wang S, Li Q, Hu D, Huang J, Zeng W, Guo L, Wu X. Abnormal Fibrinogen Level as a Prognostic Indicator in Coronavirus Disease Patients: A Retrospective Cohort Study. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jun 14;8:687220. doi: 10.3389/fmed.2021.687220. PMID: 34195213; PMCID: PMC8236504.
- 42.** Shikdar S, Vashisht R, Bhattacharya PT. International Normalized Ratio (INR) [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507707/>
43. Alhadj M, Zubair M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. [Updated 2023 Apr 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
 44. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015 Oct;72:4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25908411.
 45. Berrak Guven, Murat Can, Abdulkadir Tekin, Comparison of Fibrinogen Concentrations Determined by the Clauss Method with Prothrombin-Derived Measurements on an Automated Coagulometer, *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, Volume 7, Issue 6, November 2022, Pages 1337–1345, <https://doi.org/10.1093/jalm/jfac066>
 46. International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting, Platelet Counting by the RBC/Platelet Ratio Method: A Reference Method, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 115, Issue 3, March 2001, Pages 460–464, <https://doi.org/10.1309/W612-MYEP-FA7U-8UYA>
 47. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020 Sep;18(9):2103-2109. doi: 10.1111/jth.14975. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32558075; PMCID: PMC7323352.
 48. Cunningham RM, Johnson Moore KL, Moore JS. Coagulopathy during COVID-19 infection: a brief review. *Clin Exp Med*. 2023 Jul;23(3):655-666. doi: 10.1007/s10238-022-00891-4. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36121504; PMCID: PMC9483403
 49. Sarkar M, Madabhavi IV, Quy PN, Govindagoudar MB. COVID-19 and coagulopathy. *Clin Respir J*. 2021 Dec;15(12):1259-1274. doi: 10.1111/crj.13438. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34399021; PMCID:

PMC8444678.

50. Conway, E.M., Mackman, N., Warren, R.Q. et al. Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nat Rev Immunol* 22, 639–649 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00762-9>
51. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 May;40(5):905-919. doi: 10.1007/s10096-020-04138-6. Epub 2021 Jan 3. PMID: 33389262; PMCID: PMC7778857.
52. Bohn MK, Hall A, Sepiashvili L, Jung B, Steele S, Adeli K. Pathophysiology of COVID-19: Mechanisms Underlying Disease Severity and Progression. *Physiology (Bethesda)*. 2020 Sep 1;35(5):288-301. doi: 10.1152/physiol.00019.2020. PMID: 32783610; PMCID: PMC7426542.
53. LaPelusa A, Dave HD. Physiology, Hemostasis. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545263/>