

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

ННІ біології, хімії та біоресурсів
кафедра біохімії та біотехнології

Динаміка біохімічних маркерів запалення та гематологічних показників
тромбоутворення в процесі перебігу COVID-19

Дипломна робота
рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка

кафедри біохімії та біотехнології

Перун Юлія Олександрівна

Науковий керівник: д.б.н., професор Г.П. Копильчук

Чернівці

2023

Анотація

Робота присвячена комплексному дослідженню біохімічних маркерів запалення та гематологічних показників тромбоутворення в процесі перебігу COVID-19.

Результати дослідження біохімічних маркерів запалення у хворих на COVID-19 – С-реактивного білка та прокальцитоніну – засвідчили розвиток у них запального процесу бактеріального походження з максимумом на 10 добу захворювання.

Дослідження гематологічних показників тромбоутворення – вмісту тромбоцитів та D-димеру в крові хворих на COVID-19 в динаміці його перебігу – засвідчили підвищену здатність до тромбоутворення з максимумом в період 10-20 доба захворювання.

Зростання коефіцієнту позитивності IgG, починаючи з 20 доби захворювання, свідчить про формування імунітету, опосередкованого антитілами, після перенесеного захворювання COVID-19.

Отже, комплексний аналіз біохімічних маркерів запалення, гематологічних показників тромбоутворення та імуноглобулінів у динаміці перебігу COVID-19 дав можливість виявити гостру фазу запалення бактеріальної природи та спрогнозувати період посиленого тромбоутворення, обрати оптимальну схему лікування запалення та тромбоутворення і в цілому хвороби, що привело до плавної нормалізації досліджуваних клінічних показників, а також формування опосередкованого антитілами імунітету уже на 20 добу захворювання.

Ключові слова: COVID-19, С-реактивний білок, прокальцитонін, тромбоцити, D-димер, імуноглобуліни

Abstract

The work is devoted to a comprehensive study of biochemical markers of inflammation and hematological indicators of thrombus formation during the course of COVID-19.

The results of the study of biochemical markers of inflammation in patients with COVID-19 - C-reactive protein and procalcitonin - showed the development of an inflammatory process of bacterial origin in them with a maximum on the 10th day of the disease.

Studies of hematological parameters of thrombus formation – the content of platelets and D-dimer in the blood of patients with COVID-19 in the dynamics of its course – have shown an increased ability to form thrombus with a maximum in the period of 10-20 days of the disease.

The increase in the IgG positivity coefficient, starting from the 20th day of the disease, indicates the formation of immunity mediated by antibodies after the transferred disease of COVID-19.

Therefore, a comprehensive analysis of biochemical markers of inflammation, hematological indicators of thrombus formation and immunoglobulins in the dynamics of the course of COVID-19 made it possible to identify the acute phase of inflammation of a bacterial nature and predict the period of increased thrombus formation, to choose the optimal scheme for the treatment of inflammation and thrombus formation and the disease in general, which led to smooth normalization of the studied clinical indicators, as well as the formation of antibody-mediated immunity already on the 20th day of the disease

Key words: COVID-19, C-reactive protein, procalcitonin, platelets, D-dimer, immunoglobulins.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Зміст

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I Огляд літератури.....	7
1.1. Загальна характеристика коронавірусів.....	7
1.2. Шляхи передачі вірусу від людини до людини.....	7
1.3. Особливості геному SARS-CoV-2.....	9
1.4. Походження вірусу.....	9
1.5. Способи діагностики COVID-19.....	10
1.6. Противірусна терапія.....	13
1.7. Вклад українських науковців у подолання пандемії COVID19.....	14
РОЗДІЛ II Методи досліджень.....	16
РОЗДІЛ III Результати та їх обговорення.....	21
ВИСНОВКИ	30
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	31
ДОДАТОК	38

Вступ

COVID-19 – це гостре респіраторне захворювання, яке викликається новим типом коронавірусу – SARS-CoV-2. Вірус відомий як важкий гострий респіраторний синдром, коронавірус 2 (SARS-CoV-2).

У грудні 2019 року новий коронавірус був ідентифікований як причина спалаху цілої низки випадків важкої пневмонії у Китаї. Хвороба, яку він викликає, називається коронавірусною хворобою 2019 (COVID-19) [1].

З 2002 року зареєстровано три великі спалахи коронавірусних респіраторних захворювань, зокрема SARS-CoV, MERS-CoV і найновіший 2019-nCoV, або відомий як SARS-CoV-2 [2].

Коронавіруси – це родина вірусів, які можуть викликати такі захворювання, як застуда, важкий гострий респіраторний синдром (SARS) і Близькосхідний респіраторний синдром (MERS).

Коронавірус, який стрімко поширився по всьому Китаю, згодом захопив увесь світ. У 2020 році Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) оголосила спалах COVID-19 пандемією [3].

Коронавірус може вражати як людей, так і тварин. Захворювання, яке пізніше назвали COVID-19, розпочалося з китайської провінції Хубей, місто Ухань. Першими хворими стали торговці морепродуктами та живими тваринами. Припускають, що даний вірус з'явився внаслідок композиції людського та тваринного вірусів. Зараження вірусом відбувається повітряно-крапельним шляхом під час чхання, кашлю на близькій відстані у закритому приміщенні, а також під час видиху хворими або інфікованими або через забруднені поверхні, а потім торкання очей, носа або рота. Серед людей можуть бути носії без жодних симптомів, але вони небезпечні та можуть заражати інших. COVID-19 вражає людей будь-якого віку. Коронавірус може вражати не лише дихальні шляхи, а й нервову систему, серце, печінку, нирки, кишечник, очі тощо [4-5].

Слід відмітити, що пандемія 2020 – наймасштабніша з усіх, відомих раніше. Всього лише за 6 місяців від фіксації перших хворих на SARS-CoV-2 вірус

поширився у 188 країнах світу, кількість хворих становила понад 12 млн. 500 тис. померлих. Першого хворого на COVID-19 в Україні виявлено в м. Чернівці 29 лютого 2020 р.[6].

Мета роботи – провести комплексний аналіз біохімічних маркерів запалення, гематологічних показників тромбоутворення та імуноглобулінів у динаміці перебігу COVID-19.

Розділ I

Огляд літератури

1.1. Загальна характеристика коронавірусів.

Коронавіруси родини Coronaviridae викликають респіраторні інфекції у ссавців, зокрема у кажанів, верблюдів, птахів [7-8].

Назву коронавіруси отримали від слова corona (лат.), яку можна побачити під електронним мікроскопом на поверхні, сформовану з короноподібних шипів [9].

Коронавіруси належать до підродини Coronavirinae, родини Coronaviridae, ряду Tlodovirales. Підродина Coronavirinae складається з чотирьох родів - альфакокоронавірус, бетакоронавірус, дельтакокоронавірус и гаммакокоронавірус. SARS-CoV-2, який викликає COVID-19, являє собою зоонозний коронавірус, який, як показано результатами генетичного аналізу, належить до роду Betacoronavirus, підроду Sarbecovirus [10].

У людей може спостерігатися як безсимптомне протікання коронавірусної інфекції, так і лихоманка, кашель, задуха та подразнення ШКТ [11-12].

У деяких випадках, особливо у людей похилого віку з ослабленою імунною системою, коронавірусна хвороба може завершитися смертю після важкої пневмонії [13].

1.2. Шляхи передачі вірусу від людини до людини.

Інкубаційний період COVID-19 становить 1-14 діб, найчастіше 5-6 діб. Біля 97% людей хворіють протягом 14 діб. Найактивніше вірус розмножується у верхніх дихальних шляхах і легенях. Фактори, які сприяють інтенсивному поширенню вірусу є масові збори людей, переважання процесу старіння населення, активне переміщення населення, висока щільність населення, недостатня ефективність роботи системи охорони здоров'я тощо.

У групі ризику розвитку важкої форми перебувають люди старшого віку, хворі на цукровий діабет, гіпертензію, серцево-судинні хвороби, онкохворі та

люди з хронічними респіраторними захворюваннями. Молоді люди та діти теж можуть захворіти, але у дітей це протікає в значно легшій формі, ніж у старших.

Медичні установи, зокрема лікарняні палати, є одним із джерел вторинної передачі вірусу SARS-CoV-2, оскільки саме тут локалізується найбільша кількість інфікованих. У дослідженні [14] виявлено, що звичайні предмети, а також проби повітря, відібрані у палатах з хворими на COVID-19, дали позитивний результат на SARS-CoV-2. Серед великої кількості зразків у цьому дослідженні найвищі концентрації вірусу у повітрі отримані в пацієнтів, яким подавали кисень через нозальну канюлю.

Нещодавно SARS-CoV-2 виявлено в зразках фекалій інфікованих пацієнтів, що свідчить про можливість вірусу розмножуватись у травному тракті і можливість фекально-орального шляху передачі [15-16].

Дослідження Сяо і співав. [17] виявили, що коли клітини Vero E6 інокулювали зразками фекалій інфікованих людей, то вони проявляли цитопатичний ефект через два дні після другого пасажу. Більше того, коли культуру візуалізували за допомогою електронної мікроскопії, то було видно цілі сферичні частинки з чіткими виступами на поверхні, що свідчить про наявність нащадків вірусу після другого пасажу клітин.

Дослідження потенціалу внутрішньоутробної передачі вірусу від вагітних матерів своїм дітям показали його практичну відсутність. Всі досліджувані новонароджені від матерів з SARS-CoV-2 виявились з негативним результатом при перевірці на наявність вірусу. Більше того, зразки грудного молока, навколоплідних вод і пуповинної крові, взяті у пацієнтів, також дали негативний результат на вірус [18].

Встановлено, зокрема дослідженнями у Великій Британії та США, що чутливішими до коронавірусу є темношкірі порівняно з білими людьми [19].

1.3. Особливості геному SARS-CoV-2.

У січні 2020 року китайські вчені заявили про розшифрування повної послідовності геному SARS-CoV-2. З цього часу в світі розпочалися пошуки вакцини проти цього вірусу [20].

Геном корона вірусів представлений молекулою РНК довжиною приблизно 32 тисячі основ і є найбільшим серед відомих геномів РНК-вірусів [21-26].

Геном коронавірусу має 5'-кеп і 3'- полі(А)-хвіст, а це означає, що при інфікуванні клітини-господаря геном працює як РНК-матриця в процесі трансляції білків, необхідних для реплікації вірусу [27].

Встановлено, що для РНК-вірусів, зокрема ВІЛ, вірусу грипу, характерна висока частота мутацій, оскільки у них відсутня репаративна здатність вірусної РНК-полімерази [28-29].

Мутації –це будівельні блоки еволюції, які надають можливість здійснювати природний добір за корисними для вірусу ознаками, такими як підвищена вірулентність, адаптивність і здатність до розвитку [30].

1.4. Походження вірусу.

Доведено природне походження вірусу. Носіями коронавірусів переважно є кажани, миші, щури, кури, собаки, коти, коні, верблюди [31].

Вважають, що основним джерелом коронавірусів є кажани, які збираються у великі стаї і здатні відлітати на великі відстані. Кажани вже більше, ніж 65 млн. років є носіями вірусів, зокрема Ебола, сказу та інших. Проте за останні кілька десятиліть вірус мутував та адаптувався до зараження людей, внаслідок чого бар'єр між тваринами та людиною подоланий.

SARS-CoV, MERS-CoV і більш пізній SARS-CoV-2 – це приклади вірусів, які подолали видовий бар'єр від тварини до людини і викликають дуже небезпечні симптоми у пацієнтів [32].

Коронавіруси людини виявлені в 1960-их роках [33]. Нині відомо сім різних їх штамів. Чотири поширених штами, в тому числі 229E, NL63, OC43 і HKU1, викликають легкі форми інфекції дихальних шляхів у всьому світі [30].

Новий коронавірус – це серйозна глобальна загроза здоров'ю людей. Новий вірус швидко поширився не лише по всьому Китаю, а й охопив 213 інших країн по всьому світу. Науковці встановили, що вірус весь час безперервно змінюється та поширюється через безсимптомних носіїв, що становить глобальну загрозу здоров'ю людей в усьому світі [2, 31, 34].

Встановлений вищий рівень ідентичності геномної послідовності SARS-CoV-2 з SARS-подібними коронавірусами кажанів RaTG13 (ідентичність 96,2%), відібраними у кажанів в Юньнані, порівняно з SARS-CoV (79%) або MERS-CoV (51,8%) надає підстави вважати кажанів основним джерелом SARS-CoV-2. Через велике різноманіття морепродуктів на ринку Хуанань дослідники припускають, що тварини-посередники – змії, панголіни, птахи – теж могли відіграти певну роль у виникненні спалаху COVID-19 [31, 35].

Дослідженнями Xiao et al. [36] встановлено, що для передачі SARS-CoV-2 до людини завжди присутній проміжний господар, оскільки зараження CoV-2 від кажанів – явище дуже рідкісне. Показано, що китайські та малайські дикі панголіни також перевірені на наявність коронавірусів SARS-CoV-2 і більшість з них показали позитивні результати. Єдиний рецептор-зв'язуючий домен (RBD) у білку-шипі Pangolin-CoV має незначні відмінності лише в одній амінокислоті від SARS-CoV-2. Ці результати свідчать, що SARS-CoV-2 потенційно міг виникнути внаслідок вірусної рекомбінації між Pangolin-CoV і Bat-nCoV перед безпосередньою передачею людині.

1.5. Способи діагностики COVID-19.

Антитіла до COVID-19 (Ig G, так і Ig M) виявляються в період з 6 до 12 доби після перших симптомів, а далі відбувається повільне, проте стійке зниження вірусного навантаження. Однак, навіть після клінічного полегшення та виписки з медзакладу пацієнти повинні бути ще деякий час ізольованими задля власної безпеки, щоб уберегтися від повторного зараження, оскільки немає точних відомостей щодо ефективності та тривалості опосередкованого антитілами імунітету.

Діагностика COVID-19 у гострій фазі проводиться методом ПЛР [37].

По мірі розробки надійніших методів діагностики COVID-19 ВООЗ постійно оновлює золотий стандарт тестування [38].

Як правило, перша лінія скринінгу – це виявлення геномного матеріалу за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) [39] з подальшим додатковим радіологічним і серологічним тестуванням [40.]

1). Тестування на основі ЗТ-ПЛР.

Повногеномний аналіз нового коронавірусу дав можливість проаналізувати і вибрати специфічні для нього гени. Це дало можливість для точного тестування інфікованих пацієнтів методом традиційної ПЛР у реальному часі або ЗТ-ПЛР.

З урахуванням інформації [41] був розроблений та оптимізований праймер для RT-PCR з метою виявлення гена спайка (S), специфічного лише для нового коронавірусу: прямі та зворотні праймери (5'-ССТАСТАААТТАААТГАТСТСТГСТТТАСТ-3') і (5'-СААГСТАТААСГСАГССТГТА-3') відповідно.

Для виділення вірусної РНК за допомогою цього методу достатньо будь-якого зразка пацієнта – слини, респіраторного матеріалу, калу, сечі, сироватки крові або плазми.

2). Радіологічні дослідження.

Радіологічна візуалізація за допомогою комп'ютерної томографії (КТ) легень пацієнта виявила закономірності, які використовуються як додаткові діагностичні інструменти. На зображенні грудної клітки пацієнта з коронавірусом видно помутніння по типу «матового скла» в певних сегментах легень, що вважається знахідкою КТ у діагностиці коронавірусної пневмонії [42-43].

Виявлення двосторонніх помутнень по типу «матового скла» повинно стати приводом для негайного тестування на COVID-19. Встановлено, що КТ грудної клітки має 98 % чутливість при скринінгу інфекцій SARS-CoV-2. Результати досліджень показали, що КТ грудної клітки виявляє ознаки вірусної пневмонії навіть у тих пацієнтів, у яких результати ЗТ-ПЛР були первинно негативними. Незважаючи на високу чутливість ЗТ-ПЛР таке можливе, зокрема у випадках,

коли мав місце неправильний забір проб або низьке вірусне навантаження пацієнтів. Тому важливе комплексне дослідження на встановлення наявності вірусу.

3). *Серологічні та імунологічні дослідження.*

Серологічне тестування здійснюється з використанням сироватки пацієнта для виявлення будь-яких імунологічних реакцій, які, як правило, змінюються під впливом конкретної інфекції.

Показано, що у пацієнтів у важкому та передлетальному станах спостерігались профілі сироватки з різким зростанням вмісту інтерлейкінів у плазмі (IL-6, IL-2, IL-7 и IL-10). Окрім того, критичні профілі сироватки пацієнтів з COVID-19 характеризуються «цитокіновим штормом» [44].

Встановлено, що у пацієнтів, яким вдалося пережити таку бурхливу імунну відповідь, спостерігаються довготривалі наслідки, зокрема у вигляді фіброзу легень. Пацієнти з різними хронічними захворюваннями чутливіші до коронавірусної інфекції, ніж ті, у яких здорова імунна система [45].

Інші профілі крові в пацієнтів з COVID-19 характеризуються лейкопенією, високим рівнем С-реактивного білка (більше 10 мг/л), високою ШОЕ та підвищеним рівнем D-димера [46].

4). *Набори для тестування COVID-19.*

Для швидкого тестування COVID-19 багато компаній розробили спеціальні набори. Хоча набори менш точні, ніж ЗТ-ПЛР, час обробки результатів становить менше години, тоді як у випадку ЗТ-ПЛР обробка результатів займає біля 2 днів. За допомогою наборів можна проводити тестування на місці надання медичної допомоги, а також негайно протестувати людину, яку підозрюють у перенесенні SARS-CoV-2. Набори також розширюють можливості тестування великої частини населення, що додатково допомагає контролювати спалахи і точно визначати рівень смертності від хвороби. Набори допомагають виявляти безсимптомних осіб, у яких розвинувся імунітет проти SARS-CoV-2, що виявляється за допомогою IgG и IgM [47-48].

5) Методи виявлення на основі CRISPR.

Дві компанії Mammoth Bioscience и Sherlock Biosciences займаються розробкою наборів для виявлення COVID-19 на основі CRISPR. Компанія Sherlock Biosciences розробила технологію визначення вірусу шляхом активації специфічної для SARS-CoV-2 спрямовуючої РНК Cas13, яка надалі розрізає послідовності репортерної РНК [49].

1.6. Противірусна терапія.

Лікування залежить від симптомів і важкості захворювання. Нині немає ліцензованих противірусних методів лікування для COVID-19. Окрім використання антибіотиків широкого спектру дії для лікування пневмонії, викликаній вторинною інфекцією, дослідники пропонують лікувати пацієнтів уже існуючими противірусними препаратами. Конкретні таргетні препарати проти COVID-19 потребують довгих років для розробки та оцінки безпеки доставки ліків, фармакокінетики, побічних ефектів, перш, ніж буде гарантована безпека для споживання людиною [50].

1.6.1. Розробка вакцин.

Розробка вакцин проти COVID-19 необхідна для подолання інфекцій, контролю поширення інфекції та обмеження рецидивів.

У більшості вакцин особлива увага приділяється шипоподібному білку (S) SARS-CoV-2. У попередніх дослідженнях вакцин проти SARS і MERS повідомлялось, що субодиниця білка (S) вірусу відповідає за продукування вищих титрів нейтралізуючих антитіл і сильніший захист; тому на білкові вакцини видано більше патентів, ніж на інші типи вакцин [51].

1.6.2. Пептидна вакцина.

Рекомендується розробка пептидних вакцин, націлених на певні епітопні ділянки або кілька поверхневих білків вірусу. Використовуються підходи обчис-

лювальної системної біології для прогнозування пептидних послідовностей імунних клітин проти конкретних вірусних епітопів, які при введенні господарю будуть стимулювати імунну систему реагувати на патоген [52].

1.6.3. Проблеми у розробці вакцин.

При розробці вакцини проти коронавірусу SARS у 2003 році одні з основних проблем була небажана імунопотенціація (еозинофільна інфільтрація) після вакцинації цілим вірусом і шипоподібним білком [53].

Еозинофіли – це гранулоцити зі здатністю опосередковувати імунопатологію при деяких захворюваннях, зокрема при бронхіальній астмі. Легенева еозинофілія може викликатися деякими щепленнями і призвести до гіперчутливості, небезпечної для життя. У минулих дослідженнях на тваринах показано, що вакцини проти SARS-CoV-1 викликають легеневу еозинофілію. Це може повторитися як побічний ефект в ході поточних випробувань, і про це не слід забувати.

Серйозна проблема виникає з вагітними, людьми з ослабленим імунітетом та супутніми захворюваннями. Побічні ефекти щеплень можуть ще більше ускладнювати стан таких пацієнтів, тому це залишається проблемою.

1.7. Вклад українських науковців у подолання пандемії COVID19.

Існують 3 шляхи подолання епідемій – це профілактика, яка передбачає вакцинацію; протиепідемічні заходи (максимальна ізоляція хворих); противірусні препарати.

В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України створено та зареєстровано тест-систему для діагностики SARS-CoV-2, в основу якої покладено виготовлені праймери на основі специфічних фрагментів SARS-CoV-2 порівняно з найближчими до нього SARS-CoV-1 і MERS.

Ще досягнення в цьому напрямку має Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Співробітники інституту запропонували механізм взаємодії спайк-білка вірусу SARS-CoV-2 з холінергічним рецептором та довели їх участь у механізмах патогенезу COVID-19.

Встановлено, що SARS-CoV-2 забезпечує тривалу життєдіяльність інфікованих вірусом клітин

З'ясувалося, що SARS-CoV-2 може досить довго підтримувати життєздатність інфікованої клітини завдяки впливу на мітохондрії, запобігаючи вивільненню з них цитохрому С, що дає змогу вірусу інтенсивно розмножуватися, перешкоджаючи апоптозу клітини. Доведено, що антитіла проти фрагмента 674-685 спайк-протеїну SARS-CoV-2 здатні проникати в мозок і впливати на функціонування мітохондрій мозку, спричиняючи серйозні когнітивні порушення, зокрема, проблеми з пам'яттю, концентрацією уваги, які виникають як постковідний синдром.

В Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України розроблено препарат «Альфа-Когнітин», який містить комплекс фолієвої кислоти, вітамінів В12, В6 та В1 з холіном в оптимальному співвідношенні та може використовуватись для лікування когнітивних постковідних порушень. Інше важливе дослідження, проведене в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, стосується вивчення стану системи зсідання крові при перебігу COVID-19. Його актуальність пов'язана з тим, що близько третини хворих на COVID-19 характеризувались виникненням мікротромбозів, які ставали причиною смерті. Результати дослідження системи гемостазу у пацієнтів після перенесеного COVID-19 показали зростання концентрації фібриногену, розчинного фібрину, протромбіну-1. Українські біохіміки довели, що для підвищення ефективності діагностики тромбоутворення та прогнозування його розвитку в комплексі з D-димером слід визначати концентрації розчинного фібрину та фібриногену. Більше того в Інституті біохімії НАНУ розробили та апробували діагностичні тест-системи для визначення цього біохімічного комплексу.

Окрім того, в лабораторіях Інституту біохімії НАНУ визначена роль вітаміну D₃ для лікування та профілактики COVID-19 та розроблено лікувально-профілактичний засіб - вітамін D₃-Е-білковий комплекс, який, містить вітамін Е у кількості фізіологічної норми. Оскільки вітамін Е є синергістам вітаміну D₃, то комплексне використання цих двох вітамінів значно підвищує бажаний ефект [6].

Розділ II

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводились на базі КП «ХМЛ» Хмельницька міська лікарня, відділення ВГРХ «COVID-19. Для дослідження взято історії хвороби 20 пацієнтів, які лежали у відділенні в березні-грудні 2020 року.

Визначення кількості тромбоцитів у крові за методом Фоніо (коагулограма).

Суть методу в тому, що тромбоцити визначаються в перерахунку на 1000 еритроцитів у мазках крові, забарвлених спеціальним барвником з подальшим підрахунком на 1 л або 1 мкл крові.

Для визначення тромбоцитів проводять загальний аналіз крові, кров зранку береться з пальця.

Реактиви: 14% розчин магнію сульфату

2,6% розчин натрію етилендіамінтетраацетату (ЕДТА).

Реактиви набираються капіляром Панченкова.

Хід аналізу.

1. Капіляром до позначки «75» набираємо один із реактивів і вносимо його у пробірку. Потім сюди ж вносимо кров до відмітки «К».
2. Після ретельного перемішування, суміш наносимо на предметне скельце і готуємо тоненькі мазки.
3. Проводимо забарвлення мазка методом Романовського- Гімзи. Мазок забарвлюється 2-3 год, якщо в пробірці був 14% розчин магнію сульфату або 45 хв. з розчином ЕДТА.
4. У кінцевому рахунку тромбоцити забарвлюються в рожево-фіолетовий колір.

У полі зору мікроскопа проводять підрахунок тромбоцитів на 1000 еритроцитів. Кількість тромбоцитів у мазку множать на кількість еритроцитів у 1 мкл крові, далі ділять добуток на 1000.

У чоловіків норма тромбоцитів коливається від 180 до 400000 з максимумом у віці 40 років з подальшим зниженням з віком проте нижня межа становить 320000.

У жінок – 180 340000 з максимумом у 16 років. Під час менструації їх кількість знижується до 150000 [54].

Визначення С-реактивного білка [55].

С-реактивний білок є білком гострої фази. Він синтезується в печінці за дії прозапальних цитокінів (інтерлейкіну-6). Може також синтезуватися у стінці судин. Цей специфічний білок бере участь у формуванні неспецифічного імунітету. За наявності Ca^{2+} С-реактивний білок зв'язується з полісахаридами оболонки мікроорганізмів, посилюючи фагоцитоз.

Визначення С-реактивного білка проводиться у сироватці крові. Як правило, визначення проводиться імунохімічними методами на автоматичних аналізаторах.

Референсні величини - 0,08–3,1 мг/л. Точка відліку, що свідчить про наявність гострої фази – це при концентрації С-реактивного білка 10 мг/л.

Визначення прокальцитоніну [56].

Прокальцитонін – це неактивний попередник кальцитоніну – пептидного гормону. У нормі весь прокальцитонін перетворюється на кальцитонін у С-клітинах щитоподібної залози і практично не надходить у кровоплин.

При важких інфекційних захворюваннях у крові виявляється підвищена концентрація прокальцитоніну внаслідок екстратиреоїдного синтезу – в лейкоцитах, нейроендокринних клітинах легень, кишківнику, печінці під впливом прозапальних цитокінів.

У клініці прокальцитонін є маркером генералізації бактеріальної інфекції, сепсису та системної запальної реакції.

Визначення прокальцитоніну у крові проводять хемілюмінесцентним імуноаналізом. Одиниці вимірювання нг/мл.

Норма – $< 0,25$ нг/мл,

$< 0,5$ нг/мл – низький рівень, що свідчить про локальне запалення або локальну інфекцію;

>2 нг/мл – високий рівень, що свідчить про інфекційний процес з системним запаленням.

Визначення імуноглобулінів M і G [57-58].

Імуноферментний аналіз (ІФА). Даний метод надає можливість ідентифікувати речовини у дуже низьких концентраціях. Це специфічний, точний експрес-метод. Оцінка реакції відбувається автоматично, для аналізу потрібні мікрооб'єми біоматеріалу.

Аналіз ІФА базується на реакції антиген-антитіло.

Антигеном називають чужорідну для організму речовину, як правило білкової природи, яка потрапляє в організм людини. У відповідь на появу антигена синтезуються антитіла (імуноглобуліни), які утворюють імунний комплекс з антигеном. Такий комплекс краще розпізнається клітинами імунної системи, які й знищують його.

Першу лінію імунного захисту в перші дні інфекційного процесу формують IgM. Далі в кров надходять IgG, які включаються в процес і знищують інфекцію повністю. IgG залишаються у циркуляторному руслі, забезпечуючи імунітет навіть після перемоги над інфекцією. На цій властивості базується процес вакцинації.

Вакцина містить ослаблені антигени вірусів чи мікроорганізмів. У відповідь на введення вакцини у крові з'являється багато IgG, які у випадку зараження вірусом швидко пригнічують його ще до того, як він потрапить у клітини.

IgA містяться у слизових оболонках, захищаючи підступи до організму. За концентрацією всіх вищеописаних імуноглобулінів можна оцінити, на якій стадії перебуває інфекційний процес, а також дізнатися, чи хворіла коли-небудь людина певним захворюванням.

Матеріалом для досліджень є сироватка крові. У комплексі антиген-анти-тіло утворюється забарвлений продукт, який реєструється за допомогою імуно-ферментного аналізатора.

Стадії ІФА.

1. Упізнавання тестованого комплексу специфічним антитілом, внаслідок чого формується імунний комплекс.
2. Кон'югат взаємодіє з імунним комплексом.
3. Реєстрація сигналу за допомогою ферментної мітки.

Визначення D-димера [59-60].

D-димер – це найменший фрагмент фібрину, що утворюється внаслідок розпаду волокон фібрину під впливом плазміну. Назва «димер» походить від того, що 2 D - фрагменти фібриногену з'єднані між собою.

За концентрацією D-димеру в клініці судять про збільшену кількість фібрину в судинах. Концентрація D-димеру в плазмі крові показує рівень фібринолізу та кількості лізованого фібрину. За кількістю D-димерів судять про інтенсивність утворення та руйнування фібринових згустків, його можна віднести як до маркерів активації системи зсідання крові та фібриноутворення, так і до маркерів активації фібринолізу. Період напівжиття D-димеру становить 8 годин, виведення відбувається через нирки або ретикулоендотеліальну систему.

Метод визначення – імунохімічний. Біоматеріал – капілярна, венозна або артеріальна кров або плазма.

Порогове значення концентрації D-димеру для діагностики венозної тромбоемболії є 500 мкг/л (нг/мкл).

Всі методи передбачають застосування моноклональних антитіл до ізотопів на D-димер, які формуються при гідролізі нерозчинного фібрину плазміном. Оскільки ці антитіла не взаємодіють з фібриногеном, то аналізи можуть проводитися як у плазмі, так і в сироватці крові.

Визначення D-димеру рекомендують для виключення венозної тромбоемболії (тромбоемболії легеневої артерії).

Його розглядають як біохімічний маркер схильності до гіперкоагуляції й ендогенного фібринолізу, що спостерігається у пацієнтів із тромбозами. Високий вміст D-димеру має негативне прогностичне значення у пацієнтів з глибоким тромбозом вен нижніх кінцівок і тромбоемболією легеневої артерії.

Розділ III

Результати та їх обговорення

Хворі, які знаходилися на лікуванні з діагнозом COVID-19 з 5 до 29 доби захворювання мали підвищену температуру тіла. Лише на 30 добу температура нормалізувалася. Найвища температура тіла 38-39° спостерігалася на 10 добу захворювання.

10 доба характеризувалася також найвищим значенням вмісту С-реактивного білка.

Рис. 1. Вміст С-реактивного білка в сироватці крові хворих на COVID-19 у процесі перебігу захворювання

Примітка (тут і надалі): 5, 10 , 20, 30, 45 – доби захворювання

С-реактивний білок – це білок гострої фази запалення. Основним місцем синтезу С-реактивного білка є печінка. Основними індукторами його синтезу вважаються прозапальні цитокіни, в основному інтерлейкін-6. Проте він може також продукуватися клітинами гладеньких м'язів, макрофагами, ендотеліальними клітинами, лімфоцитами та адипоцитами.

Роль С-реактивного білка полягає у формуванні неспецифічного імунітету. За наявності іонів кальцію С-реактивний білок зв'язується з полісахаридами клітинних оболонок мікроорганізмів та певними внутрішньоклітинними компонентами, активуючи процеси фагоцитозу.

Особливе зростання вмісту С-реактивного білка відмічається в період запалення при інфекційних захворюваннях. С-реактивний білок – досить стабільний маркер запалення, оскільки він залишається незмінним протягом доби. С-реактивний білок не є самостійним діагностичним критерієм, він тільки надає інформацію щодо наявності запалення [61].

Тому, судячи з результатів, поданих на рисунку 1, можемо констатувати спалах запального процесу в пацієнтів з COVID-19 на 10 добу захворювання, спровокований, можливо, приєднанням бактеріальної інфекції. У цей період величина концентрації С-реактивного білка становила в середньому 24 мг/л. На 5 добу рівень С-реактивного білка становив 6 мг/л і знову повертався до цього значення на 30 добу захворювання після певного періоду лікування антибіотиками. Через півтора місяці після захворювання С-реактивний білок зникав з кровоплину.

Відомо, що вміст С-реактивного білка збільшується при будь-якому запаленні, незалежно від етіології. Тому для об'єктивнішого процесу діагностики доцільним було провести додатковий аналіз на вміст прокальцитоніну в крові. Прокальцитонін при небактеріальній інфекції залишається в межах норми, а при бактеріємії та септичному шоці перевищує 2,5 нг/мл.

Прокальцитонін за хімічною природою є поліпептидом. Він не виявляє ніякої гормональної активності, виконуючи роль попередника гормону кальцитоніну. У фізіологічних умовах прокальцитонін практично весь перетворюється на кальцитонін у С-клітинах щитоподібної залози і в кровоплин не виходить. Цей процес контролюється гормональними стимуляторами. Встановлено, що зростання вмісту прокальцитоніну в плазмі крові спостерігається при наявності бактеріальних ендоксинів і важкість бактеріальної інфекції прямо пропорційна до вмісту прокальцитоніну в крові. У здоровому організмі рівень прокальцитоніну

в крові надзвичайно низький і сягає 0,01 нг/мл. При вірусних інфекціях і під час запалення рівень прокальцитоніну зростає помірно, деколи до 1 нг/мл. Проте при важких бактеріальних інфекціях він може зростати до 20 і 200 нг/мл [62].

Отже, з огляду на те, що огріхи в об'єктивності діагностики та вибір неправильної стратегії лікування з призначенням курсу тих чи інших антибіотиків може призвести до розвитку резистентності мікроорганізмів до них, дисбактеріозу та інших побічних реакцій – аналіз на вміст прокальцитоніну в крові видається досить доцільним.

Рис. 2. Вміст прокальцитоніну в сироватці крові хворих на COVID-19 у процесі перебігу захворювання

З рисунка 2 видно, що максимальний вміст прокальцитоніну, який сягає 2,3 нг/мл, відмічається на 10 добу захворювання, тобто співпадає з періодом захворювання, коли була максимальна температура тіла і максимальний рівень С-реактивного білка. Отже, всі три маркери свідчать про гострий період розвитку запального процесу бактеріального походження. Застосування терапії антибіотиками веде до плавного зниження рівня прокальцитоніну в сироватці крові (на 20 добу рівень його знижується до 1,6 нг/мл, а до 30 доби становить 0,8 нг/мл, а

на 45 добу – 0,4 нг/мл). Бачимо, що навіть через 1,5 місяця хвороби ще зберігається низький рівень сепсису. З іншого боку, уже на 5 добу після появи перших симптомів ковіду рівень прокальцитоніну в крові вже підвищувався і становив 0,6 нг/мл при верхній межі норми 0,25 нг/мл. Слід зауважити, що в цей період температура тіла вже була 37,5° і рівні С-реактивного білка 6 мг/мл, що майже вдвічі вище верхньої межі референтних величин.

Ці факти свідчать про те, перебіг COVID-19 супроводжується запаленням, яке поступово загострюється, сягаючи свого максимуму на 10 день хвороби.

Для підтвердження діагнозу COVID-19 визначали імуноглобуліни IgM та IgG. IgM з'являється вже через 5-10 днів будь-якого інфекційного процесу. Він являє собою ніби першу лінію захисту. Як правило – це період гострої фази, початок чи фінал захворювання. Фактично – це маркер нещодавнього інфікування, він циркулює в крові нетривалий час.

IgG свідчить про інфекцію в минулому, він залишається після перенесеного захворювання і свідчить про наявність імунітету до цього захворювання. Антитіла класу IgG визначаються в крові на 4-5 тиждень після інфікування і зберігаються в крові тривалий час. Тому їх ще називають імуноглобулінами пам'яті.

Імуноглобуліни являють собою білки плазми крові. Місцем їх синтезу є зрілі В-лімфоцити, або плазмоцити. IgG становлять до 75 % циркулюючих у крові імуноглобулінів і мають най триваліший період на півжиття.

IgM становлять 5-10 % всіх імуноглобулінів плазми і синтезуються під час первинної імунної відповіді лімфоцитами В ще до того, як вони трансформуються у плазмоцити, що продукують IgG [63].

З таблиці 1 видно, що IgM з'являвся в крові вже на 5 добу захворювання і зникав лише на 30 добу. 30 доба – це доба, коли нормалізувалася температура тіла, величина вмісту С-реактивного білка знижувалася до 6 мг/л, тобто показники гострого запального процесу спрямовані в бік нормалізації.

Вміст IgM та IgG у плазмі крові хворих на COVID-19 в динаміці перебігу захворювання.

Таблиця 1

доба \ показник	5	10	20	30	45
IgM	+	+	+	-	-
IgG	-	-	+ 12,5	+ 15	+ 18

Щодо IgG, то він з'являється у крові на 20 добу, коли запальний процес після лікування антибіотиками плавно спадає. Коефіцієнт позитивності IgG на 20 добу становить 12,5, поступово збільшуючись до 15 на 30 добу і далі до 18 на 45 добу. Це свідчить, що організм виробив імунітет до COVID-19.

Для об'єктивності характеристики перебігу COVID-19 необхідна оцінка функціонального стану системи гемостазу, яка забезпечує підтримання рідкого стану крові та запобігає крововтратам.

Гемостаз забезпечують 3 складові: стінка кровоносних судин, тромбоцити, ензимні та неензимні системи плазми. Особливо тісно взаємодіють перші 2 складові, які формують первинний, або судинно-тромбоцитарний гемостаз, який є «першою лінією захисту». Другий етап – вторинний, або коагуляційний гемостаз.

Встановлено, що гострий період хвороби COVID-19 може супроводжуватися суттєвими змінами гематологічних показників, серед яких тромбоцитоз або тромбоцитопенія.

Тромбоцити – це без'ядерні, перманентні клітини крові, що, по суті, являють собою фрагменти мегакаріоцитів. Вони продукуються кістковим мозком і забезпечують ангіотрофічну, адгезивно-агрегаційну функції, процеси зсідання крові, фібринолізу та ретракції кров'яного згустку, а також можуть здійснювати транспорт циркулюючих імунних комплексів та підтримувати спазм судин.

У відповідь на пошкодження стінки судин в ділянці травмування скупчуються тромбоцити і виділяють тромбопластин. Останній у комплексі з протромбіном, кальцієм і вітаміном К забезпечує перетворення фібриногену на фібрин.

Утворюються цілі мережі фібрину, які затримують формені елементи крові і формують згусток. До застою крові та тромбозів також можуть призводити інфекції, малорухливий спосіб життя, зайва вага, неправильне харчування [64].

Слід відмітити, що рівень відхилень лабораторних показників від референсних величин корелює із важкістю перебігу гострої фази захворювання COVID-19 та частотою летальності [65].

Результати наукових досліджень [66] засвідчують, що в перші дні захворювання на COVID-19 або після одужання може розвиватися довготривала тромбоцитопенія.

Вчені дослідили, що тромби в судинах хворих на найважчі форми COVID-19 можуть бути наслідком «помилки» при формуванні антитіл, що атакують протеїни коронавірусної оболонки.

Раніше ми могли тільки припускати, чому при тяжкому перебігу COVID-19 активуються тромбоцити. Виявилось, що виною всьому дефектні антитіла – вони з'єднуються з зараженими клітинами судин і змушують їх виробляти сигнали, які активують тромбоцити» – це слова професора Джона Гіббінса – одого з дослідників даного явища.

Таким чином зараження організму SARS-CoV-2 супроводжується важкими порушеннями функціонування імунної системи, тромбозами, серцево-судинними проблемами. Гіббінс з колегами досліджували структуру антитіл з плазми крові пацієнтів, які перенесли COVID-19 у легкій і важкій формах і виявили відмінності в їх структурі [67].

Отже, все сказане вище доводить клінічну доцільність аналізу вмісту тромбоцитів у крові хворих на COVID-19.

Результати проведеного аналізу подані на рис. 3.

Рис.3. Вміст тромбоцитів у крові хворих на COVID-19 у динаміці перебігу захворювання.

Дані рисунка 3 засвідчують, що під час захворювання показники вмісту тромбоцитів перебувають у межах референтних величин, проте на 10 добу в період гострої фази запалення показник вмісту тромбоцитів сягає верхньої межі норми.

Таким чином існує небезпека тромбозів у гостру фазу запалення, яка розвинулася на 10 добу захворювання.

Для повнішої картини стану системи гемостазу корисним видається визначення концентрації D-димеру в плазмі крові.

D-димер являє собою фрагмент фібрину, який утворюється в процесі фібринолізу, тобто розпаду згустків крові. D-димер у клініці використовують в якості маркера утворення фібринового згустку та його деградації.

Цей показник останні два десятиліття використовують як маркер венозної тромбоемболії. При патологічних процесах формування тромбів у крові з'являються фрагменти тромба.

Рис. 4. Концентрація D-димеру в плазмі крові хворих на COVID-19 у динаміці перебігу захворювання.

За нормальних фізіологічних умов у крові людини вміст D-димерів вкрай низький. Навіть за нормальних умов 2-3 % фібрину підлягає деградації, тобто утворення й розчинення фібрину – це нормальний циклічний процес [68].

З березня 2020 року, коли пандемія коронавірусу почала набирати оберти, медики помітили, що біля 16 % хворих важкою формою коронавірусу страждають на тромбози. Виявилось, що коронавірус змінює гематологічні показники, призводить до загущення крові.

При венозній тромбоемболії продукти розпаду тромбів перекривають судини, D-димер зростає у 8 разів.

Якщо показники вмісту D-димера в крові підвищені, то це означає, що організм вимушений деградувати значні згустки крові й існує ризик підвищеного тромбоутворення [69].

На заключних етапах зсідання крові фібринопептиди А і В за допомогою тромбіну від'єднуються від розчинного фібриногену. Утворені розчинні мономери фібрину надалі з'єднуються між собою, утворюючи полімери, D-домени яких з'єднані гемофобним глобуліном (фактор XIII), утворюючи фібриновий тромб.

Водночас активується фібринолітична система. Плазмін розділяє нерозчинні полімери фібрину. Одним із таких продуктів фібринолізу є D-димер.

У людей з дефіцитом фактора XIII рівень D-димеру залишається низьким навіть за умови посиленого тромбоутворення. За таких під час розвитку тромбозу утворюється значна кількість продуктів деградації фібрину в крові, але D-димер визначити не вдається [70].

Щодо результатів наших досліджень, то максимальні значення даного показника відмічаються на 20 добу захворювання, досягаючи рівня 1100 нг/мл. Сильний скачок вмісту D-димеру – від 380 нг/мл до 860 нг/мл – спостерігається на 10 добу. Проте на цьому зростання показника не зупиняється і доростає до 1100 нг/мл на 20 добу, після чого відбувається його зниження до 700, а далі до 500 нг/мл.

Отже, незважаючи на те, що в цілому рівень тромбоцитів знаходився у межах норми, рівень D-димеру різко зростає, що говорить про посилені процеси тромбоутворення в організмі у гостру фазу запалення під час захворювання на COVID-19.

Таким чином комплексний аналіз біохімічних маркерів запалення, гематологічних показників тромбоутворення та імуноглобулінів у динаміці перебігу COVID-19 дав можливість виявити гостру фазу запалення бактеріальної природи та спрогнозувати період посиленого тромбоутворення, обрати оптимальну схему лікування запалення та тромбоутворення і в цілому хвороби, що привело до плавної нормалізації досліджуваних клінічних показників, а також формування опосередкованого антитілами імунітету уже на 20 добу захворювання.

Висновки

1. Результати дослідження біохімічних маркерів запалення у хворих на COVID-19 – С-реактивного білка та прокальцитоніну – засвідчили розвиток у них запального процесу бактеріального походження з максимумом на 10 добу захворювання.
2. Дослідження гематологічних показників тромбоутворення – вмісту тромбоцитів та D-димеру в крові хворих на COVID-19 в динаміці його перебігу – засвідчили підвищену здатність до тромбоутворення з максимумом в період 10-20 доба захворювання.
3. Зростання коефіцієнту позитивності IgG, починаючи з 20 доби захворювання, свідчить про формування імунітету, опосередкованого антитілами, після перенесеного захворювання COVID-19.
4. Отже, комплексний аналіз біохімічних маркерів запалення, гематологічних показників тромбоутворення та імуноглобулінів у динаміці перебігу COVID-19 дав можливість виявити гостру фазу запалення бактеріальної природи та спрогнозувати період посиленого тромбоутворення, обрати оптимальну схему лікування запалення та тромбоутворення і в цілому хвороби, що привело до плавної нормалізації досліджуваних клінічних показників, а також формування опосередкованого антитілами імунітету уже на 20 добу захворювання.