

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М.СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Гашимова Нилуфар Рамиль кызы

**Особенности системы гемостаза и иммунорегуляции в системе  
мать-плод-новорожденный после перенесенного COVID-19 различной  
степени тяжести**

3.1.4. Акушерство и гинекология

3.1.21. Педиатрия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук, профессор РАН  
Бицадзе Виктория Омаровна

доктор медицинских наук, профессор  
Панкратьева Людмила Леонидовна

Москва — 2023

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Закономерности изменений состояния гемостаза в системе «мать-плацента-плод» при неосложненной беременности.....	11
1.2 Иммунологическая регуляция системы «мать-плод» .....	17
1.3 Нарушения системы гемостаза и иммунной регуляции, ассоциированные с COVID-19 во временности беременности.....	23
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	35
2.1 Общая структура исследования.....	35
2.2 Клиническая характеристика обследованных больных.....	37
2.3 Методы исследования и подходы к трактовке полученных данных.....	41
2.4 Статистическая обработка данных.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	48
3.1 Исследование маркеров тромбовоспаления в системе «мать-плод».....	48
3.2 Сравнительный анализ концентрации цитокинов в плазме матери и новорожденного, после COVID-19 во время беременности и корреляции с маркерами активации иммунокомпетентных клеток.....	63
3.3 Состояние Т-регуляторного звена иммунной системы матери и новорожденного.....	68
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	74
ВЫВОДЫ .....	90
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	96

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

COVID-19 (англ. Coronavirus Disease 2019 — коронавирусная инфекция 2019 года) потенциально тяжелая острая респираторно-вирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome related Corona Virus 2), которая впервые была зарегистрирована в Ухань (Китай) в декабре 2019 года и с тех пор распространилась по всему миру. А уже в январе 2020 года Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) была объявлена вспышка эпидемии, связанная с SARS-CoV-2, как чрезвычайная ситуация в области здравоохранения международного значения, а 11 марта 2020 года охарактеризована, принявшее мировой масштаб распространения болезни, как пандемия. По состоянию на январь 2023 года общее число случаев превысило 600 миллионов и привело практически к 7 миллионам смертей [154].

Более частыми осложнениями у пациентов с коронавирусной инфекцией являются тромбозы глубоких вен (ТГВ) и тромбоэмболия легочных артерий (ТЭЛА). При этом в отделении интенсивной терапии встречаемость тромбоэмболических осложнений у таких пациентов составляет 36–46 %. Более того, у 1–5 % пациентов с COVID-19 имеются артериальные тромбозы: инфаркт миокарда, головного мозга, острая ишемия брыжейки и нижних конечностей [94].

Данные проведенных исследований, посвященных влиянию SARS-CoV-2 на частоту осложнений беременности, гемодинамику, на распространённость перинатальных осложнений, влияние на плод и новорождённого весьма противоречивы.

COVID-19 во время беременности характеризуется различными клиническими проявлениями, от бессимптомного течения до острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС) с присоединением тяжелых тромботических осложнений. Инфекция SARS-CoV-2 играет триггерную роль как в иммунной системе, так и в системе гемостаза, поэтому беременные женщины представляют

особый интерес из-за уникальных иммунологических и гемостазиологических изменений во время гестации. Как известно, беременность – это физиологическое гиперкоагуляционное состояние, при котором происходят существенные изменения в про- и антикоагулянтных звеньях гемостаза, а присоединение COVID-19 может стать дополнительным триггером тяжелого тромботического осложнения [116]. Патогенез гиперкоагуляции при инфицировании SARS-CoV-2 обширный и включает ряд факторов, а именно выработку провоспалительных цитокинов, внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs), высвобождение эндотелиацитов, а также активацию тромбоцитов. У пациентов с тяжелой формой COVID-19 в лабораторных показателях значительно повышены плазменные концентрации Д-димера, фибриногена, провоспалительных цитокинов, маркеров активации NETs (миелопероксидаза), маркеров активации тромбоцитов, высокие концентрации vWF с низкими концентрациями металлопротеиназы ADAMTS-13 и естественных антикоагулянтов [58].

Таким образом, пандемия COVID-19 поставила перед миром много проблем, но одной из главных является влияние на здоровье беременной женщины, плода и новорожденного. До настоящего времени не были изучены взаимосвязи нарушений системы гемостаза и иммунитета в системе мать-плод-новорожденный после перенесенного COVID-19. Учитывая влияние SARS-CoV-2 как на беременную женщину, так и на плод, проведение данного исследования является научно обоснованным и актуальным.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель исследования:** определить взаимосвязь нарушений системы гемостаза и клеточного иммунитета в системе мать-плод-новорожденный после перенесенного COVID-19 различной степени тяжести.

**В соответствии с целью поставлены следующие задачи исследования:**

1. Изучить эффекты COVID-19 на течение гестационного процесса и особенности тромбовоспаления у беременных в острый период COVID-19.

2. Изучить эффекты COVID-19 на течение гестационного процесса и особенности тромбовоспаления у беременных, перенесших COVID-19.

3. Изучить содержание маркера нейтрофильных ловушек - миелопероксидазы (MPO), антигена фактора фон Виллебранда (vWF), антигена металлопротеиназы ADAMTS-13 и его ингибитора, а также активность ADAMTS-13 в пуповинной крови новорожденных, матери которых перенесли COVID-19 во время беременности.

4. Сравнить содержание цитокинов и хемокинов (CXCL-10, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) у матерей, перенесших COVID-19 во время беременности и у их плодов, а также изучить взаимосвязь уровней цитокинов с маркерами активации иммунных клеток.

5. Изучить особенности клеточного регуляторного звена иммунной системы матери и новорожденного на уровне T-регуляторных лимфоцитов после COVID-19, перенесенного матерью во время беременности.

6. Изучить особенности формирования специфического T-клеточного ответа у беременных, перенесших COVID-19, и их плодов.

7. Определить диагностическое и прогностическое значение клеточных маркеров иммунной системы матери, перенесшей COVID-19 во время беременности, и плода в постнатальной дизадаптации и развитии осложнений раннего неонатального периода.

### **Научная новизна**

1. Проведено исследование, в основе которого лежит изучение особенностей системы гемостаза и клеточного иммунитета в системе мать-плод-новорожденный у пациентов, перенесших COVID-19.

2. Определены уровни маркеров тромбовоспаления - содержание в крови антигенов MPO, vWF, антигена ADAMTS-13 и его ингибитора, а также активность ADAMTS-13 у беременных в острый период COVID-19 и после перенесенной инфекции.

3. Определены уровни антигенов МРО, vWF, антигена ADAMTS-13 и его ингибитора, а также активность ADAMTS-13 в пуповинной крови новорожденных, матери которых перенесли COVID-19 во время беременности.

4. Проведен сравнительный анализ концентрации цитокинов и хемокинов у матерей и плодов, после COVID-19, а также изучена взаимосвязь уровней циркулирующих цитокинов с маркерами активации иммунокомпетентных клеток.

5. Продемонстрирована особенность клеточного регуляторного звена иммунной системы на уровне Т-регуляторных лимфоцитов в периферической крови беременных и пуповиной крови новорожденных, от матерей после COVID-19.

6. Изучены особенности формирования специфического Т-клеточного ответа у беременных, перенесших COVID-19, и их плодов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В диссертационной работе изучено влияние тромбовоспаления на систему «мать-плод-новорожденный», определены диагностические и прогностические роли молекулярных маркеров тромбовоспаления, более того изучены особенности функционирования Т-клеточного иммунитета у матерей, перенесших COVID-19, и у плодов.

Полученные результаты позволяют выделять группы риска развития перинатальных и неонатальных осложнений на основании оценки маркеров воспаления и дисрегуляции Т-клеточного иммунитета у матерей и плодов, независимо от тяжести заболевания COVID-19.

### **Методология и методы исследования**

В работе всем беременным проводились гемостазиологические, иммунологические, инструментальные и стандартные клинические методы исследования.

Диссертационная работа проводилась в дизайне проспективного рандомизированного сравнительного исследования. Объектом исследования явились беременные после перенесенной коронавирусной инфекции и их новорожденные, беременные в острый период инфицированная, беременные с физиологически протекающей беременностью и их новорожденные. Предметом исследования явились полученные результаты лабораторного и инструментального обследования данных пациенток.

Систематизация и хранение полученных данных выполнялась с помощью электронных таблиц Microsoft Office Excel (2021). Для статистической обработки данных применяли пакет программы Jamovi (The jamovi project, Австралия, версия 2.3.22).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. COVID-19 у беременных вызывает тромботическую форму диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, тромбовоспаление с высокими концентрациями: маркера нейтрофильных ловушек - MPO, vWF, Д-димера, фибриногена, а также нарушение в оси ADAMTS-13/vWF, гиперагрегацию тромбоцитов и снижение концентрации естественных антикоагулянтов.

2. У плодов, матери которых перенесли COVID-19 во время беременности, развивается синдром системного воспалительного ответа.

3. У беременных, после перенесенного COVID-19 во время беременности, к моменту родов восстанавливаются иммунологические показатели и цитокиновый профиль, в то же время у плодов происходит дисрегуляция иммунной системы с развитием воспалительного статуса и активации иммунной системы.

4. Иммунная система плода обеспечивает поддержание иммунологической регуляции в системе «мать-плод». На фоне COVID-19 происходит иммунологическая компрометация, что является фактором риска нарушения толерантности матери и плода и развития перинатальных осложнений

(преждевременные роды, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, преэклампсия, фетальный синдром системного воспалительного ответа).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствует паспорту научной специальности и областям:

3.1.4. Акушерство и гинекология, в частности: п.2 (Физиологические и осложненные беременность, роды и послеродовый период у женщины), п. 3. (Перинатальный период жизни ребенка), п.5 (Экспериментальная и клиническая разработка методов оздоровления женщины в различные периоды жизни, вне и во время беременности и внедрение их в клиническую практику).

3.1.21. Педиатрия, в частности п.1 (Изучение физиологических закономерностей и патологических отклонений, роста, физического, полового, нервно-психического и когнитивного развития, состояния функциональных систем детей в различные периоды жизни: внутриутробного периода, новорожденности, раннего, дошкольного и школьного возраста).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Диссертационное исследование выполнено с соблюдением этических норм и принципов доказательной медицины. Для проверки достоверности результатов использовалась статистическая обработка систематизированных данных, проверка различия между статистическими величинами использовалась путем расчета точного критерия Фишера.

Результаты собственных исследований и материалы диссертации доложены и обсуждены на XXIV Конгрессе педиатров России с международным участием "Актуальные проблемы педиатрии" (Москва, 2023г); на конгрессе «Право на жизнь» (Москва, 2023 г).



Апробация диссертации состоялась на заседании кафедры акушерства, гинекологии и пренатальной медицины Клинического института детского здоровья им. Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) протокол №2 от 15.09.2023 г.

### **Личный вклад**

Автор диссертационной принимал активное участие в выборе направления исследования, самостоятельно анализировал и систематизировал отечественную и зарубежную литературу. Вклад автора также заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: при постановке задач, их реализации, сборе материала, обработке и интерпретации статистических показателей. Автор самостоятельно набирал материал, получал его у участников исследования, с применением необходимого оборудования проводил центрифугирование, а также дальнейшую транспортировку.

### **Внедрение результатов работы в практику**

Результаты настоящего исследования успешно внедрены и используются в лекционном курсе и семинарских занятиях студентов, ординаторов и аспирантов кафедры акушерства, гинекологии и перинатальной медицины Клинического института детского здоровья им. Н. Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). Результаты и практические рекомендации диссертационного исследования внедрены в клиническую практику перинатального центра ГБУЗ «ГКБ №67 имени Л.А. Ворохобова» ДЗМ и Медицинского женского центра г. Москвы.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликовано 9 научных работ по теме диссертационного исследования в изданиях, индексируемых в международной базе SCOPUS.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа оформлена по ГОСТу. Включает разделы: оглавление, введение, состоит из 4 глав: «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты собственных исследований», «обсуждение полученных результатов», а также включает выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 27 рисунками, 7 таблицами. Список литературы содержит 161 работу из них 12 работ на русском языке и 149 работ на английском языке.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Закономерности изменений состояния гемостаза в системе «мать-плацента-плод» при неосложненной беременности

Система гемостаза состоит из прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических белков, которые взаимодействуют с эндотелием и клетками крови, а также друг с другом в сложной системе для поддержания кровотока, предотвращая как кровотечение, так и тромбоз. Беременность характеризуется глубокими изменениями почти в каждой системе органов и в том числе в системе гемостаза. Изменения в системе гемостаза начинаются с самого начала беременности, которые направлены на создания условий для быстрой остановки кровотечения и оптимизации маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока [29]. По сравнению с небеременными женщинами у беременных наблюдается заметное повышение некоторых факторов свертывания крови, снижение фибринолиза и повышенная реактивность тромбоцитов. Любое нарушение баланса в системе гемостаза во время беременности может приводить к высочайшему риску развития тромбозов, кровотечений и акушерских потерь [85].

Во время беременности умеренное снижение числа тромбоцитов является наиболее часто наблюдаемым отклонением от нормы. Согласно различным исследованиям, это физиологическое снижение выявляется в 7–8% всех беременностей и не сопровождается геморрагическими осложнениями [88]. В большинстве случаев речь идет именно о «гестационной тромбоцитопении», которая характеризуется нормальными показателями тромбоцитов до беременности, самостоятельной коррекцией после родов и отсутствием неонатальной тромбоцитопении. Снижение количества тромбоцитов обусловлено гемодилюцией, повышенным потреблением тромбоцитов и повышенной агрегацией тромбоцитов, что связано с увеличением уровня тромбоксана A<sub>2</sub> [118].

Физиологически протекающая беременность сопровождается прогрессирующим повышением концентрации факторов свертывания крови, а

именно VII, VIII, IX, X, XII и фактора фон Виллебранда (vWF), что сопровождается выраженным увеличением концентрации фибриногена в плазме крови [70]. Концентрация фибриногена в плазме у беременных на поздних сроках достигает 6,0 г/л. Однако концентрации FII и FV существенно не изменяются во время беременности [86]. Фибринстабилизирующий FXIII вначале беременности увеличивается, а затем постепенно снижается, также с увеличением гестационного срока снижается и XI фактор свертывания крови [156].

В свою очередь, во время беременности изменяются концентрации естественных антикоагулянтов. Так во время беременности и в особенности в последние недели гестации отмечается умеренное снижение антитромбина III (АТ) примерно на 15% [43]. Выработка протеина С (РС) варьируется в зависимости от срока беременности, а именно во втором триместре отмечаются повышение показателей, за которым следует их снижение в третьем триместре, а затем концентрации постепенно увеличиваются и в послеродовом периоде достигают нормальных значений [40]. И наоборот, концентрации протеина S (PS) во время беременности постепенно и значительно снижаются примерно на 50%, что происходит за счет повышения содержания в плазме крови компонента C4b — связывающего белка и увеличения факторов VIII, IX, X и vWF [159]. Уровень растворимого тромодулина (ТМ) в плазме крови, который указывает на повреждение эндотелия, вызванное цитокинами, эндотоксином, гипоксией, окислительным стрессом, активированными нейтрофилами, постепенно увеличивается во время нормальной беременности [35].

Нормальная беременность сопровождается снижением фибринолиза из-за увеличения содержания фибриногена и ингибитора тканевого активатора плазминогена 1-го типа (РАI-1). Из-за гормональных воздействий концентрация РАI-1 увеличивается в течение третьего триместра беременности примерно в три-пять раз, чем у небеременных женщин [29]. Повышение уровня плазминогена во время беременности может быть в следствии как снижения его использования, так и увеличения производства. Также в плазме у беременных женщин

увеличивается концентрация тканевого активатора плазминогена (t-PA) и урокиназного активатора плазминогена (u-PA) [102].

Как уже было сказано, с увеличением срока беременности уровень vWF постепенно растет, в то время как уровень ADAMTS-13 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13) либо уменьшается, либо остается неизменным [10]. ADAMTS-13 – это цинксодержащая металлопротеиназа, которая относится к группе белков ADAM (англ. a disintegrin and metalloproteinase), участвует в расщеплении ультравысокомолекулярных мультимеров vWF (ULvWF) [11]. Мультимеры высокомолекулярного vWF и ADAMTS-13 не проникают через плацентарный кровоток и, следовательно, не вносят вклад в уровни этих показателей в плазме у новорожденных. Таким образом, изменения в соотношении vWF/ADAMTS-13 в раннем неонатальном периоде является следствием внутренней адаптации новорожденных. Самые последние научные обзоры сообщают, что концентрация vWF в неонатальном периоде выше, чем у взрослых, а к 6-месячному возрасту постепенно снижается. При этом уровень ADAMTS-13 у новорожденных относительно ниже по сравнению с взрослыми. Таким образом дисбаланс соотношения vWF/ADAMTS-13 у здоровых новорожденных является физиологическим состоянием и не приводит к тромбозу, однако воздействие некоторых факторов, в частности гипоксия, инфекции и сепсис могут predispose к неонатальным тромбозам [6].

Факторы свертывания крови вырабатываются плодом начиная с 11 недель и постепенно повышаются по мере прогрессирования беременности. У недоношенных новорожденных концентрации факторов свертывания ниже по сравнению со взрослыми. У здоровых новорожденных витамин K-зависимые факторы свертывания крови составляют 30–50% от показателей взрослых и достигают нормальных значений примерно к 6 месяцам. Напротив, к моменту родов концентрации FV, FVIII и FXIII находятся в пределах нормальных значений [102].

Уровни природных антикоагулянтов, а именно AT, PC и PS значительно снижены при рождении как у недоношенных, так и у доношенных новорожденных

и достигают почти 50% от уровня взрослых. Кроме того, снижение активности системы плазмин/плазминоген, наряду со снижением фибринолиза и более быстрой способностью генерировать тромбин для обеспечения баланса неонатального гемостаза, встречается, в частности, у недоношенных новорожденных. Антитромботические и фибринолитические свойства эндотелия связаны с возрастом; следовательно, эндотелий новорожденных, вероятно, будет отличаться от эндотелия взрослых. Эндотелиальные клетки у плода экспрессируют селектины в зависимости от срока беременности, так Е-селектин и Р-селектин у плодов достигают уровня взрослых к 32 и 11 неделям беременности соответственно [25].

Тромбоциты плода образуются в мегакариоцитах печени, и в первом триместре беременности их количество уже составляет почти 150 000/мкл. На сроке от 22 до 24 недель беременности они достигают стабильного значения около 250 000/мкл. У новорожденных в течение первых 10 дней жизни отмечается гипореактивность тромбоцитов, в то время как количество тромбоцитов находится в пределах нормальных значений, характерных для взрослых. Значительное нарушение способности к активации и агрегации было обнаружено у тромбоцитов новорожденных после стимуляции аденозиндифосфатом (АДФ), адреналином, коллагеном, тромбином и аналогами тромбоксана А<sub>2</sub> *in vitro* по сравнению с тромбоцитами взрослых [101]. Гипореактивность тромбоцитов у новорожденных является следствием меньшего количества плотных гранул и функциональными дефектами альфа-гранул, которые снижают дегрануляцию и способность связывать фибриноген [133]. Интересно, что более высокий гематокрит при рождении и более высокие концентрации vWF усиливают взаимодействие между тромбоцитами и сосудами и, в конечном счете, поддерживают баланс гемостатического статуса новорожденных [146].

Нормальное развитие плаценты и формирование адекватного маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровотока имеют колоссальное значение для вынашивания беременности. Плацента — это сложный орган, состоящий из множества типов клеток, выполняющих самые разнообразные

функции, от прикрепления, инвазии и ремоделирования сосудов до выработки гормонов и транспорта питательных веществ [92]. Плацента является связующим звеном для обмена питательных веществ между кровью матери и плода. Клетки, выстилающие плаценту, представляют собой дифференцированные трофобласты эмбриона, а не материнские эндотелиальные клетки, что определяет плаценту как гемохориальную [28].

Эндоваскулярные трофобласты, выстилающие гемохориальный отдел плода, развиваются по путям дифференцировки, которые, как известно, стимулируют развитие эндотелиальных клеток. Они продуцируют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), плацентарный фактор роста, тромбомодулин, тканевой фактор, ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) и аннексин V, а также экспрессируют эндотелиальный рецептор протеина C (EPCR) и рецепторы фактора роста эндотелия сосудов 1 и 2 (VEGFR-1, VEGFR-2) [15] [158]. Гигантские клетки трофобласта проникают в спиральные артерии матки и заменяют эндотелий материнских артерий с высоким сопротивлением на сосуды с низким сопротивлением и высокой пропускной способностью, что является критически важным для адекватной перфузии плода и гемодинамики матери [150]. Транспортировка через плаценту осуществляется в первую очередь за счет диффузии. Транспорт кислорода опосредуется пассивной диффузией, разницей концентраций и более высоким сродством фетального гемоглобина к кислороду. Гидрофобные молекулы легче транспортируются благодаря растворимости в липидах. Гидрофильные молекулы, включая кальций и аминокислоты, транспортируются против градиента концентрации белками-переносчиками [114]. Большинство аминокислот в кровообращении плода обнаруживаются в более высоких концентрациях, чем в кровообращении матери, что указывает на активное поглощение этих питательных веществ через плаценту плоду.

Плацента ассоциированные осложнения часто подразделяются на ишемические или неишемические. ПЭ, задержка роста плода (ЗРП) и отслойка плаценты являются ишемическими, а преждевременные роды исторически характеризовались как неишемические, хотя примерно треть преждевременных

родов связана с ишемическими изменениями плаценты, что указывает на совпадение механизмов осложнения беременности [129]. Патофизиология ишемии плаценты обычно включает патологическое сосудистое ремоделирование спиральных артерий матки. Нарушение этой физиологической трансформации в результате дефектов эндovasкулярной дифференцировки, миграции и инвазии, классически описываемых при преэклампсии, предотвращает преобразование сосудов с высоким сопротивлением в сосуды с низким сопротивлением и высокой емкостью, что приводит к увеличению усилий сдвига в межворсинчатом пространстве, которые повреждают нежную синцитиальную поверхность ворсинок хориона. Это приводит к усилению отшелушивания синцития и высвобождению факторов свертывания крови в кровотоки матери. Кроме того, нарушение ремоделирования сосудов уменьшает общий приток крови к плаценте и, следовательно, к плоду [132]. Сочетание повышенного сопротивления маточных артерий и отслоения остатков плаценты может спровоцировать системные васкулиты и артериальную гипертензию у матери, которые являются патогномоничными для ПЭ.

Дезадаптация сосудистой и центральной гемодинамической функции матери во время беременности может повлиять на ремоделирование артерий и, как следствие, на инвазию трофобластов, создавая дисбаланс на границе раздела мать-плод. Эти неблагоприятные изменения могут привести к дополнительному нарушению функции эндотелия. Клинически данные нарушения проявляются в виде дисфункции плаценты, гипоперфузией органов, гипертонией, протеинурией, активацией и потреблением тромбоцитов, распадом эритроцитов [136].

Подводя итоги, можно с уверенностью сказать, что гемостаз в системе мать-плацента-плод проявляет уникальные свойства в зависимости от гестационного развития, который изменяется и адаптируется для поддержания физиологического течения беременности. И при возникновении различных осложнений беременности, в частности гипертензивных состояний, ПЭ, инфекционных заболеваний в системе гемостаза возникает дисбаланс, который проявляется высокой активностью коагуляционного звена, истощением



естественных антикоагулянтов, а также нарушениями фибринолиза. Перечисленные изменения опасны возникновением тяжёлых тромбогеморрагических осложнений. Следовательно, колоссальное значение имеет своевременное выявление данных нарушений.

## 1.2 Иммунологическая регуляции системы «мать-плод»

Беременность— это уникальное состояние, с точки зрения иммунологии, при котором генетически разные ткани плода прикрепляются к матери, не вызывая острого отторжения. Зародыш – это полуаллогенный трансплантат, который несет в себе как материнские антигены, так и чужеродные - отцовские. Многочисленные фетальные, материнские и плацентарные механизмы работают согласованно, защищая плод от иммунологического распознавания и отторжения на протяжении всей беременности [8], [22]. Женский организм, плацента и плод вырабатывают особые белковые факторы и вещества, которые угнетают иммунный ответ. Иммунной системе матери во время беременности приходится поддерживать тонкий баланс: толерантность к аллотрансплантату плода при сохранении врожденных и адаптивных иммунных механизмов для защиты от микробных патогенов [76]. При нарушении толерантности возникают осложнения, такие как преждевременные роды (ПР), ПЭ, ЗРП, а также врожденные пороки развития плода, как при TORCH-инфекциях (токсоплазмоз (*Toxoplasmosis*), бледная трепонема, краснуха (*Rubella*), цитомегаловирус (*Cytomegalovirus*), вирус простого герпеса (*Herpes simplex virus*), вирусы гепатита, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и другие инфекции, такие как ветряная оспа и парвовирус В19) [142].

Индукция и поддержание толерантности на протяжении всей беременности включает в себя множество различных типов иммунорегуляторных клеток, в том числе клеток децидуальной оболочки: децидуальные натуральные киллеры (англ. *decidual natural killer, dNK*), дендритные клетки (ДК), Т-регуляторные клетки (*Treg*), эффекторные Т-клетки (*Teff*), макрофаги, а также клеточные рецепторы и молекулы, которые управляют механизмами толерантности [128]. Активность,

дифференцировка и экспансия этих децидуальных клеток регулируются индоламин-2,3-диоксигеназой (IDO), Fas-лигандом и цитокинами, такими как интерлейкин-10 (англ. Interleukin-10, IL-10), IL-4 и трансформирующий фактор роста бета (англ. Transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) [51].

Важным звеном в поддержании аллогенной беременности являются Treg [20]. В 1970-х годах Гершон описал субпопуляцию T-клеток, которые играли определенную роль в подавлении активности иммунных клеток, которые позже были названы «регуляторными T-клетками». Treg клетки экспрессируют низкие уровни рецептора IL-7R, высокие уровни альфа-цепи рецептора IL-2 (CD25) и фактора транскрипции FoxP3 (Forkhead box P3) [64]. Однако были описаны и другие супрессивные подмножества T-клеток [50], включая CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 регуляторные T-клетки 1-го типа (Tr1) и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>Th3 клетки [81], которые индуцируются IL-10 и TGF- $\beta$  и проявляют свою супрессивную активность посредством них [19].

Treg клетки играют основную роль в аутоиммунных реакциях, поддерживают толерантность при трансплантации и толерантность матери к плоду во время беременности. Они способны подавлять активацию и размножение других типов иммунных клеток, таких как T-клетки, B-клетки и некоторые виды макрофагов. Treg клетки делятся на несколько подтипов в зависимости от их происхождения и функции. Некоторые из них производят цитокины, которые подавляют активацию иммунных клеток, а другие подавляют их напрямую путем контактной ингибиции [95].

На ранних сроках беременности количество Treg клеток в периферической крови начинает увеличиваться и достигает максимума во втором триместре, а после родов постепенно уменьшается [109]. Децидуальная оболочка содержит колоссальное число Treg клеток CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> с высокой экспрессией CD152 (гликопротеин цитотоксических T-лимфоцитов 4, CTLA-4). Эти децидуальные Treg клетки опосредуют мощное ингибирование аутологичной пролиферации T-клеток [20]. CD152 взаимодействует с CD80/CD86 на антигенпрезентирующих клетках (АПК) индуцируя T-клеточную недостаточность, которая подавляет или

ослабляет иммунные ответы, опосредованные Т-клетками [48]. Взаимодействие CD152 с CD80/CD86 также побуждает ДК к экспрессии IDO, который катализирует деградацию триптофана, подавляя пролиферацию Т-клеток и участвует в реакциях защиты плода от отторжения [98]. В период имплантации истощение Treg клеток приводит к выкидышам на ранних сроках беременности [143]. Таким образом, функционирование T-reg клеток играет важную роль в успешной имплантации, иммунологической толерантности в системе мать-плод, а также поддержанию здоровой беременности.

IL-10 и TGF- $\beta$  обладают супрессорными свойствами, которые регулируют иммунную толерантность, опосредованную Treg [74]. IL-10 и TGF- $\beta$  могут секретироваться многими типами клеток. Было обнаружено, что клетки CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> продуцируют более высокие уровни IL-10 и TGF- $\beta$  по сравнению с CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клетками, что указывает на то, что эти цитокины выполняют определенную роль в процессе иммунной регуляции Treg. Децидуальные клетки CD14<sup>+</sup> и ДК [65] могут продуцировать IL-10 и TGF- $\beta$ , что стимулирует дифференцировку Treg.

Субпопуляция CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которая продуцирует IL-17, играет ключевую роль в индукции воспаления, а также в патогенезе отторжения трансплантата. Недавние исследования показали значимость соотношения Th17 к Treg во время беременности, в соответствии с которой дисбаланс соотношения Th17/Treg, а именно сокращенные Treg клеток может способствовать ПЭ [63]. Значительную роль в регуляции баланса между Th17/Treg играет IL-6. Он вызывает развитие клеток Th17 и ингибирует дифференцировку Treg. Избыточный уровень IL-6 способствует возникновению негативных последствий беременности, включая преждевременный разрыв плодных оболочек, хориоамнионит и преждевременные роды [139].

Субпопуляции dNK способствуют иммунной толерантности и успешной беременности за счет подавления воспалительных Th17 [100]. В недавних исследованиях сообщалось, что IDO регулирует функции клеток dNK. В целом NK-это эффекторные лимфоциты системы врожденного иммунитета, которые

служат первой линией распознавания и элиминации опухолевых, чужеродных и инфицированных клеток [153]. НК широко распределены по различным органам, включая лимфатические узлы, тимус, селезенку и матку. Признаком ранней беременности является накопление НК на децидуальной оболочке - dNK, которые участвуют в инвазии клеток трофобласта, remodelировании спиральных артерий и иммунной толерантности на границе мать-плод [52].

Для успешного исхода беременности также важен баланс между про- и противовоспалительными цитокинами. Общеизвестно, что цитокины, такие как IL-2, IL-6, интерферон гамма (IFN $\gamma$ ), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) и IL-12, секретируемые Th1-клетками, отрицательно влияют на исходы беременности, в то время как интерлейкины IL-4, IL-5, IL-9 и IL-10, секретируемые Th2 подобными клетками, опосредуют регуляцию иммунной толерантности необходимой для поддержания успешной беременности [79]. Более того, результаты недавних исследований показали, что изменения цитокинов по соотношению Th1/Th2 связаны с неблагоприятными исходами беременности, в частности сдвиг в сторону Th2 способствует протеканию здоровой беременности. Децидуальные CD4<sup>+</sup> клетки стимулируют дифференцировку T-клеток в сторону Th2-типа, а также продуцируют больше цитокинов Th2 типа, проявляющих ингибирующую регуляцию на границе между матерью и плодом [120]. Трофобласты плода экспрессируют иммуносупрессивный лиганд CD200 для поддержания баланса Th1/Th2 и цитокинов Th2-типа. Xu с соавт. в своем исследовании показали, что сниженная экспрессия CD200 приводила к несбалансированному увеличению выработки цитокина Th1 и снижению продукции цитокина Th2 в трофобластах плаценты при ПЭ [123]. Гормоны также могут влиять на дифференциацию T-клеток. Уровень эстрадиола в сыворотке крови увеличивается до 500 раз во время беременности. Низкий эстрадиол способствует Th1 иммунологическому ответу, в то время как высокий эстрадиол способствует Th2 ответу [87]. Высокие уровни прогестерона ингибируют реакции Th1 во время беременности и могут индуцировать синтез IL-4, IL-5, и IL-9 [126], еще больше усиливая поляризацию до Th2. Кроме того, прогестерон может оказывать

противовоспалительные реакции, поддерживая более высокие уровни IL-10 у женщин, получавших синтетический прогестерон во время беременности [59].

Подводя итог, можно сказать, что децидуальные CD4<sup>+</sup> Т-клетки играют решающую роль в поддержании иммунной толерантности матери и плода, проявляя гетерогенную природу, благодаря содержанию подмножества клеток Th1, Th2, Th17 и Treg. Поляризация в сторону смещения Th2 и Treg является основным механизмом иммунной толерантности с выработкой IL-4 и IL-10 [56].

По сравнению с CD4<sup>+</sup> Т-клетками, CD8<sup>+</sup> Т-клетки играют незначительную роль во время беременности. Однако было высказано предположение, что CD8<sup>+</sup> Т-клетки с супрессивными функциями участвуют в толерантности плода, особенно на поздних сроках беременности, регулируя соотношение Th1/Th2 [53].

В поддержании физиологической беременности и иммунологической толерантности также участвуют макрофаги. Макрофаги являются важными клеточными субпопуляциями врожденной иммунной системы с высокой пластичностью и гетерогенностью. Макрофаги являются вторыми по распространенности лейкоцитами (10–20%) в децидуальной оболочке [61]. Во время беременности макрофаги присутствуют на всех стадиях взаимодействия матери и плода, таких как регуляция реакций НК-клеток, децидуализация, имплантация трофобластов, ремоделирование сосудов, инициация родовой деятельности. Функции макрофагов зависят от их поляризации, макрофаги могут приобретать либо провоспалительный фенотип (M1), либо противовоспалительный фенотип (M2). Клетки M1 проявляют способность продуцировать IL-12, IL-23, высокие уровни оксида азота (NO) и активных форм кислорода (АФК), которые индуцируют Т-клеточные реакции в отношении Th1. Напротив, макрофаги M2 продуцируют IL-10, IL-6, TGF-β и IDO, которые обладают иммуносупрессивными свойствами и снижают экспрессию воспалительных цитокинов, включая IL-12, IL-1b и IL-8 [144]. Макрофаги M2 также стимулируют Т-клетки к Th2-ответу. Кроме того, взаимодействие M2 макрофагов с dNK-клетками способствует выработке IDO и TGF-β, которые

индуцируют дифференцировку  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Treg-клеток с супрессивными функциями на границе мать-плод [47].

Во время беременности макрофаги M2 в децидуальной оболочке встречаются с преобладающей частотой. Неблагоприятные исходы беременности, такие как гестационная артериальная гипертензия, самопроизвольный выкидыш, ПЭ и ПР, обычно коррелируют со сдвигом в сторону макрофагов M1 [90]. Эти явления предполагают, что соотношение M1/M2 в децидуальной оболочке имеет решающее значение для протекания здоровой беременности.

Не стоит забывать о влиянии ДК на иммунную толерантность во время беременности. При воздействии патогенов и воспалительной стимуляции ДК мигрируют в лимфатические узлы, чтобы представить антигены наивным Т-клеткам, индуцируя соответствующие Т-клеточные реакции. Во время ранней беременности децидуальные ДК идентифицируются почти как зрелые миелоидные  $CD83^+$  и менее зрелые  $CD205^+$  ДК, но даже при этом их количество значительно ниже по сравнению с небеременными женщинами [24]. Эти данные свидетельствуют о том, что на ранней стадии беременности минимизация зрелых  $CD83^+$  ДК является ключевым фактором для успешной беременности. Кроме того, количество ДК, продуцирующих IL-12 в децидуальной оболочке значительно ниже, чем в периферической крови. Более низкий уровень IL-12 регулирует соотношение Th1/Th2 в сторону Th2-доминантного состояния, создавая иммунную толерантность на границе мать-плод [117].

ДК и M2-макрофаги могут индуцировать дифференцировку Treg клеток, опосредуя иммунную толерантность. Как уже было сказано, ДК также экспрессируют IDO, который может ингибировать активацию и пролиферацию эффекторных Т-клеток и превращать Т-клетки в  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Treg-клетки [148]. Эти результаты указывают на то, что децидуальные ДК регулируют иммунные реакции, стимулируя Т-клетки к иммуносупрессивным подмножествам. Недавние исследования на мышах показали, что ДК выполняют аналогичные функции как dNK и M2-макрофаги, поддерживая ремоделирование децидуальной ткани и способствуя проникновению трофобластов. Более того, мыши, у которых

были удалены ДК, демонстрировали аномалии в развитии плаценты, что позволяет предположить, что ДК также являются возможными модуляторами поддержания нормальной беременности [80].

### **1.3 Нарушения системы гемостаза и иммунной регуляции, ассоциированные с COVID-19 во время беременности**

COVID-19 — это вирусное заболевание, которое может поражать любую возрастную группу — от младенцев до пожилых людей, — приводя к широкому спектру различных клинических проявлений. Коронавирусная инфекция протекает от легкой или даже бессимптомной формы до тяжелой с развитием ряда осложнений, таких как: острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), септический шок, коагулопатия, полиорганная недостаточность (ПОН) и смерть. Частыми неблагоприятными последствиями у пациентов с COVID-19 являются сосудистые осложнения [37]. Механизмы развития сосудистых осложнений затрагивают различные звенья в организме человека, а именно систему гемостаза, иммунную систему, ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС) и др.

SARS-CoV-2 проникает в клетки-хозяина с помощью поверхностного шиповидного S белка, содержащего S1 и S2 субъединицы. Субъединица S1 содержит рецепторсвязывающий домен (RBD), тогда как S2 опосредует слияние мембран вирусной клетки и пенетрацию. После взаимодействия с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), S-белок подвергается праймированию посредством протеолитического расщепления трансмембранной сериновой протеазой-2 (TMPRSS2), что индуцирует изменение конформации S-белка и обеспечивает виропексис [69]. Рецепторы к ACE2 распределены по всему организму, особенно в пневмоцитах II типа, в различных эндотелиальных клетках, кардиомиоцитах, энтероцитах тонкого кишечника, а также в гладкомышечных клетках различных органов. Более того, в головном мозге были обнаружены РНК и белки SARS-CoV-2, что вызывает подозрение на нейротропизм, который клинически проявляется аносмией [46].

ACE2 вряд ли является единственным рецептором, опосредующим пенетрацию SARS-CoV-2 в клетки. В различных исследованиях было показано 12 дополнительных типов рецепторов, способствующих инфицированию SARS-CoV-2 независимо от ACE2. Возможно, экспрессия таких рецепторов объясняет широкий тропизм к SARS-CoV-2 и переменные клинические проявления COVID-19. Например, были исследованы такие рецепторы как нейропиплин-1 и тирозинкиназа, получившая название AXL. Более того, эти рецепторы экспрессируются в клетках дыхательной системы в большем количестве, чем ACE2 [26].

Многочисленные клинические исследования показали, что люди с ранее существовавшими сопутствующими заболеваниями подвергаются наибольшему риску тяжелого течения COVID-19 [147]. Так J. Jang с соавт. в своем мета-анализе показали что люди с хроническими сопутствующими заболеваниями составляют основную часть, госпитализированных пациентов с SARS-CoV-2, а именно с хронической артериальной гипертензией (16%), сердечно-сосудистыми заболеваниями (12,11%), сахарным диабетом (СД) (7,87%), хроническими заболеваниями печени (3%) и почек (0,83%), с хронической обструктивной болезнью легких (0,95%) и раком (0,92%) [119]. Эти сопутствующие заболевания вызывают дисбаланс в РААС, а присоединение SARS-CoV-2 только усугубляет это состояние. Использование SARS-CoV-2 ACE2 для проникновения в клетку приводит к общему снижению уровня ACE2. Так как ACE2 преобразует ангиотензин II (Ang II) в ангиотензин 1–7 (Ang1-7), дефицит ACE2 вызывает накопление Ang II в клетках. Повышение уровня Ang II в сыворотке крови способствует развитию вазоконстрикции, эндотелиальной дисфункции, провоспалительного и тромботического фенотипа при COVID-19 [124].

Уровень летальности пациентов с COVID-19 и с сопутствующим СД составляет 7,3%, с сердечно-сосудистыми заболеваниями - 10,5%, а среди пациентов без каких-либо сопутствующих заболеваний - 0,9%. Кроме того, у пациентов старше 65 лет риск летального исхода при COVID-19 больше, чем у молодых пациентов. Скорее всего это связано с тем, что возрастные изменения



приводят к структурным и функциональным модификациям сосудистой сети, что приводит к эндотелиальной дисфункции [119].

Основной и ведущей причиной смертности у пациентов с коронавирусной инфекцией является дыхательная недостаточность, которая возникает из-за острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). Однако смертельные случаи в значительной степени связаны с повреждениями сосудов и изменениями в системе гемостаза [21].

Дисфункция и повреждение эндотелия способствуют гиперкоагуляционному состоянию и возникают в результате сочетания ряда причин. Одной из них, может быть, прямое повреждение эндотелия в результате проникновения вируса в эндотелиальные клетки [160]. Другой причиной эндотелиальной дисфункции у больных с COVID-19 является цитокиновый шторм.

Цитокиновый шторм – это обобщающий термин, описывающий конечную точку многих воспалительных заболеваний, характеризующихся системной воспалительной реакцией и ПОН. Первоначальные исследования в Ухане (Китай) показали повышенный уровень интерлейкинов у пациентов с COVID-19: IL-1 $\beta$ , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, фактор роста фибробластов (FGF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IFN- $\gamma$ , хемокин 10 (CXCL10), воспалительный белок макрофагов 1 (MIP-1), фактор роста тромбоцитов (PDGF), TNF- $\alpha$ . К тому же у пациентов с SARS-CoV-2 в отделении интенсивной терапии (ОРИТ) уровни IL-2, IL-7, IL-10, GM-CSF, IP-10, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  были выше [38]. В последующих исследованиях у больных с тяжелым течением коронавирусной инфекции продемонстрировано устойчивое повышение уровня циркулирующих интерлейкинов в сыворотке крови, таких как IL-2, IL-6, IL-10 и IFN- $\gamma$ , причем более высокие уровни IL-6 коррелировали с высоким риском смертности. Интересно, что пик этих цитокинов выявляется на 4-6 день болезни, что соответствует наименьшему количеству Т-клеток, а восстановление Т-клеточной лимфопении коррелирует со снижением уровня IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  [89]. Эти иммунологические изменения возникают в сочетании с повышенными лабораторными показателями воспаления,

включая более высокие уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), С-реактивного белка (СРБ), ферритина и D-димера, которые коррелируют с тяжестью заболевания [36].

Аналогично образом и нейтрофилы вносят свой вклад в повреждение эндотелия при коронавирусной инфекции. Нейтрофилы — это самые ранние и сильные защитные клетки хозяина, способные к уничтожению большинства патогенов в очень короткий промежуток времени. Отличительной чертой нейтрофилов является подвижность этих клеток и способность к проникновению в те ткани, которые недоступны другим лейкоцитам [99]. При уничтожении чужеродных патогенов нейтрофилами используются следующие механизмы: фагоцитоз, дегрануляция и образование активных форм кислорода (АФК) и азота. Еще одним важным антипатогенным механизмом является высвобождение внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs). Основными компонентами внеклеточных нейтрофильных ловушек являются нити ДНК, связанные с антибактериальными гранулированными белками, включая цитруллинированные гистоны (citH3), лизоцим С, кальпротектин, нейтрофильную эластазу, лактоферрин, протеиназу 3, катепсин G, желатиназу, миелопероксидазу (МРО), кателицидин и тд. [30] [34]. Длительное воздействие этих ферментов на эндотелий может привести к нарушению эндотелиального барьера и апоптозу клеток, подвергая субэндотелий воздействию тромбоцитов и лейкоцитов [127].

Притягивание нейтрофилов в очаг воспаления происходит в три этапа: активация, адгезия и экстравазация, с участием хемокинов, селектинов, в том числе Р-селектина, интегрина  $\alpha\text{L}\beta 2$  и молекул межклеточной адгезии 1 (англ. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) [66]. Во время активации нейтрофилов высвобождается внутриклеточный материал. Чрезмерная активация нейтрофилов с образованием NETs способствует острому повреждению легочной ткани, микротромбозу, кровоизлияниям и легочной недостаточности. Как известно, артериальные и венозные тромбы содержат нейтрофилы и NETs [93]. Таким образом, массивная активация нейтрофилов с образованием NETs, во время

цитокинового шторма лежит в основе развития повреждения эндотелия при COVID-19.

Влияние NETs на систему гемостаза приводит к развитию прокоагулянтного состояния, нарушению фибринолиза и противосвертывающей системы. Отрицательно заряженные ДНК NETs активируют фактор XII (FXII), что запускает внутренний путь системы гемостаза. Также ДНК NETs является кофактором тромбин-зависимой активации фактора XI [71] и таким образом генерирует внешний путь, связанный с TF. Нарушение системы фибринолиза происходит благодаря увеличению образования комплексов tPA с PAI-1, которые уменьшают синтез плазмينا из плазминогена [57], а также связыванию белков, участвующих в деградации фибрина, уменьшая их высвобождение из сгустков фибрина. В дополнении ДНК NETs блокирует лизис тромба, опосредованный плазмином, проникая в нити фибрина. Помимо того, ДНК NETs на коагуляцию также влияют и гистоны. Они запускают активацию тромбоцитов через toll-подобные рецепторы (TLR2 и TLR4) [62], а также способствуют аутоактивации протромбина, путем связывания с его молекулой [72]. В добавок гистоны NETs нарушают антитромбин-зависимую инактивацию тромбина и предотвращают взаимодействие комплекса тромбин-тромбомодулин [62]. Гистоны NETs способны не только активировать гемостаз, но и повышать стабильность тромба, усиливая структурные изменения в фибрине, что делает его более устойчивым к фибринолизу.

Нейтрофилы у здоровых беременных женщин демонстрируют характерный пронетотический фенотип, который увеличивается с гестационным сроком. Было показано, что концентрация нуклеосом и внеклеточной ДНК в плазме крови повышаются во время беременности [135]. У беременных женщин с плацента ассоциированными осложнениями, такими ПЭ, ЗРП, отслойка плаценты и преждевременные роды, концентрация внеклеточной ДНК значительно выше, чем у здоровых беременных. На ранних сроках беременности NETs усиливается под действием ХГЧ, в то время как стероидные половые гормоны эстрадиол (E2) и прогестерон (P4) комплексно модулируют активность нейтрофилов. В свою очередь E2 способствует образованию NETs, P4 действует как антагонист,

подавляя прогрессирование NETs, предотвращая перенос нейтрофилов из цитоплазмы в ядро [104].

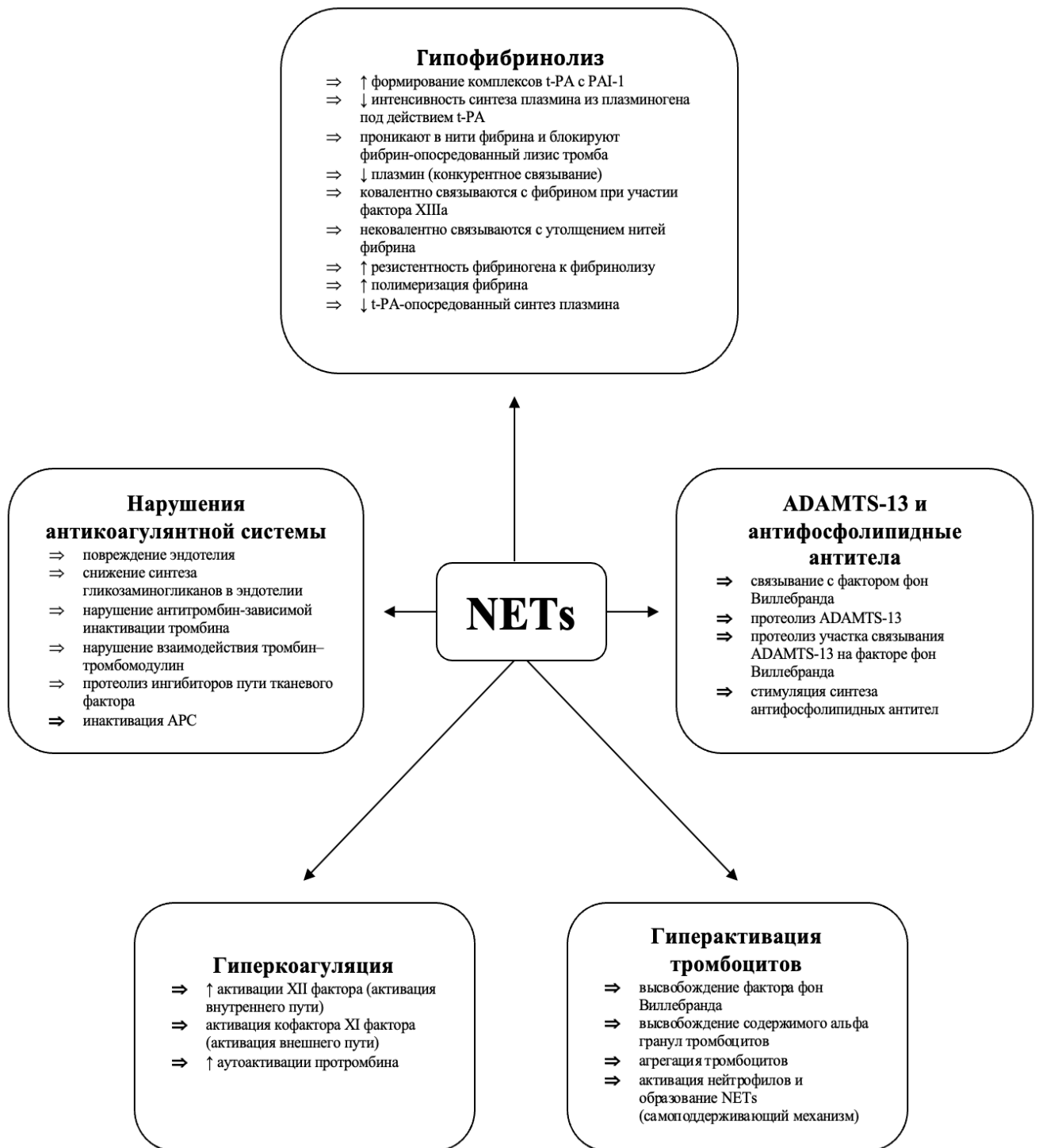


Рисунок 1.1 – Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NETs) и система гемостаза

Как было сказано выше, гистоны способны активировать и разрушать эндотелий сосудов, приводя к высвобождению  $H_2O_2$ , что дополнительно стимулирует образование NETs [110]. Неконтролируемая активация NETs является импульсом для избыточной активации тромбоцитов. Таким образом, влияние NETs на систему гемостаза завершается полной его дисрегуляцией, которая иллюстрирована на рисунке 1.1.

Нарушение целостности эндотелиоцитов является одной из причин избыточного высвобождения vWF из тел Вайбеля Паладе. А избыточное количество, высвобожденного vWF, потребляется металлопротеиназой ADAMTS-13. Более того и NETs способствуют угнетению активности ADAMTS-13, которое приводит к повышению концентрации vWF. ULvWF обеспечивает доставку тромбоцитов к участкам сосудистого повреждения и таким образом, способствует их дальнейшей адгезии и активации, более того мультимеры vWF участвуют в спонтанной активации циркулирующих тромбоцитов, а также других клеток крови. Физиологическое равновесие между ADAMTS-13 и vWF имеет решающее значение в поддержании адекватной микроциркуляции в жизненно важных органах. Таким образом острое повреждение и активация эндотелиальных клеток с нарушением регуляции в оси vWF/ADAMTS-13 может играть решающую роль в возникновении иммунотромбоза [3].

Помимо прочего и тромбоциты играют важное значение в патогенезе осложнений, связанных с COVID-19. SARS-CoV-2 приводит к морфологическим и биохимическим изменениям тромбоцитов, как косвенно, через действие провоспалительных цитокинов, повреждения эндотелия, активацией системы комплемента, так и прямым вирусным заражением тромбоцитов и мегакариоцитов костного мозга.

Гиперактивированные тромбоциты стимулируют усиленное высвобождение внеклеточных везикул  $\alpha$ - и плотных гранул, что видно в крови пациентов с COVID-19, в частности у этих пациентов имеются высокие концентрации серотонина, растворимого P-селектина, CD40L, фактора роста тромбоцитов (PDGF), PF4 и vWF. Более того высокие концентрации P-селектина встречаются у

пациентов с тяжелым течением COVID-19, в том числе с ОРДС. Коагулопатия при коронавирусной инфекции, является следствием иммуотромбоза, способствующего увеличению концентрации Р-селектина, а также патологическому взаимодействию между тромбоцитами крови, лейкоцитами и эндотелием. Высокий уровень Р-селектина стимулирует активацию лейкоцитов и нейтрофилов с образованием NETs, что также приводит к активации тромбоцитов [97]. Тромбоциты пациентов с COVID-19 в большом количестве высвобождают АДФ, тромбаксан А2,  $\beta$ -тромбоглобулин и АТФ. В свою очередь АДФ и тромбаксан А2 в дополнении увеличивают активацию тромбоцитов и следовательно высвобождение содержимого их гранул.

Более того, тромбоциты участвуют в активации врожденного иммунного ответа через экспрессии TLRs и в активации адаптивного иммунного ответа через прямое модулирование активации лимфоцитов и МНС класса I. Содержимые  $\alpha$ -гранул тромбоцитов, в частности CD40L, PF4 и TGF- $\beta$  обладают иммуностимулирующей активностью [115].



Рисунок 1.2 – Возможные механизмы, приводящие к тромбоцитопении

COVID-19 способствует не только активации тромбоцитов, но и приводит к умеренной тромбоцитопении, однако значительное снижение количества тромбоцитов встречается нечасто и представляет собой начинающуюся коагулопатию [30]. Тромбоцитопения в первые 7 дней после госпитализации при COVID-19 является показателем неблагоприятного прогноза. Механизмы тромбоцитопении, связанной с COVID-19 показаны на рисунке 1.2.

В контексте иммунотромбоза не стоит забывать и о РС. Это зимоген сериновой протеазы плазмы крови, содержащий 419 аминокислот. При связывании тромбина с тромбомодулином на поверхности эндотелия сосудов РС превращается в активированный протеин С (APC), который проявляет мощную антикоагулянтную активность за счет необратимой протеолитической инактивации активированного FV и нейтрализует PAI-1 [17]. Расщепление активированного FVIII также усиливается APC. Изменения уровня APC или РС связаны с риском тромбоза. В дополнение к своей антикоагулянтной активности APC уменьшает воспалительную реакцию, ингибирует апоптоз и защищает эндотелиально-клеточный барьер. APC не только подавляет провоспалительные и проапоптотические сигналы, но и также усиливает противовоспалительные и антиапоптотические пути [18]. Поскольку APC играет важную роль в свертывании крови и иммунном ответе, возможно отметить роль APC в иммунотромбозе при COVID-19. Это положение дополнительно подтверждается недавним исследованием по получению и валидации прогностической оценки ухудшения течения заболевания у пациентов с COVID-19. Пациенты с COVID-19, поступившие в ОРИТ, имели более низкие уровни активности антитромбина и РС, а также более высокие уровни Д-димера и фибриногена, чем пациенты с COVID-19, поступившие в обычную палату. Примечательно, что многофакторный анализ выявил снижение активности РС в качестве значимых предикторов ухудшения течения заболевания [67].

Как уже было отмечено, коронавирусная инфекция затрагивает не только систему гемостаза, но и все звенья иммунной системы. Врожденный иммунитет является первой линией защиты от вторжения микробов и включает

неспецифический иммунный ответ с привлечением нейтрофилов, макрофагов и выработкой цитокинов и хемокинов. Врожденный ответ также запускает адаптивный иммунитет через АПК, а именно макрофаги и дендритные клетки, которые представляют вирусные эпитопы  $CD4^+$  Т-хелперным клеткам. При тяжелых случаях COVID-19 повышаются уровни цитокинов, в частности  $IL-1\beta$ ,  $IL-2$ ,  $IL-6$ ,  $IL-7$ ,  $IL-10$ , GM-CSF и  $TNF-\alpha$  [68], уменьшаются концентрации  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, которое проявляется лимфопенией. Иммунный ответ при коронавирусной инфекции проявляется высокими концентрациями Т-хелперов 17 с одновременным снижением Т-reg клеток с последующим нарушением в соотношении Treg/Th17 [138]. Считается, что в основе гипервоспаления с выработкой цитокинов у пациентов с коронавирусной инфекцией лежит чрезмерная активация Th17-иммунного ответа [44] (рисунок 1.3).

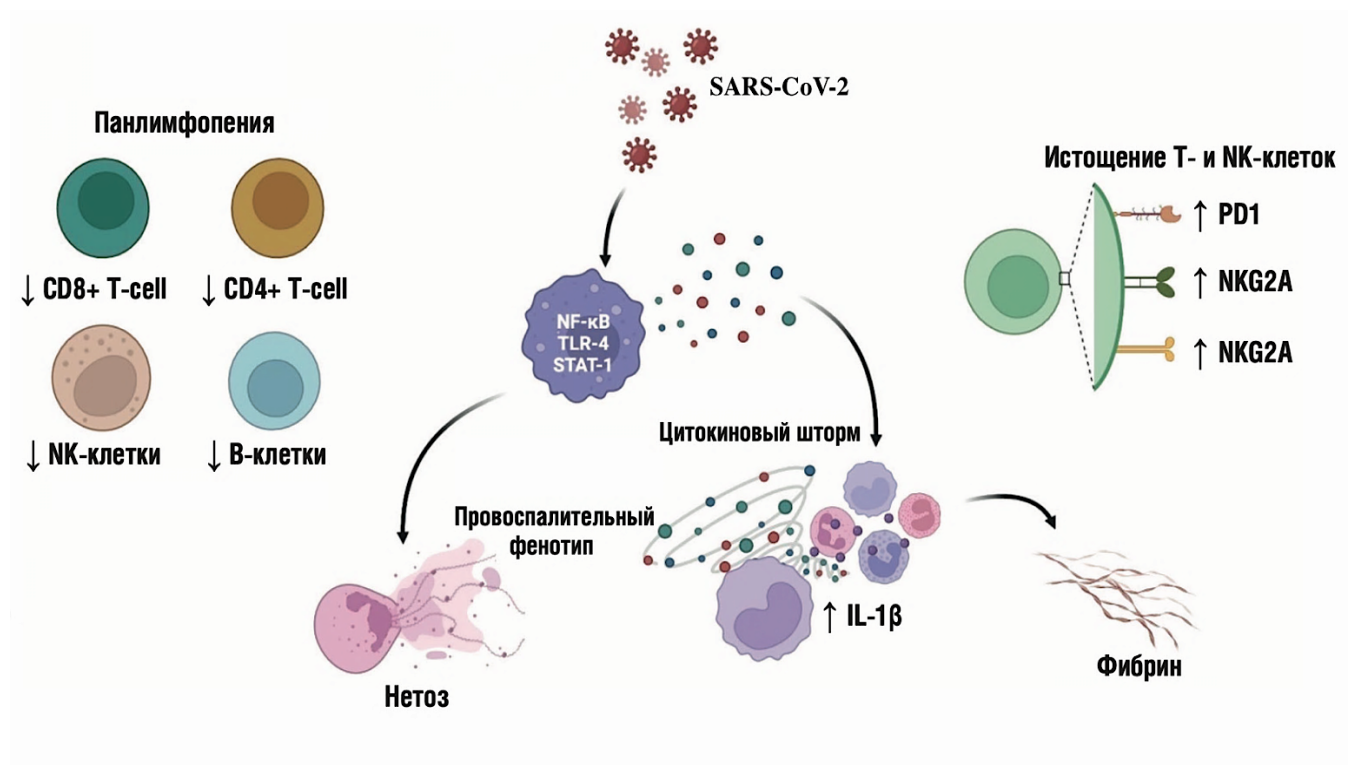


Рисунок 1.3 – Клеточные и молекулярные аспекты патогенеза COVID-19

В многочисленных исследованиях задокументированы случаи повышения не только воспалительных цитокинов, но и хемокинов у пациентов с COVID-19. Хемокины — это низкомолекулярные белки, которые действуют в основном как



хемоаттрактанты для привлечения иммунных клеток при воспалении, а также как модуляторы гомеостаза, иммунных клеток и ангиогенеза [145]. Транскриптомный анализ бронхоальвеолярной промывочной жидкости пациентов с COVID-19 выявил повышенную регуляцию хемокиновых лигандов CXCL1, CXCL2, CXCL6, CXCL10 (IP-10), CCL2 (monocyte chemoattractant protein MCP-1), CCL3 (macrophage inflammatory protein, MIP-1A) и CCL4 (MIP1B) [157]. CXCL10 (IP-10) является хемоаттрактантом для моноцитов/макрофагов, ДК, НК-клеток и Т-клеток; CCL2 (MCP-1) - для моноцитов, ДК и Т-клеток памяти. CXCL2 и CXCL8, которые секретируются моноцитами/макрофагами, служат мощными хемоаттрактантами для нейтрофилов [91].

Хотя CXCL10, так же, как и CCL2, являются генами, индуцируемыми IFN, имеются доказательства нарушения или задержки передачи сигналов IFN 1-го типа в клетках, инфицированных SARS-CoV-2. Один эксперимент *ex vivo* с легочной тканью показал, что SARS-CoV-2 индуцировал меньше IFN и провоспалительных медиаторов, чем SARS-CoV [78]. Анализ секвенирования одноклеточной РНК образцов бронхоальвеолярного лаважа пациентов с тяжелой и легкой формой COVID-19 показал, что SARS-CoV-2 в основном поражает эпителиальные и рекрутируемые воспалительные макрофаги [73]. В последнем случае было отмечено снижение регуляции генов IFN I типа, которое связано с тяжестью заболевания. Более того, инфицированные макрофаги продуцируют IL-6, провоспалительный цитокин, который непосредственно способствует некрозу лимфоцитов и частично объясняет общую характеристику лимфоцитопении у пациентов с COVID-19. Основываясь на морфологии циркулирующих моноцитов и их способности к продукции IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-10, а также поверхностной экспрессии CD11, CD14, CD16, CD68, CD80, CD163 и CD206, можно сказать, что они имеют активированный или провоспалительный фенотип [60]. Экспрессия CD163 и CD206 предполагает смещение в сторону промежуточного или регуляторного фенотипа, причем экспрессия CD163 является особенностью активированных моноцитов/макрофагов при синдроме гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (ГЛГ) [49]. Увеличение размера пула моноцитов

промежуточного подтипа характерно для тяжелой формы COVID-19. Фенотип активированных моноцитов плазмы крови и лимфоцитопения, очевидно, сохраняются и у пациентов после выздоровления [75].

Провоспалительные цитокины беременной женщины способны проникать через плацентарный барьер и стимулировать воспалительные реакции и активацию иммунной системы в организме плода [2], [134]. Более того, развитие цитокинового шторма может вызвать ОРДС, ПОН и смерть в неонатальном периоде. Системный воспалительный ответ может лежат в основе неблагоприятных исходов беременности, в частности ПР, выкидышей, ПЭ, ОРДС плода, СЗРП и фетального синдрома системного воспалительного ответа (ФССВО) [44]. Как известно ФССВО может приводить к развитию полиорганной недостаточности и в последующем к смерти.

Подводя итоги, можно с уверенностью говорить о многогранности патофизиологических нарушений при COVID-19 и следовательно, о клинических проявлениях. Также на сегодняшний день известно о сохранении многих клинических проявлений даже после выздоровления. Предположительно это связано с потенциальными механизмами COVID-19, которые включают вирус-специфические патофизиологические изменения, иммунологические aberrации и воспалительные повреждения многих органов и в том числе эндотелия сосудов с их активацией в ответ на острую инфекцию [12]. Таким образом, метаболическая дисрегуляция, аутоиммунитет, дисфункция РААС, повреждение и активация эндотелия, гиперактивация тромбоцитов могут сохраняться у пациентов даже после выздоровления.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Общая структура исследования

Диссертационная работа была выполнена в период с 2021 по 2023 гг. Набор пациентов осуществлялся в перинатальном центре «ГБУЗ ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова ДЗМ», в родильном доме № 4 при «ГБУЗ ГКБ имени В.В. Виноградова ДЗМ», беременных с острым COVID-19 в ГАУЗ РКИБ имени профессора А.Ф. Агафонова Минздрава Республики Татарстан. Лабораторные исследования системы гемостаза проводились в лаборатории ООО «Медицинский женский центр», иммунологические исследования проводились в лаборатории «ГБУЗ ГКБ № 67 имени Л. А. Ворохобова ДЗМ».

Диссертационное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 04–22 от 16.02.2022. Исследование было проведено по этическим принципам, установленным Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. От всех пациентов, участвовавших в исследовании, было получено письменное информированное согласие, также все пациентки были ознакомлены о характере исследования и о включении, полученных результатов обследования, в научно-исследовательскую работу.

В исследование были включены 152 беременные женщины, которые были разделены на три группы. В группу исследования (группа I) вошли 62 пациентки с перенесенным COVID-19 в течение беременности, группу сравнения (группу II) составили 45 беременных с COVID-19 в острый период. Контрольную группу составили 45 здоровых беременных женщин.

У всех беременных женщин (n=152) были оценены показатели уровня фибриногена, ПВ, АЧТВ, ТВ, Д-димера, vWF, ADAMTS-13 его активности и ингибитора, уровень естественных антикоагулянтов, а именно АТ и РС, также исследовалась агрегационная способность тромбоцитов и концентрация маркера активации NETs антигена МРО. В пуповинной крови (ПК) новорожденных

группы I и контрольной группы были оценены уровни антигена MPO, vWF, ADAMTS-13 его активности и ингибитора.

Исследования иммунологического профиля системы мать-плод, проводились в периферической крови беременных и ПК их новорожденных группы I и контрольной группы (рисунок 1).

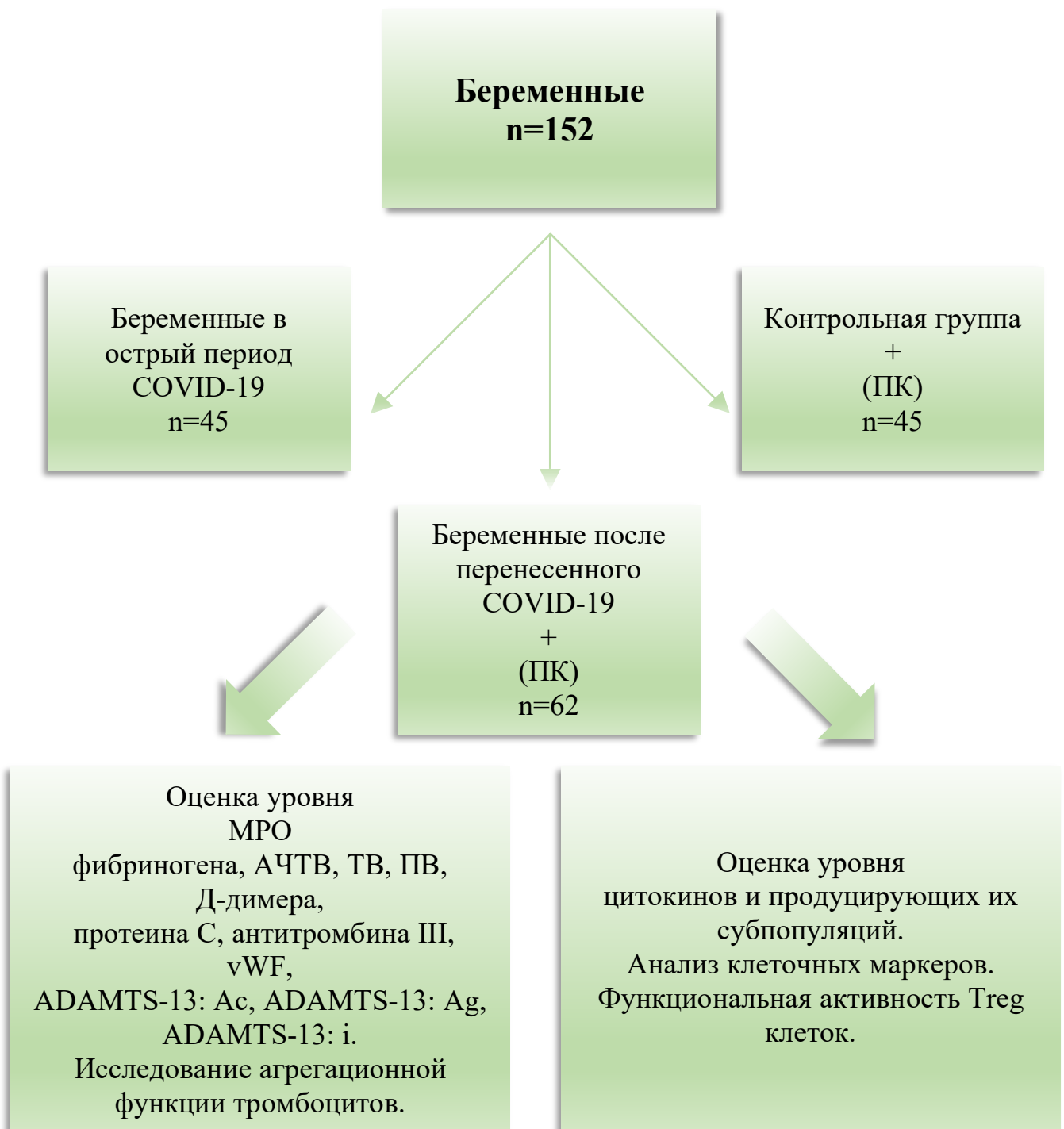


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

### **Критерии включения:**

- диагностированная коронавирусная инфекция во время беременности (SARS-CoV-2 положительный ПЦР-тест);
- возраст пациентки 18 лет и более;
- одноплодная беременность;
- информированное согласие на участие в исследовании.

### **Критерии включения в контрольную группу:**

- физиологическое течение беременности;
- возраст более 18 лет;
- одноплодная беременность;
- информированное согласие на участие в исследовании.

### **Критерии исключения:**

- отказ от участия в исследовании;
- женщины, после вакцинации;
- возраст менее 18 лет;
- инфекционные и/или воспалительные процессы.
- наличие антител к ВИЧ, маркерам вирусных гепатитов, сифилиса;

## **2.2 Клиническая характеристика обследованных больных**

При поступлении в родильный дом, всем беременным женщинам проводился сбор жалоб, анамнеза жизни и заболевания, течения настоящей беременности, гинекологического анамнеза, антропометрических данных, проводился общий осмотр, наружное акушерское и влагалищное исследование, оценивался риск ВТЭО, проводились УЗИ и КТГ плода, лабораторные исследования.

Особое внимание уделялось изучению течения и исхода предыдущих беременностей, паритета родов, а также выявлению в анамнезе случаев тромбоза и/или тромботических осложнений, течение настоящей беременности, прием лекарственных препаратов, случаев госпитализаций. Особое внимание уделялось семейному тромботическому и акушерскому анамнезу.

Клинико-anamнестические данные обследованных женщин представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Клинико-anamнестическая характеристика обследованных участниц исследования

Показатель	Группа I n = 62	Группа II n = 45	Контрольная группа n = 45
Возраст, лет, M Min–max	32 (19–40)	27,7 (18–38)	29 (19–39)
Индекс массы тела, до беременности, кг/м <sup>2</sup> , M	27,5	25,8	25,5
Группа крови, n (%):			
• группа крови 0	19 (30,7)	14 (31,2)	13 (28,9)
• группа крови А	28 (45,1)	20 (44,4)	17 (37,8)
• группа крови В	12 (19,4)	9 (20,0)	11 (24,4)
• группа крови АВ	3 (4,8)	2 (4,4)	4 (8,9)
Предыдущие беременности, n (%):			
• нерожавшие	28 (45)	20 (44,4)	23 (51,1)
• своевременные роды	20 (32,3)	34 (75,5)	29 (64,4)
• преждевременные роды	5 (8)	3 (6,7)	-
• потери беременности	23 (37,1)	21 (46,7)	6 (13,3)
Артериальная гипертензия, n (%)	6 (9,7)	3 (6,7)	-
Преэклампсия, n (%)	4 (6,5)	2 (4,4)	-
Степень тяжести COVID-19, n (%):			
• легкая	34 (54,8)	37 (82,2)	-
• средняя	15 (24,1)	6 (13,3)	-
• тяжёлая	13 (21)	2 (4,4)	-
Триместр беременности (+ COVID-19), n (%):			
- I триместр	11 (17,8)	5 (11,2)	-
- II триместр	21 (33,8)	11 (24,4)	-
- III триместр	30 (48,4)	29 (64,4)	-

Беременные из данных групп достоверно не различались с точки зрения материнских характеристик. Возраст беременных женщин группы I варьировал от 19 до 40 лет, в среднем составил 32, группы II варьировал от 18 до 38, а в среднем 27,7, в контрольной группе средний возраст беременных женщин был равен 29. Индекс массы тела (ИМТ) до беременности составил в I группе 27,5, во II группе 25,8, а в контрольной группе составил 25,5 (M).

При анализе соматического анамнеза было установлено, что в структуре экстрагенитальных заболеваний преобладали заболевания желудочно-кишечного тракта (гастрит, дискинезия желчевыводящих путей). У 6/62 (9,7) пациенток из I группы и 3/45 (6,7) пациенток из II группы зафиксирована артериальная гипертензия.

Анализ гинекологического анамнеза установил, что среди обследованных беременных потери беременности в анамнезе имели 23 (37,1%) пациенток из I группы, 21 (46,7%) и 6/45 (13,3%) пациенток из II и контрольной групп соответственно. Доля преждевременных родов в группе исследования и сравнения составила 5/62 (8%) и 3/45 (6,7%) соответственно.

Большая часть беременных женщин из I группы (34/62; 54,8%) переболели коронавирусной инфекцией в легкой форме, 15/62 (24,1%) в средней, а 13/62 (21%) в тяжелой форме. Из II группы также большинство пациенток с COVID-19 имели легкую форму (37/45; 82,2%), а 6/45 (13,3%) и 2/45 (4,4%) среднюю и тяжелую форму соответственно.

Среднее и тяжелое течение коронавирусной инфекции у беременных женщин сопровождалось стационарным лечением. В острый период болезни низкомолекулярные гепарины получали 22/62 (35,5%) беременные из группы исследования и 12/45 (26,6%) из группы сравнения. При тщательном опросе реконвалесцентов у 6/62 (9,6%) были выявлены симптомы Long COVID, которые не были интерпретированы с беременностью.

Также всем беременным женщинам при госпитализации проводилось ультразвуковое исследование (УЗИ) и доплерометрия, исследовали кривые скоростей кровотока в маточных артериях, в сосудах пуповины, СМА (средняя

мозговая артерия) плода. Кардиотокография (КТГ) также проводилась всем беременным. Результаты УЗИ и КТГ были удовлетворительны в исследуемых группах на момент исследования и соответствовали сроку гестации.

Перинатальные исходы беременных женщин после COVID-19 и контрольной группы представлены в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Перинатальные исходы обследованных участниц исследования

Перинатальные исходы	Группа 1 n = 62	Контрольная группа n = 45
Преждевременный разрыв плодных оболочек, n (%)	11 (17,7)	7 (15,6)
Преждевременные роды, n (%)	7 (11,3)	1 (2,2)
ПОНРП, n (%)	2 (3,2)	0
Роды через естественные родовые пути, n (%)	51 (82,3)	44 (97,8)
Роды путем операции кесарева сечения, n (%)	11 (17,7)	1 (2,2)
Оценка по шкале <u>Апгар</u> на 5-й минуте менее 7 баллов, n (%)	3 (4,8)	0
Масса тела, г, М (Min–max)	3106 (1580–4100)	3356 (2970 – 3980)

Как видно из таблицы 2.2 у пациенток после коронавирусной инфекции:

- роды произошли в срок у 55/62 (88,7%);
- завершились ПР в сроки 34–37 недель беременности;
- закончились через естественные родовые пути у 7/62 (11,3%);
- завершились путем операции кесарево сечения (КС) у 51 (82,3%).

При этом операция КС была:

- в плановом порядке у 4/62 (6,4%) пациенток;
- в экстренном порядке у 7/62 (11,3%)

Экстренное родоразрешение в следствии:

- хориоамнионита у 1/62 (1,6%);
- преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты (ПОНРП) у 2/62 (3,2%);



- дистресса плода у 3/62 (4,8%).

При анализе течения настоящей беременности, было отмечено, что помимо COVID-19 в обследуемых группах также отмечались:

- угроза прерывания беременности – у 29/62 (46,8%) в I группе и у 18/45 (29%) беременных во II группе;
- ПЭ – у 4 (6,5%) в I группе и 2/45 (4,4%) во II группе;
- ранний токсикоз – у 11/62 (17,7%) в I группе и у 6/45 (13,3%) во II группе;
- анемия беременных – у 26/62 (41,9%) беременных в I и 10/45 (22,2%) исследуемых беременных во II группе.

В целом у 19/62 (30,6%) беременных из I группы развились плацента-ассоциированные осложнения

Гестационный возраст новорожденных из I варьировал от 34 до 42 недель, масса тела при рождении от 1580 до 4100 г. Удовлетворительное состояние при рождении было у 59/62 (95%) новорожденных, а средней тяжести у 3 (4,8%).

Всем новорожденным выполнялось УЗИ тимуса. УЗИ выполнялось с помощью ультразвукового аппарата Logiq 500 (General Electric Medical Systems, США) с использованием линейных датчиков с частотой 5–10 МГц одним и тем же специалистом.

### **2.3 Методы исследования и подходы к трактовке полученных данных**

До госпитализации в родильный дом перед родоразрешением на амбулаторном этапе пациенткам проводились обязательные лабораторные исследования на антитела к RW, ВИЧ, гепатиту В и С, группу крови (AB0), резус фактору. При госпитализации - общепринятые клинико-лабораторные обследования: клинический анализ крови; гемостазиограмма (фибриноген, протромбиновое время, АЧТВ, тромбиновое время).

Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь матерей и пуповинная кровь новорожденных. Венозную кровь забирали в вакутейнеры с цитратом натрия (3,2%) для исследования системы гемостаза, с

литий гепарином для исследования концентрации миелопероксидазы (МРО) и показателей клеточного иммунитета и с К2 ЭДТА для выделения мононуклеарных клеток и исследования Treg. Далее пробирки с цитратом натрия (3,2%) и литий гепарином центрифугировали при 3000 об/мин 10 мин для получения бестромбоцитарной плазмы и при 1000 об/мин в течение 5 минут для получения богатой тромбоцитами плазмы. Полученную плазму разливали в пробирки Эппендорф и хранили до проведения исследования в холодильнике при -29С.

### **Определение функциональной активности Т-регуляторных клеток**

Для получения мононуклеарных клеток цельную кровь из пробирки К2 ЭДТА разбавляли в соотношении 1:1 фосфатно-буферным раствором (PBS). После этого разбавленную кровь наслаивали на раствор Фиколла (из расчета 1,5 объема крови на 1 объем Фиколла), не допуская их перемешивания. Далее центрифугировали в течение 30 мин при 450 g. После центрифугирования на границе «кровь/Фиколл» образуется белесое кольцо мононуклеарной фракции клеток, которую собирали и отмывали PBS. Далее с помощью проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США) были выделены популяции Treg. Далее была выполнена оценка супрессорной функции Treg в смешанной культуре лимфоцитов (mixed lymphocyte reaction - MLR), по редукции эффекторных клеток витального красителя карбоксифлуоресцеин-сукцинимидиловым эфиром (Carboxyfluorescein succinimidyl ester – CFSE).

### **Определение уровней циркулирующих цитокинов и цитокин-продуцирующей способности клеток крови**

Для определения концентрации цитокинов использовался проточный иммуноферментный анализ (ИФА) с помощью набора реагентов MILLIPLEX® Map (Millipore, США). С помощью анализатора (Luminex, США) и программного обеспечения Bio-Plex Manager 6.0 Software (Bio-Rad, США) осуществлялся сбор и анализ данных.

На микропланшетном ридере (Вектор-Бест, Россия) определяли оптические плотности при 450 нм. Далее путем экстраполяции значений абсорбции по стандартным кривым рассчитывалась концентрация цитокинов, где на график

абсорбции наносились известные концентрации с помощью встроенного программного обеспечения.

Далее в течение 5 часов происходила стимуляция лимфоцитов с использованием иономицина (2 мкг/мл) и ацетата форболмиристата (50 нг/мл) в присутствии брэфельдина А (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich), для определения способности лимфоцитов к секреции цитокинов. После чего происходила инкубация клеток с V450-меченым анти-IFN- $\gamma$  (B27) и PE-меченым анти-TNF- $\alpha$  (MAb11) от BD Biosciences. После с использованием проточного цитометра Navios (Beckman Coulter, США) и программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, США) проводился анализ данных.

### **Определение клеточных маркеров**

Методом многоцветного иммунофенотипирования определялись уровни экспрессии клеточных маркеров. Для этого использовался набор антител (BeckmanCoulter, США). В состав набора были включены антитела: анти-CD16 (Fc $\gamma$ RIII), меченые PC7; анти-CD25, меченые флуорохромом APC (клон 4E3); анти-CD14, меченые флуорохромом APC; анти-CD45, меченные Pacific Blue; анти-Foxp3, меченые флуорохромом PE (клон 3G3); анти-CD11c (ITGAX), меченые флуорохромом FITC; анти-CD32 (Fc $\gamma$ RII) меченые флуорохромом PC5; анти-CD45RO, меченные PerCP (UCHL1); анти-CD11b (C3b), меченые флуорохромом PE; анти-CD80-меченые флуорохромом PE (клон 2A2); анти-CD4, меченые флуорохромом APC (клон M-T466); анти-CD64 (Fc $\gamma$ RI), меченые флуорохромом PE; анти-CD8- меченые флуорохромом PE (клон BW135/80); анти-CD86, меченные FITC (клон 3D7); анти-CD4, меченные FITC (клон M-T466); анти-CD3, меченые флуорохромом FITC (клон BW264/56); анти-CD127- меченые флуорохромом PE (клон MB15-18C9).

Фенотипирование Treg клеток осуществлялось с помощью обнаружения на их поверхности FOXP3 (англ. forkhead box P3), CD25<sup>+</sup> (альфа-цепь рецептора IL-2).

С помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter Navios, США) и программного обеспечение Kaluza Analysis (Beckman) происходил сбор и анализ данных.

### **Определение клеточного иммунитета по секреции INF- $\gamma$**

Для проведения данного исследования использовался 96-луночный круглодонный планшет, в который вносили 50 мкл плазмы, 150 мкл среды RPMI-1640 и смесь пептидов (15 а.к.), полностью перекрывающих последовательность S и N-белков SARS-CoV-2. Далее приступали к инкубированию при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> в течении 24 часов, после чего методом проточной цитометрии (Beckman Coulter, США) происходил отбор 100 мкл супернатанта и определение концентрации INF- $\gamma$ . [5].

### **Определение концентрации миелопероксидазы (MPO)**

Миелопероксидаза (MPO) – это фермент, альфа-2/бета-2 гетеромультимер, относящийся к гем-содержащим белкам, который экспрессируется на всех клетках миелоидного ряда. Избыточное количество MPO присутствует в гранулах нейтрофилов. MPO является главным ферментом расщепления фагоцитированных частиц, который осуществляет свою функцию путем образования сильного окислителя – гипохлорит-аниона. Тем не менее, при многих воспалительных заболеваниях избыток нейтрофильной MPO вызывает повреждение тканей.

Концентрация MPO определяется с помощью набора Hbt human MPO ELISA (Hucult Biotech, Нидерланды) в плазме человека, методом иммуноферментного анализа. Референсный нормативный диапазон для концентрации фермента миелопероксидазы составляет  $2,56 \pm 0,33$  нг/мл согласно данным производителя.

### **Определение уровня Д-димера**

Д-димер образуется в результате плазменной деградации молекулы фибрина. Повышение уровня Д-димера является ключевым показателем тромботических событий, которые указывают на избыточный фибринолиз после активации системы коагуляции.

Уровень Д-димера определялся методом латекс-теста TECHNOLEIA® D-Dimer Latex Kit (набор Technoclone, Austria). В основе теста лежит взаимодействие антител к Д-димеру, которые фиксированы частицах латекса.

### **Определение агрегационной способности тромбоцитов**

Адгезивно-агрегационная функция тромбоцитов — это способность тромбоцитов к прилипанию к поврежденной сосудистой стенке с образованием агрегатов. Активировать тромбоциты могут вещества, выходящие из поврежденной стенки сосудов (АДФ, коллаген), а также ристоцети, адреналин, фактор Виллебранда. Активированные тромбоциты усиливают образование фибрина рядом с поврежденным сосудом.

Принцип метода. Агрегация тромбоцитов проводилась количественным методом с помощью агрегометра АРАСТ 4004 (LABiТес®, Германия) по методу Born, с графической регистрацией интенсивности и динамики агрегации при перемешивании их со стимуляторами агрегации в кювете агрегометра. Состав набора: АДФ, коллаген, ристоцетин, адреналин.

Референсные значения: агрегация тромбоцитов с АДФ: 55–75%; агрегация тромбоцитов с ристоцетином: 55–90%; агрегация тромбоцитов с адреналином: 65-90%; агрегация тромбоцитов с коллагеном: 50–75%.

### **Определение концентрации фактора фон Виллебранда**

Фактор Виллебранда (vWF) – многофункциональный адгезивный гликопротеин, который обеспечивает прилипание тромбоцитов к поврежденному эндотелию сосудов, путем взаимодействия с мембранными рецепторами тромбоцитов, а именно GPIIb/IIIa и GPIb. Синтез vWF происходит в эндотелиоцитах, а именно в тельцах Вейбеля-Паладе, мегакариоцитах (альфа гранул тромбоцитов), а также субэндотелии соединительной ткани. Циркулирует в кровотоке в комплексе с фактором VIII. Высокие уровни vWF в плазме считается маркером эндотелиопатии. vWF определяется по агглютинации тромбоцитов (ристоцетин-зависимая агрегация тромбоцитов). Определение количества vWF выполняли с помощью МФА (иммунофлуоресцентный анализ) TECHNOZYM® (набор Technoclone, Austria).

Диапазон референсных значений vWF:Ag определен как 0,5–1,5 ЕД/мл (50-150 %).

Стандартизация: для калибровки были использованы калибровочные материалы Международного стандарта для FVIII и vWF в плазме.

### **Определение уровня концентрации и активности ADAMTS-13**

ADAMTS-13 – фермент, который расщепляет высокомолекулярные мультимеры vWF, отщепляя части от мультимерной молекулы. Металлопротеиназа ADAMTS-13 необходима для уравнивания чрезмерной активности vWF, а при недостатке ADAMTS-13 может накапливаться высокомолекулярный vWF и развиваться тяжелое аутоиммунное заболевание – тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП). Недостаток фермента может быть вследствие мутации в активном центре и/или присутствия аутоантител - ингибитора ADAMTS-13.

Уровень антигена ADAMTS-13 и его активность определяли методом МФА с помощью набора TECHNOZYM® (набор Technoclone, Austria) ADAMTS-13, материалом для исследования служила плазма крови. С помощью данного метода одновременно определяли количество и активность ADAMTS-13 в образце исследования поэтапно в едином протоколе. Для этого образцы вносили в лунки планшета, далее кинетически измеряли активность, а потом количество протеазы.

Диапазон нормальных значений согласно данным производителя для ADAMTS-13:Ag составляет 0,41-1,41 ЕД/мл, для активности ADAMTS-13:Ac 0,4-1,3 ЕД/мл.

### **Количественное определение ингибитора ADAMTS-13**

Материалом для определения концентрации ингибитора ADAMTS-13 служила цитратная плазма. Количество ингибитора определяли методом иммунофлуоресцентного анализа с помощью набора TECHNOZYM® (набор Technoclone, Austria). Согласно данным производителя, нормальным референтным диапазоном для ингибитора ADAMTS-13 являлась концентрация менее 15 ЕД/мл.

Стандартизация: стандарты прокалиброваны по образцу плазмы, который содержал очень высокие титры IgG антител к ADAMTS-13 (разведение 1:200 референтного образца плазмы определяли как содержание аутоантител концентрацией 100 Ед/мл).

### **Определение уровня антитромбина III**

Антитромбин — это природный антикоагулянт, который ингибирует активированные факторы свертывания, а именно тромбин (фактор IIa), фактор Ха и, в меньшей степени, фактор XIa и фактор IXa. Количество антитромбина определяли колориметрическим методом с помощью набора TECHNOCHROM® AT III (набор Technoclone, Austria).

Диапазон нормальных значений согласно данным производителя 80–120%.

### **Определение протеина С**

Протеин С относится к группе антикоагулянтов. В норме является неактивным. Избыточное образование тромбина активирует протеин С, который совместно с протеином S инактивирует Va и VIIIa факторы свертывания, тем самым предотвращает тромбообразование.

Количество протеина С определяли иммуноферментным методом с помощью набора TECHNOCHROM® Protein C (набор Technoclone, Austria).

Диапазон референсных значений 70-130 %.

## **2.4 Статистическая обработка данных**

Систематизация и хранение полученных данных выполнялась с помощью электронных таблиц Microsoft Office Excel (2021). Для статистической обработки данных применяли пакет программы Jamovi (The jamovi project, Австралия, версия 2.3.22). Для расчета описательных статистик использовались средние величины (M) и среднеквадратические отклонения (SD), медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q<sub>1</sub>–Q<sub>3</sub>), в % частоты встречаемости и в абсолютных значениях (n). При ненормальном распределении данных определялись медианы с интерквартильным размахом, для оценки различий в группах применялся метод непараметрической статистики (тест Манна-Уитни). Проверка различия между статистическими величинами использовалась путем расчета точного критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при значении достоверности  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Исследование маркеров тромбовоспаления в системе «мать-плод»

#### Результаты лабораторных исследований беременных женщин

С целью определения особенности изменения системы гемостаза в острый период COVID-19 и после выздоровления проведено комплексное исследование 152 беременных женщин, которые были разделены на три группы, группу исследования составили 62 беременные женщины после коронавирусной инфекции, группу сравнения 45 беременных в острый период инфицирования и контрольную группу составили 45 практически здоровых беременных женщин.

Медианы лабораторных показателей обследованных беременных представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Данные изученных лабораторных показателей

Показатель	Группа I n = 62	Группа II n = 45	Контрольная группа n = 45	P, U-test
Фибриноген, г/л	6,11 [5,72-6,43]	7,41 [6,2-8,98]	4,01 [3,81-4,72]	<0,001* <0,001**
АЧТВ, сек	28,6 [26,7-31,0]	29,1 [26,9-31,7]	27,8 [25,8-30,8]	0,314* 0,457**
ПВ, сек	10,4 [10,0-11,0]	10,8 [10,0-11,3]	11,2 [10,0-11,9]	0,514* 0,673**
ТВ, сек	13,2 [11,3-14,6]	13,7 [11,8-15,1]	14,1 [11,2-15,7]	0,514* 0,498**
Д-димер, нг/мл	1567 [1194-1919]	2058 [1665-3198]	1467 [1167-1812]	0,238* <0,001**
Агрегация с:				
АДФ, %	73 [64-81]	98 [74-103]	63 [57-71]	<0,001* <0,001**
Ристомицином, %	81 [59-98]	89 [77-107]	65 [53-78]	<0,001* <0,001**
Коллагеном, %	75 [66-87]	94 [76-102]	66 [57-72]	<0,001* <0,001**



Продолжение Таблицы 3.1

Адреналином, %	89 [63-98]	97 [68-113]	72 [62-81]	<0,001* <0,001**
vWF:Ag, Ед/мл	2,29 [1,78-3,22]	2,31 [2,17-2,61]	1,78 [1,57-1,9]	< 0,001* <0,001**
ADAMTS-13:Ac, Ед/мл	0,758 [0,487-0,814]	0,514 [0,41-0,68]	0,696 [0,538-0,859]	0,003* 0,843**
ADAMTS-13:Ag, Ед/мл	0,752 [0,587-0,82]	0,39 [0,26-0,45]	0,788 [0,684-0,894]	0,613* <0,001**
ADAMTS-13:i, Ед/мл	4,7 [3,7-6,4]	6,21 [2,78-10,1]	2,8 [1,2-4,3]	< 0,001* <0,001**
ADAMTS13:Ag/vWF:Ag	0,347 [0,21-0,49]	0,15 [0,11-0,21]	0,49 [0,43-0,59]	0,001* <0,001**
vWF:Ag/ADAMTS13:Ag	2,87 [2,03-4,76]	6,51 [4,74-9,22]	2,03 [1,7-2,3]	< 0,001* <0,001**
Антитромбин III, %	90,2 [80,2-100,5]	71,3 [66,4-90,5]	92,8 [86,3-104,5]	0,374* <0,001**
Протеин С, %	96,0 [78-113,1]	67,2 [56,2-87,4]	98,6 [84-121,1]	0,396* <0,001**
МРО, нг/мл	11,84 [6,63-26,12]	21,2 [13,7-34]	12,78 [7,92-18,38]	0,837* 0,002**

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным интервалом [Q<sub>1</sub>—Q<sub>3</sub>];

\*значимость различий между группой 1 и контрольной группой;

\*\*значимость различий между: группой 2 и контрольной группой

При оценке рутинных коагуляционных тестов (АЧТВ, ПВ, ТВ) у беременных после перенесенной коронавирусной инфекции не было достоверной разницы по сравнению с беременными здоровой группы, также не было разницы и у беременных в острый период COVID-19 по сравнению со здоровыми.

Однако выявлены значительные различия между беременными с перенесенной коронавирусной инфекцией и контрольной группой при оценке концентрации фибриногена. Так у беременных группы I концентрация фибриногена была выше по сравнению с контрольной группой (6,11 [5,72; 6,43] г/л против 4,01 [3,81; 4,72] г/л соответственно,  $p < 0,001$ ), аналогично и у беременных в острый период COVID-19 уровень фибриногена гораздо отличался и был выше по

сравнению со здоровыми беременными (7,41 [6,2; 8,98] г/л против 4,01[3,81; 4,72] г/л соответственно,  $p < 0,001$ ) (рисунок 3.1).

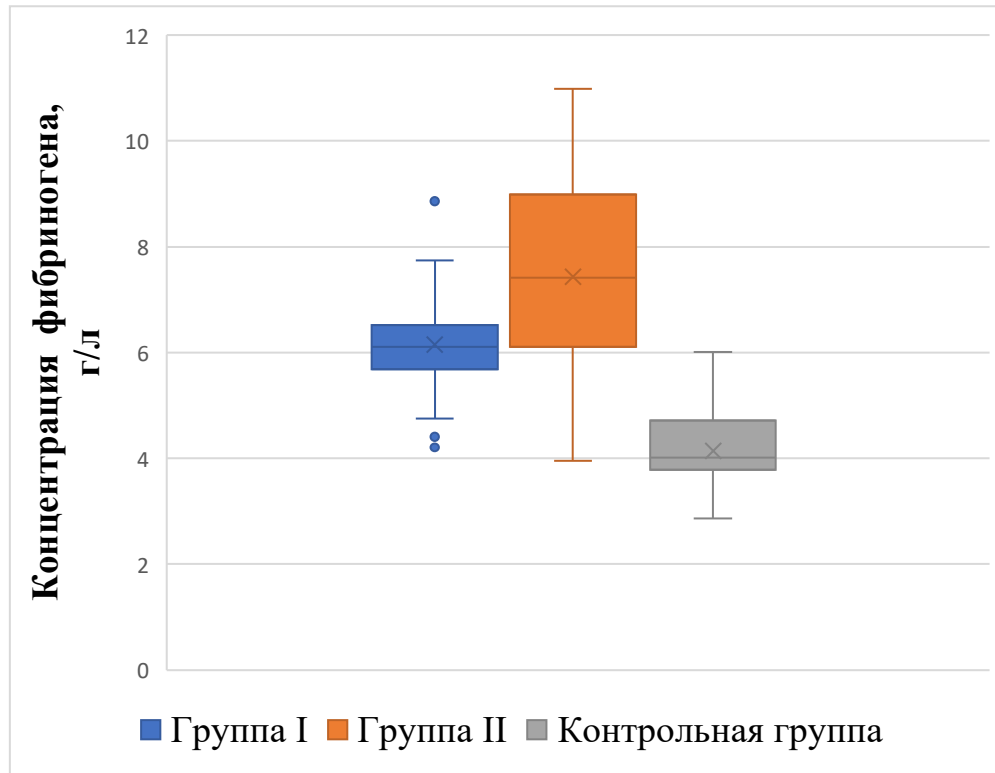


Рисунок 3.1 – Концентрация фибриногена у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

Также с целью оценки тромбогенного потенциала всем беременным женщинам было назначено измерение уровня Д-димера. Медиана Д-димера у беременных женщин в острый период COVID-19 равна 2058 [1665; 3198] мг/мл, что достоверно выше показателей беременных без COVID-19 в анамнезе, 1467 [1167; 1812] мг/мл ( $p < 0,001$ ). Высокие значения Д-димера показывают серьезные риски развития тромботических осложнений на фоне COVID-19. Однако после выздоровления уровень Д-димера снижается и статистически не отличается по сравнению с контрольной группой (рисунок 3.2).

Для оценки функциональной активности тромбоцитов проводился анализ на агрегацию тромбоцитов. Так у беременных как в острый период COVID-19, так и у реконвалесцентов была значительна увеличена агрегация тромбоцитов со

стимуляторами агрегации: АДФ ( $p < 0,001$ ), ристомицином ( $p < 0,001$ ), коллагеном ( $p < 0,001$ ), адреналином ( $p < 0,001$ ) по сравнению со здоровыми беременными.

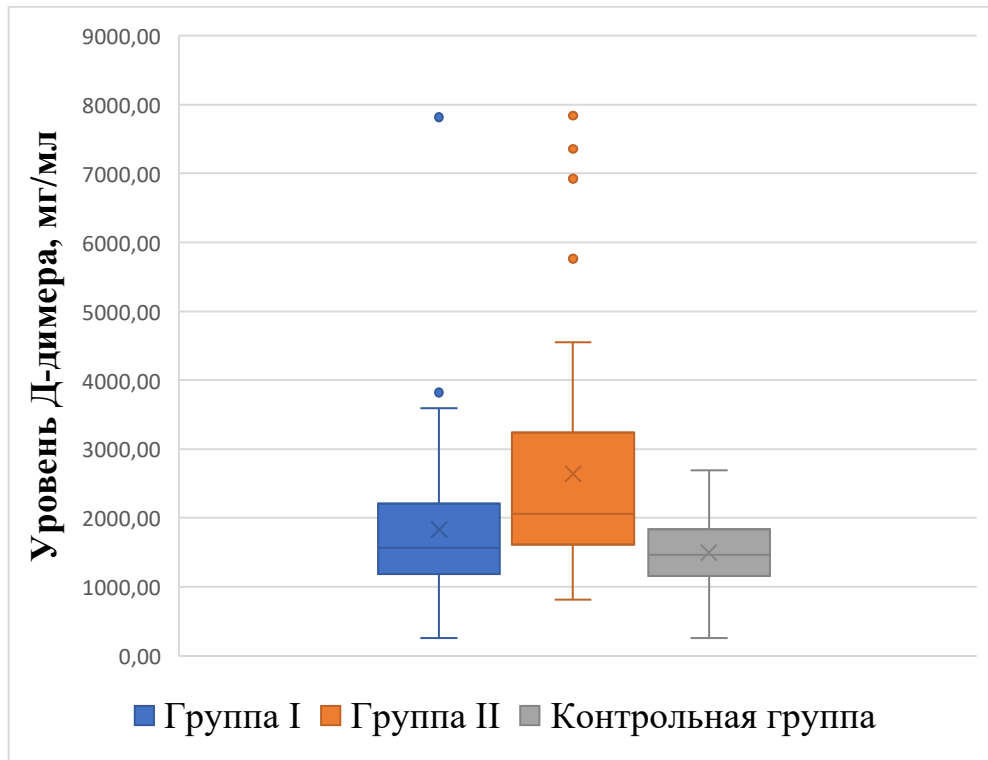


Рисунок 3.2 – Концентрация Д-димера у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

Наше исследование при измерении концентрации антигена фактора фон Вилебранда (vWF:Ag) показало достоверное различие в обследуемых группах. Так медиана концентрации vWF:Ag у беременных после перенесенной коронавирусной инфекции была равна 2,29 [1,78-3,22] Ед/мл, что значимо отличалась и была выше по сравнению с показателями контрольной группы 1,78 [1,57-1,9] Ед/мл ( $p < 0,001$ ). Более того и у пациенток в острый период болезни COVID-19 показатели были выше по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,001$ ).

Помимо всего прочего интерес представляют межиндивидуальные различия в концентрации vWF:Ag. Так у беременных, после коронавирусной инфекции в анамнезе во время беременности значения колебались от 1,063 до 6,074 Ед/мл, таким образом у 80,6 % (50/62) значения vWF:Ag были выше верхней границы нормы, а у беременных в острой фазе инфицирования (II группа) vWF:Ag был выше

нормы в 95,5 % (43/45) случаев и только у 48,9 % (22/45) беременных контрольной группы содержание vWF:Ag была выше нормы (рисунок 3.3).

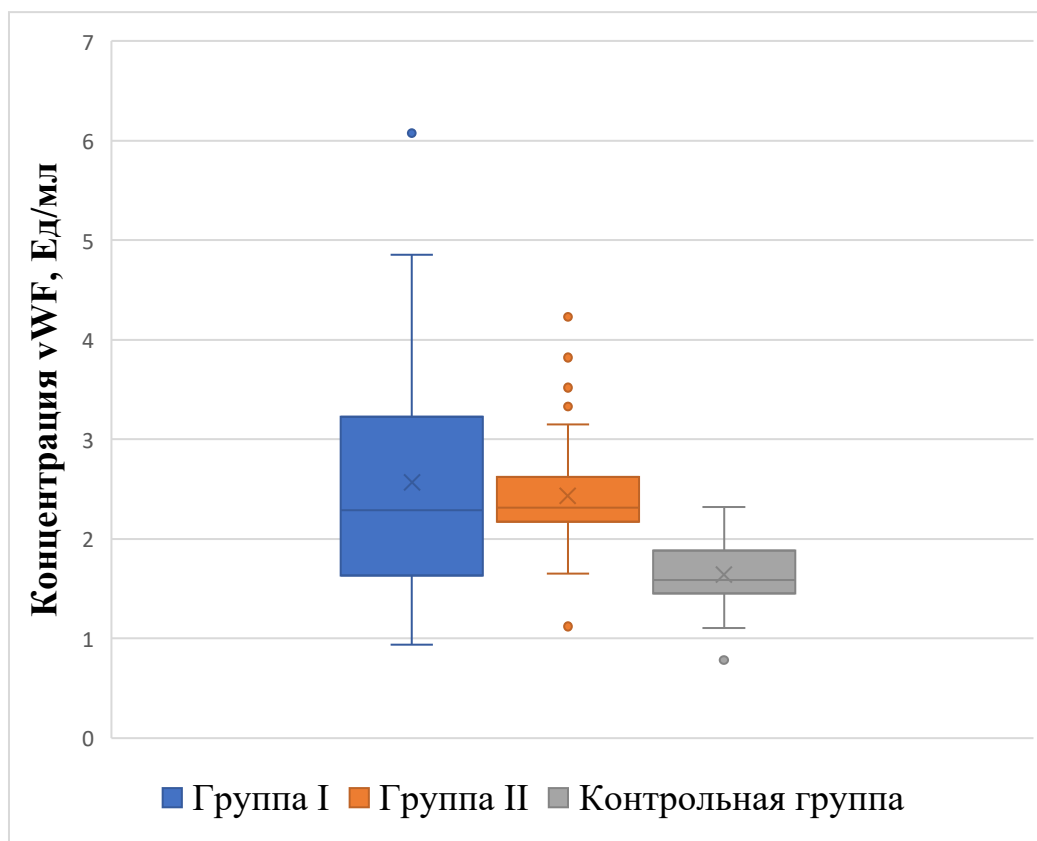


Рисунок 3.3 – Концентрация антигена фактора фон Виллебранда (vWF) у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

При анализе концентрации ADAMTS-13 у беременных женщин группы I медиана концентрации составила 0,752 [0,587; 0,82] ЕД/мл, при этом только у 6/62 (9,7%) концентрация была ниже нормальных показателей. Подобные результаты были получены и в контрольной группе, где показатель был в пределах 0,788 [0,684; 0,894], при этом только у 2/45 (4,5%) беременных он был ниже референсных значений. Однако у 25/45 (55,6%) беременных в острый период COVID-19 концентрации ADAMTS-13 были ниже нормальных показателей, а также достоверно ниже, чем у контрольной группы (0,39 [0,26; 0,45] ЕД/мл против 0,788 [0,684; 0,894] ЕД/мл,  $p < 0,001$ ) (рисунок 3.4).

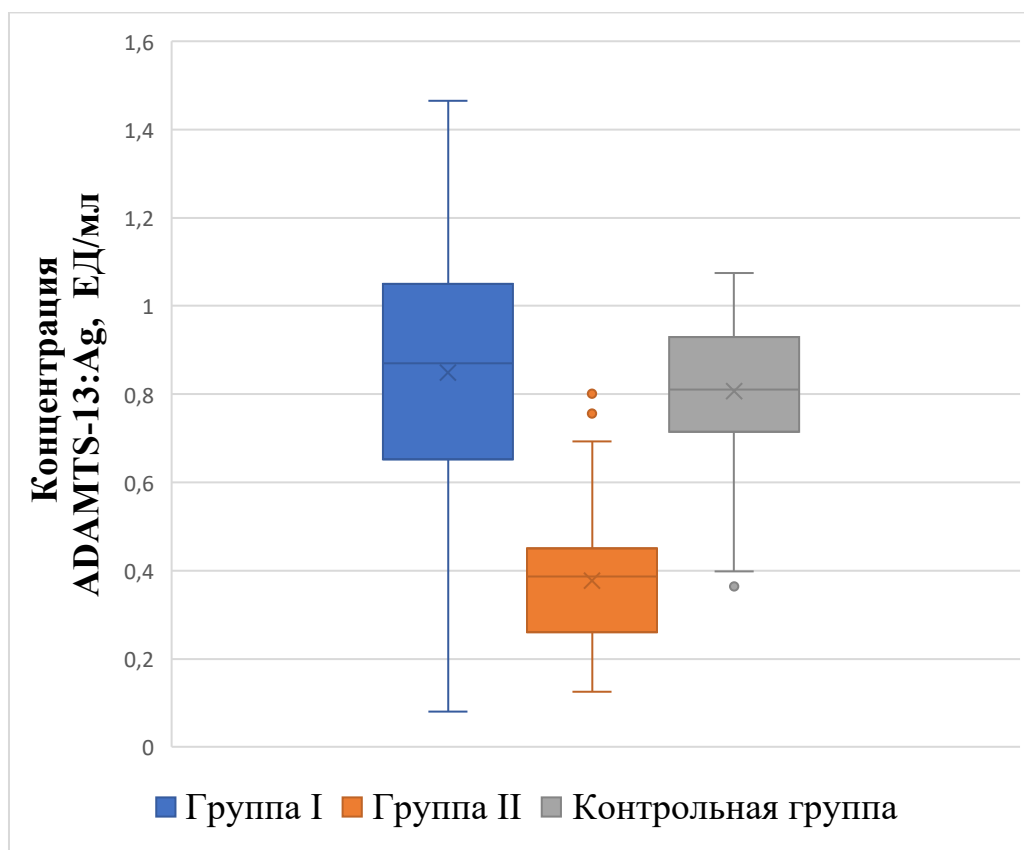


Рисунок 3.4 – Концентрация антигена ADAMTS-13:Ag у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

Медина активности ADAMTS-13 у беременных женщин после перенесенной коронавирусной инфекции равна 0,758 [0,487; 0,814] ЕД/мл и только у 4/62 (6,5%) пациенток показатели были ниже референсных значений. В группе беременных в острый период COVID-19 медиана активности ADAMTS-13 составила 0,54 [0,41; 0,68] ЕД/мл, а у 11/45 (24,5%) пациенток показатели были ниже нормальных значений. В контрольной группе медиана активности ADAMTS-13 составила 0,696 [0,814; 0,859] ЕД/мл и только у 2/45 (4,5%) показатели были ниже референсных значений. Таким образом достоверной разницы не в активности ADAMTS-13:Ac среди беременных реконвалесцентов по сравнению со здоровыми не было выявлено, однако активность металлопротеиназы у беременных в острой фазе инфицирования была достоверно ниже по сравнению с контрольной группой ( $p=0,003$ ) (рисунок 3.5).

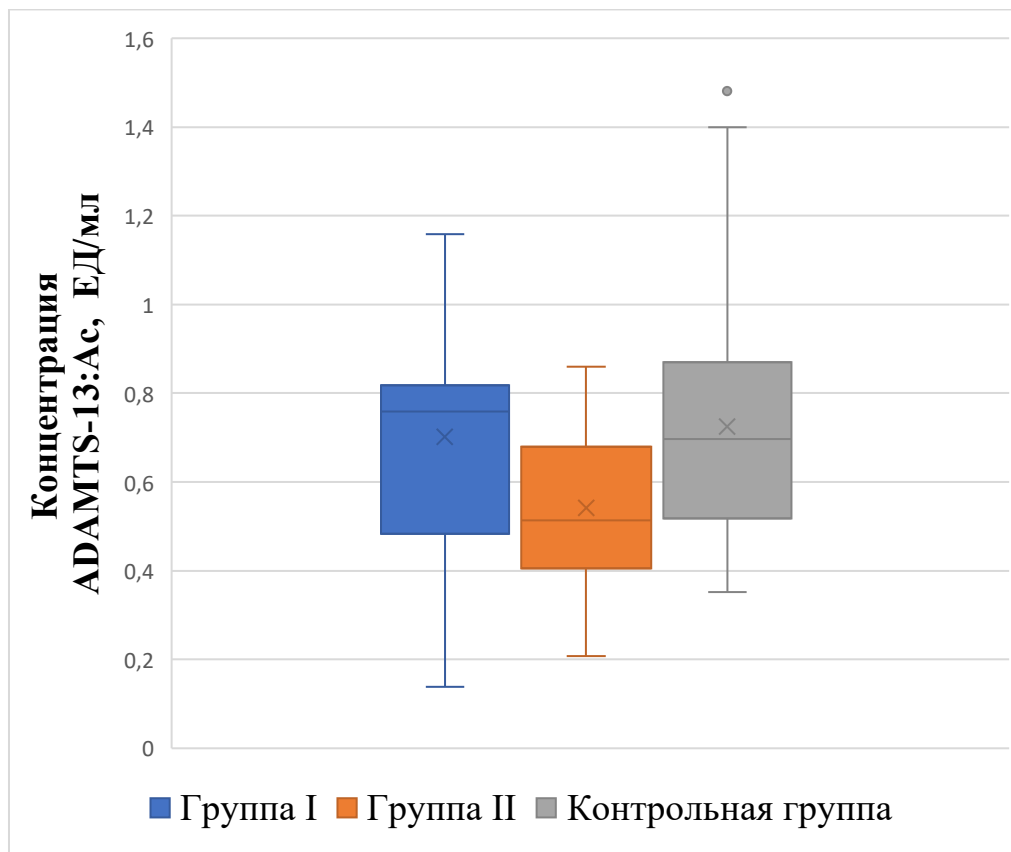


Рисунок 3.5 – Концентрация активности ADAMTS-13:Ag у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

Оценка содержания антител к металлопротеиназе ADAMTS-13 (ADAMTS-13:i) показала статистические различия между беременными из группы исследования и контрольной, а также между II группой по сравнению с контрольной. Так в контрольной группе медиана концентрации антител к ADAMTS-13 составила 2,8 [1,2; 4,3] Ед/мл, что существенно ниже, чем у беременных после COVID-19 – 4,7 [3,7; 6,4] Ед/мл ( $p < 0,001$ ) и у беременных в острый период болезни 6,21 [2,78; 10,1] Ед/мл ( $p < 0,001$ ) (рисунок 3.6). При этом у 9/45 (20%) беременных в острый период COVID-19 показатели ингибитора к металлопротеиназе были ниже референсных значений, а у постковидных только 2/62 показатели были ниже нормальных значений.

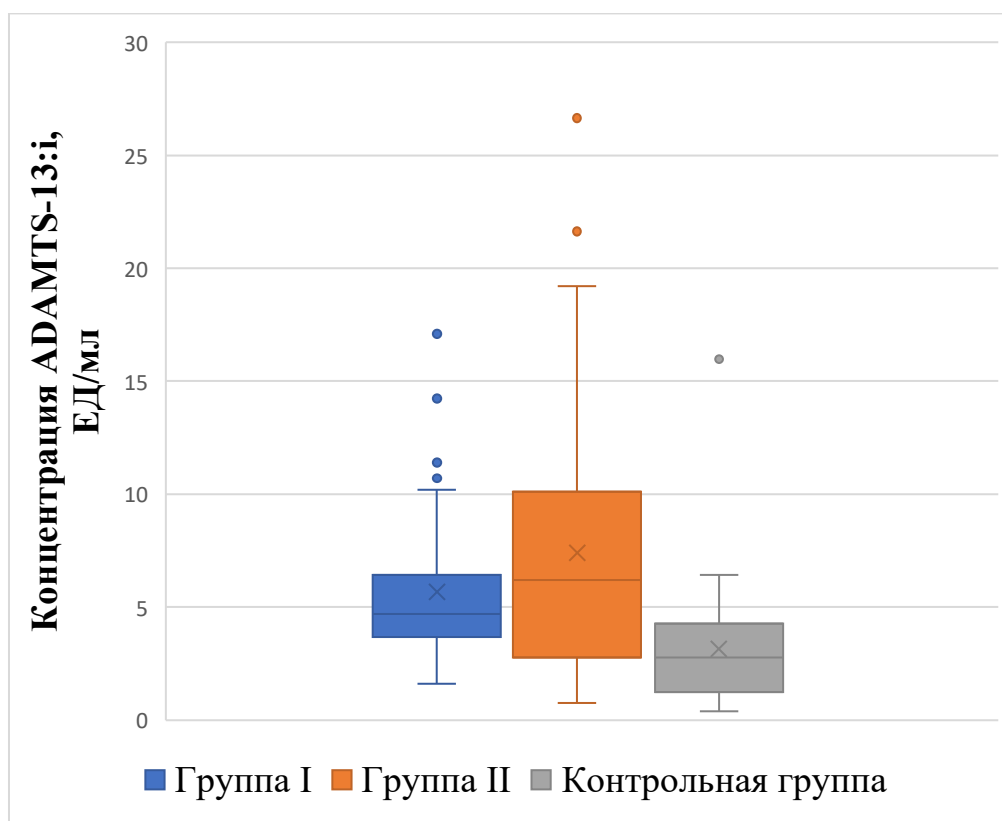


Рисунок 3.6 – Концентрация ингибитора ADAMTS-13:i у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

Помимо содержания антигенов ADAMTS-13 и vWF в нашем исследовании были рассчитаны соотношения между этими показателями. Так у беременных женщин в острый период COVID-19 (группа II) в более чем половине случаев 25/45 (55,6%) наблюдали рост концентрации vWF:Ag с одновременным снижением концентрации ADAMTS-13, при этом медиана соотношения ADAMTS-13:Ag/vWF:Ag была равна 0,15 [0,11; 0,21], что значительно ниже по сравнению с контрольной группой 0,49 [0,43; 0,59] ( $p < 0,001$ ).

Однако, у беременных реконвалесцентов были выявлены менее выраженные различия, где только у 5/62 пациенток (8%) было определено повышение значений vWF:Ag с одновременным понижением содержания ADAMTS-13, а медиана соотношения ADAMTS-13:Ag/vWF:Ag была равна 0,347 [0,21; 0,49], но в целом

показатели были ниже по сравнению с контрольной группой ( $p=0,001$ ) (рисунок 3.7).

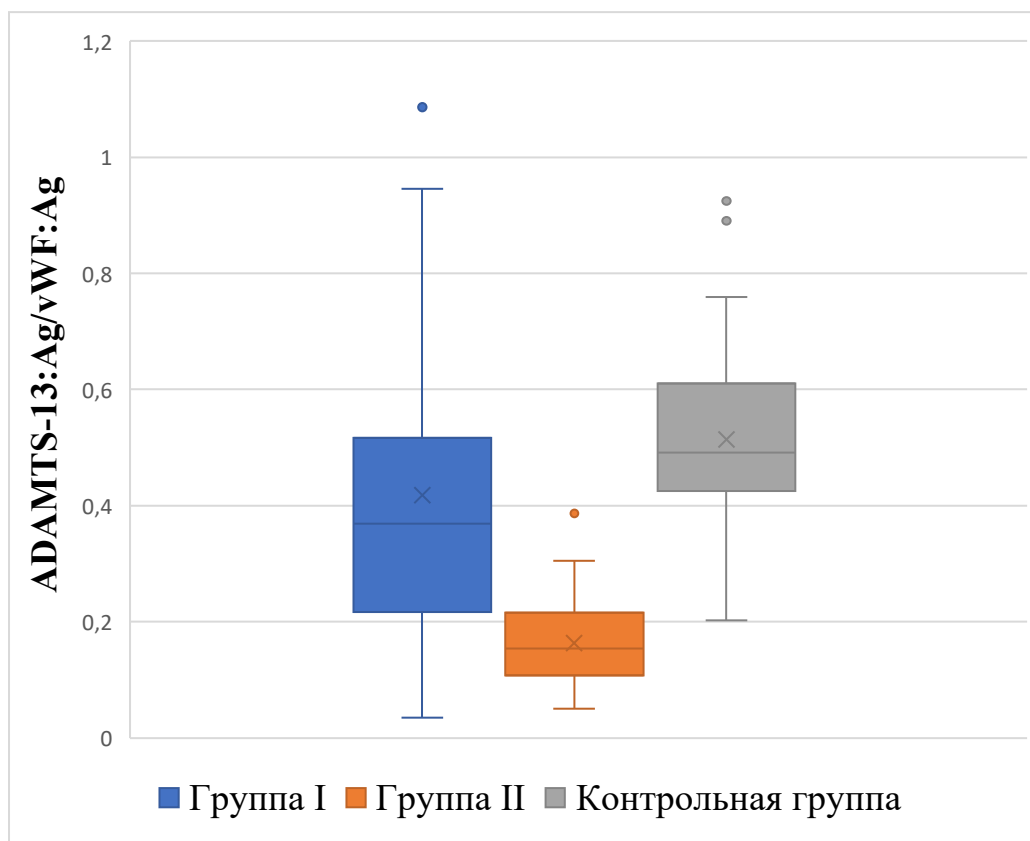


Рисунок 3.7 – Отношение ADAMTS-13:Ag/vWF:Ag у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

Оценка уровня естественных антикоагулянтов у беременных, после перенесённой коронавирусной инфекции, показало снижение АТ – у 24% (15/62) пациенток (рисунок 3.8 А), РС – у 13% (8/62) (рисунок 3.8 Б), при этом показатели статистически не отличались от показателей контрольной группы, у которых медиана АТ была равна 92,8%, а РС – 98,6%.

Однако у беременных в острый период COVID-19 АТ был ниже у 53% (24/45) пациенток, РС у 56% (25/45) и обнаружено статистически значимое снижение активности естественных антикоагулянтов по сравнению с контрольной группой ( $p<0,001$ ), при этом медиана АТ у беременных в острый период COVID-19 была равна 71,3 [66,4 – 90,5] %, а РС – 62,2 [56,2 – 87,4] %.



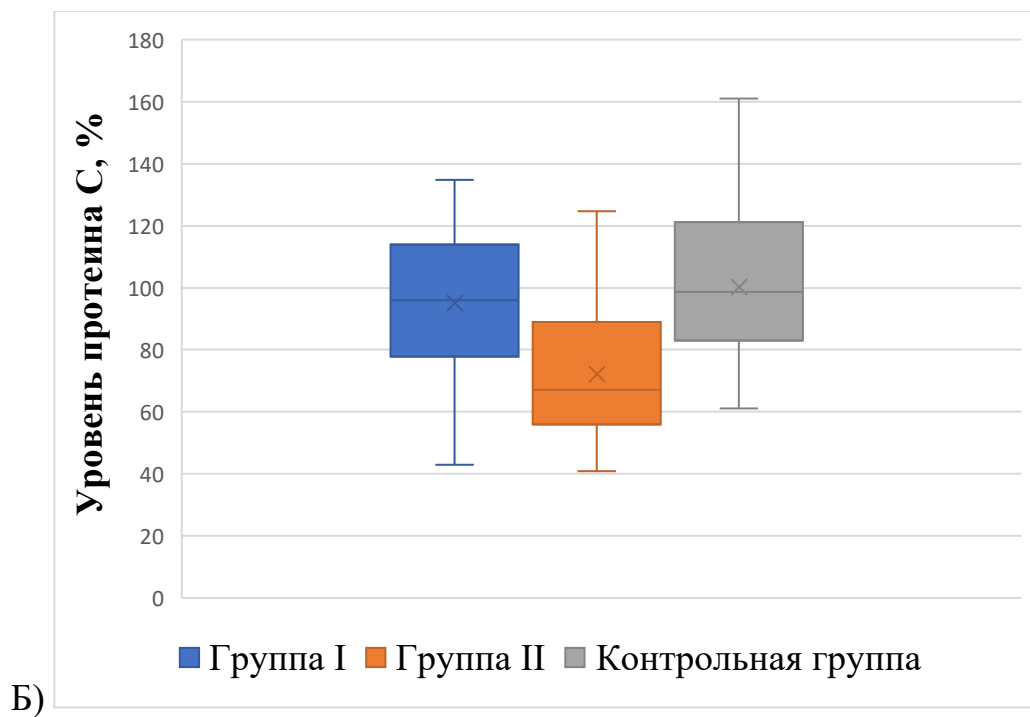
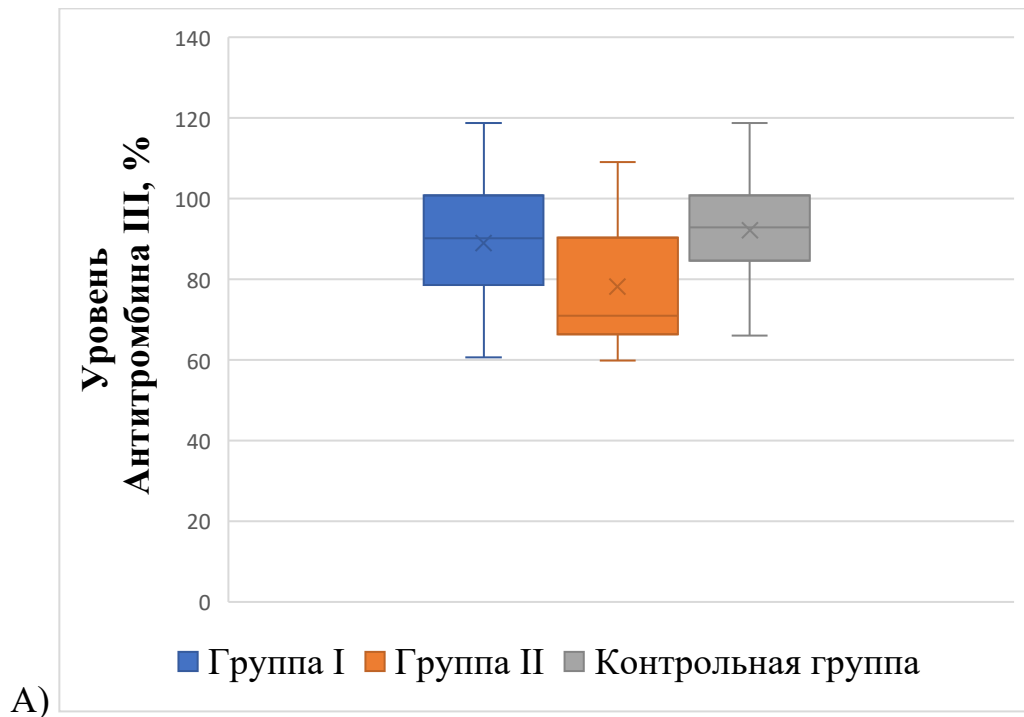


Рисунок 3.8 – Уровни Антитромбина III (А) и Протеина С (Б) у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

При определении уровня миелопероксидазы (МРО) у беременных женщин, были выявлены значимые различия между пациентами II и контрольной группой. Так у беременных в острый период COVID-19 медиана уровня МРО составила 21,2 [13,7; 34] нг/мл, а у здоровых беременных 12,78 [7,92; 18,38] нг/мл, что достоверно ниже ( $p=0,002$ ). Однако при оценке уровня МРО у беременных после перенесенного заболевания медиана была равна 11,84 [6,63; 26,12] нг/мл, что достоверного не отличалось от контрольной группы (рисунок 3.9).

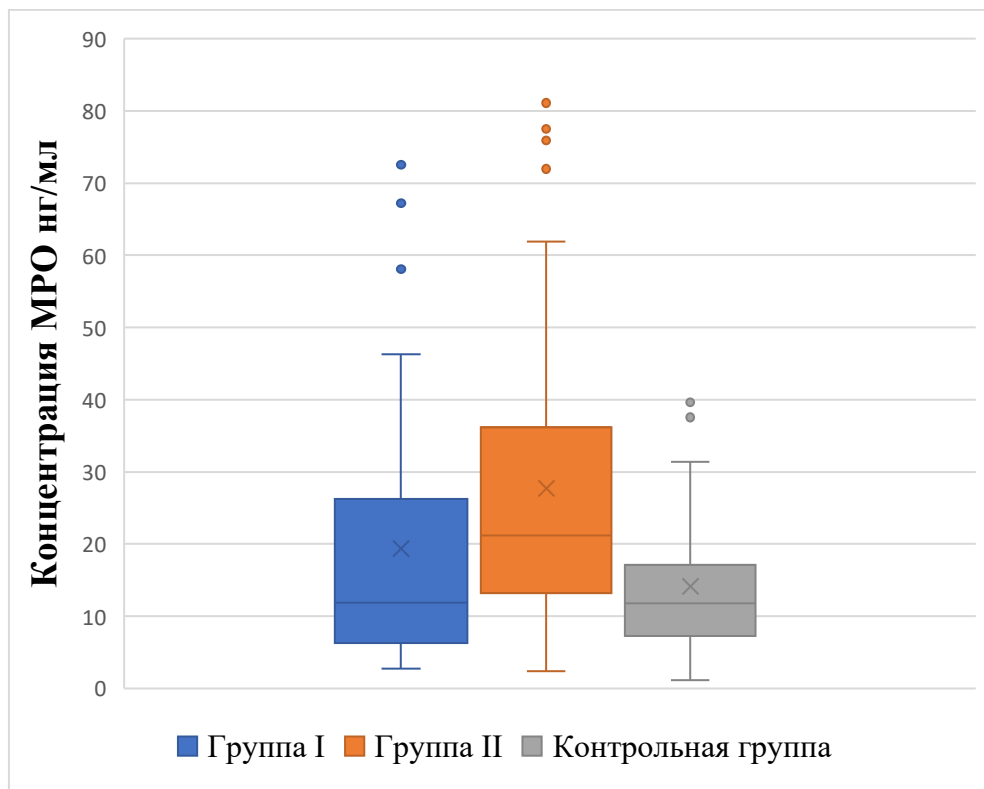


Рисунок 3.9 – Концентрация миелопероксидазы (МРО) у беременных пациенток после коронавирусной инфекции (группа I), в острый период болезни (группа II) и здоровых беременных (контрольная группа)

### Результаты лабораторных исследований пуповинной крови

Для исследования уровней МРО:Ag, ADAMTS-13:Ag, ADAMTS-13:Ac, ADAMTS-13:i, vWF:Ag, а также оси ADAMTS-13/vWF в пуповинной крови новорожденных, беременные женщины были разделены на 2 группы. Основная группа (n=62) беременные женщины после коронавирусной инфекции, контрольная группа (n=45) практически здоровых беременных женщин.

В таблице 3.2 представлены результаты лабораторных показателей в пуповинной крови новорожденных в исследуемых группах.

Таблица 3.2 – Результаты изученных лабораторных показателей в пуповинной крови новорожденных

Показатель	Группа I n = 62	Контрольная группа n = 45	P, U-test
MPO, нг/мл	12,3 [4,6-24,8]	7,1 [2,8-17,4]	0,048
vWF:Ag, Ед/мл	1,42 [1,12-2,07]	1,55 [1,05-2,17]	0,723
ADAMTS-13:Ac, Ед/мл	0,75 [0,64-0,89]	0,79 [0,65-0,91]	0,927
ADAMTS-13:Ag, Ед/мл	0,78 [0,64-0,93]	0,76 [0,63-1,01]	0,583
ADAMTS-13:i, Ед/мл	5,86 [2,97-11,4]	3,99 [1,9-7,77]	0,016
ADAMTS-13:Ac/vWF:Ag	0,48 [0,34-0,73]	0,56 [0,35-0,75]	0,513
ADAMTS-13:Ag/vWF:Ag	0,48 [0,31-0,72]	0,54 [0,32-0,89]	0,507

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным интервалом [Q<sub>1</sub>—Q<sub>3</sub>]

Однородные результаты были получены при определении уровня vWF в пуповинной крови группы I и контрольной. Так медиана значений vWF у новорожденных от матерей перенесших коронавирусную инфекцию была равна 1,55 [1,12; 2,17] Ед/мл, а у новорожденных контрольной подгруппы 1,42 [1,05; 2,07] Ед/мл (рисунок 3.10)

Значимых различий при оценке ADAMTS-13:Ag (рисунок 3.11 А) и ADAMTS-13:Ac (рисунок 3.11 Б) среди новорожденных от матерей группы I по сравнению с контрольной выявлено не было, при этом у 3/62 (5%) новорожденных из I группы концентрации ADAMTS-13 были ниже референсных значений. В контрольной группе медиана ADAMTS-13:Ag составила 0,79 [0,63; 1,01] Ед/мл.

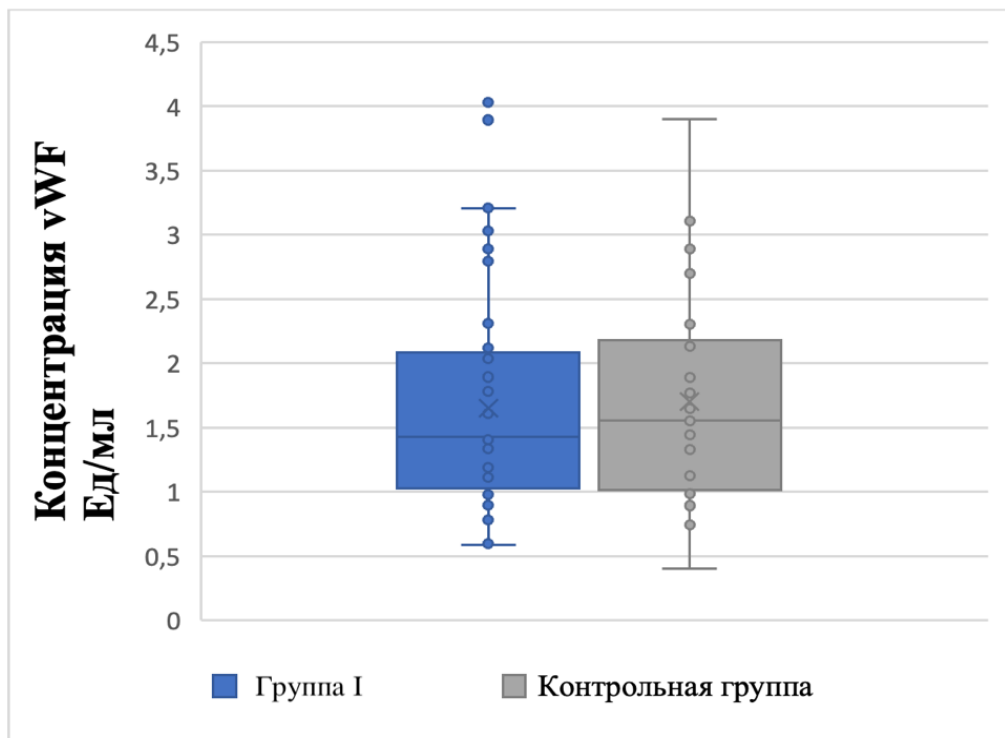


Рисунок 3.10 – Концентрация vWF пуповинной крови новорожденных, матери которых перенесли коронавирусную инфекцию во время беременности (группа I) и контрольной группы

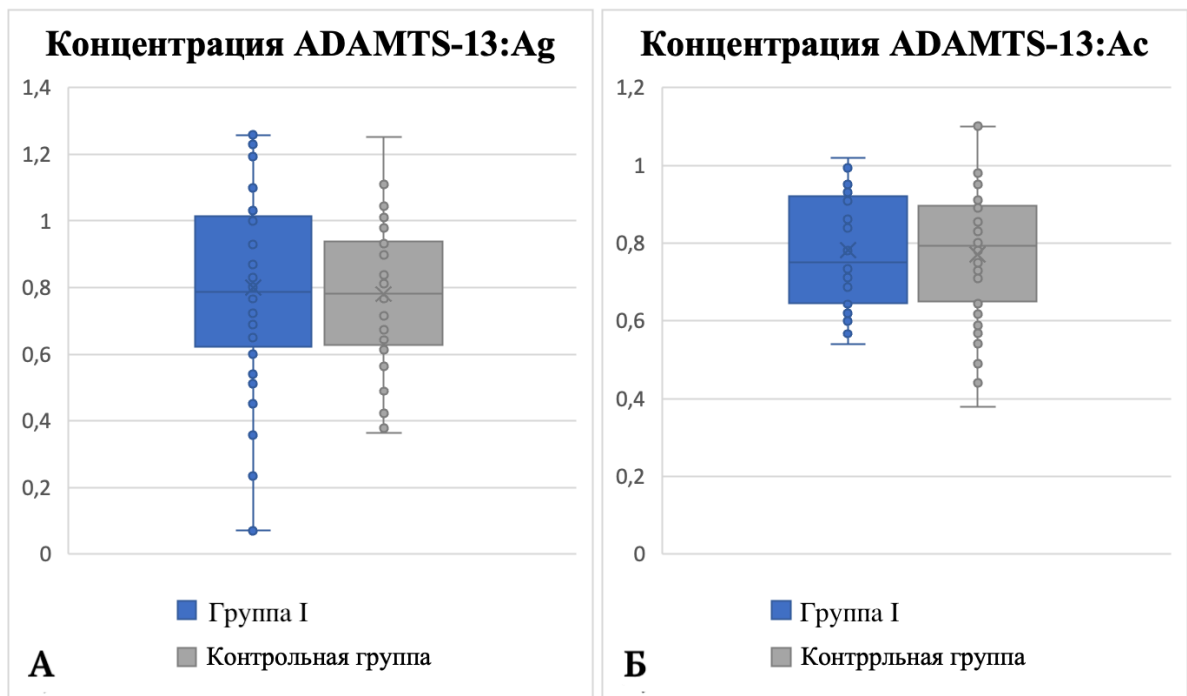


Рисунок 3.11 – Концентрация ADAMTS-13:Ag (А) и ADAMTS-13:Ac (Б) в пуповинной крови новорожденных, матери которых перенесли коронавирусную инфекцию во время беременности (группа I) и контрольной группы

Уровень ингибитора к ADAMTS-13 в пуповинной крови новорожденных от матерей перенесших COVID-19 составил 5,86 [2,97; 11,4] Ед/мл, что не выходило за пределы референсных значений. В контрольной группе уровень ADAMTS13:i был равен 3,99 [1,9; 7,77] Ед/мл, т.е. у всех новорожденных уровень находился в пределах нормальных значений (рисунок 3.12).

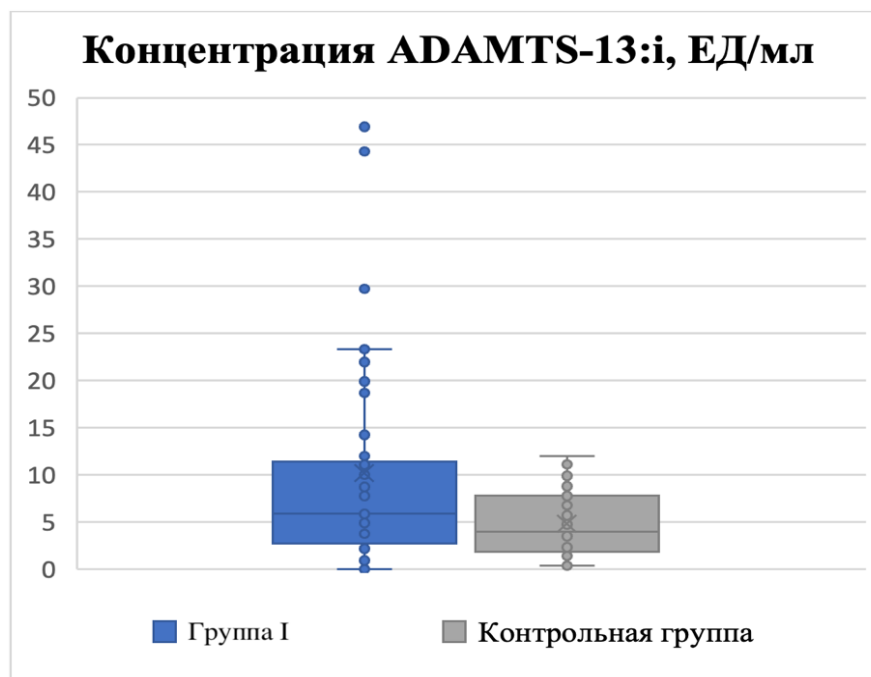


Рисунок 3.12 – Концентрация ADAMTS-13:i пуповинной крови новорожденных, матери которых перенесли коронавирусную инфекцию во время беременности (группа I) и контрольной группы.

В месте с тем исследование соотношения антигенов ADAMTS-13 к vWF не выявило достоверной разницы в основной и контрарной группах ( $p=0,507$ ). Так медиана в основной группе была равна 0,48 [0,31; 0,72], а в контрольной 0,54 [0,32; 0,89] (рисунок 3.13).

При оценке уровня МРО пуповинной крови новорожденных от матерей перенесших COVID-19 (группа I) было выявлено значительное повышение показателей по сравнению с контрольной группой (12,3 [4,6; 24,8] нг/мл против 7,1 [2,8; 17,4] нг/мл  $p=0,048$ ) (рисунок 3.14).

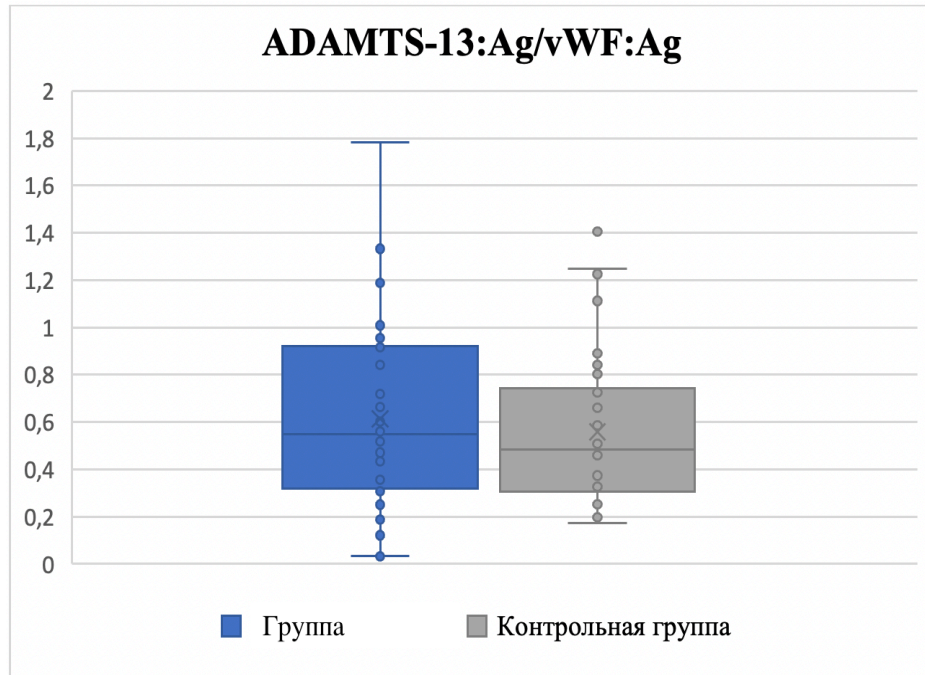


Рисунок 3.13 – Отношение ADAMTS-13:Ag/vWF:Ag пуповинной крови новорожденных, матери которых перенесли коронавирусную инфекцию во время беременности (группа I) и контрольной группы

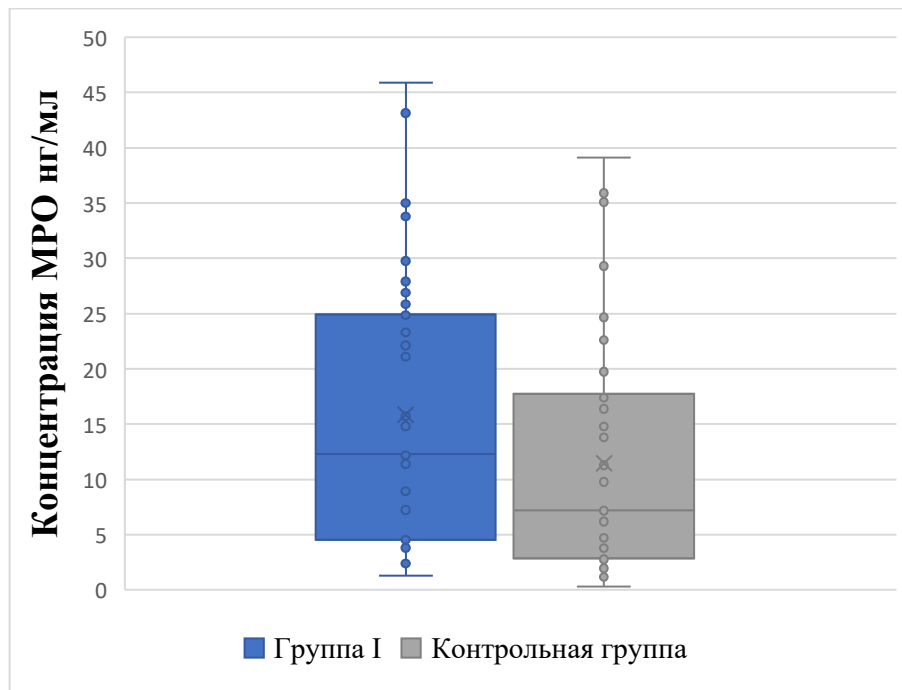


Рисунок 3.14 – Концентрация МРО пуповинной крови новорожденных, матери которых перенесли коронавирусную инфекцию во время беременности (группа I) и контрольной группы

### 3.2. Сравнительный анализ концентрации цитокинов в плазме матери и новорожденного, после COVID-19 во время беременности и корреляции с маркерами активации иммунокомпетентных клеток

В таблице 3.3 и 3.4 представлен сравнительный анализ концентрации цитокинов и хемокинов в периферической крови матерей и пуповинной крови их новорожденных.

Таблица 3.3 – Концентрация цитокинов и хемокинов в периферической крови беременных

Показатель	Группа I n=62		Контрольная группа n = 45		P, U-test
	Me	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	Me	Q <sub>1</sub> –Q <sub>3</sub>	
CXCL 10	38,3	18,3-41,9	26,7	9,4-29,1	0,087
GM-CSF	23,8	8,7-33,9	28,3	11,6-41,7	0,473
IFN- $\gamma$	6,7	3,2.-17,2	6,8	3,5-12,9	0,636
IL-1 $\alpha$	3,9	1,9-8,3	1,7	1,2-5,3	0,523
IL-6	9,1	3,3-22,6	5,1	1,7-10,7	0,104
IL-8	2,9	1,7-9,3	2,4	1,7-8,2	0,874
IL-10	7,8	3,1-14,7	5,2	1,8-9,7	0,372
MIP-1 $\beta$	144,3	117,3-187,5	125,3	84,8-178,3	0,658
TNF $\alpha$	8,4	6,9-15,6	9,6	4,3-17,9	0,875

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным интервалом [Q<sub>1</sub>—Q<sub>3</sub>]

При определении содержания цитокинов и хемокинов в периферической крови беременных женщин на момент родоразрешения статистически значимой

разницы между перенесенными коронавирусом инфекцию и здоровыми не было обнаружено.

Таблица 3.4 – Содержание цитокинов и хемокинов обследуемых новорожденных

Показатель	Группа I n=62		Контрольная группа n = 45		P, U-test
	Me	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub>	Me	Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub>	
CXCL 10	68,4	37,1-92,6	25,1	9,8-32,1	<0,001
GM-CSF	23,3	15,4-47,1	19,2	14,6-28,7	0,582
IFN- $\gamma$	6,3	3,2.-11,9	4,4	3,5-6,9	0,436
IL-1 $\alpha$	6,5	1,8-21,3	1,8	1,2-5,3	0,018
IL-6	13,8	6,1-38,4	2,9	1,3-10,1	0,032
IL-8	52,7	23,1-418,3	21,9	6,7-116	0,061
IL-10	12,5	7,7-49,1	5,4	2,1-13	0,003
MIP-1 $\beta$	501,2	247,6-1648,1	154,8	136,1-287,7	<0,001
TNF $\alpha$	25,2	16,9-28,7	12,1	9,1-18,3	<0,001

Примечание: Данные представлены в виде медианы (Me) с интерквартильным интервалом [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Однако при исследовании пуповинной крови новорожденных было обнаружено, что в случае перенесенной коронавирусной инфекции концентрации провоспалительных цитокинов и хемокинов были значительно выше по сравнению с новорожденными контрольной группы (рисунок 3.15).

Так медиана концентрации CXCL 10 в группе I была равна 68,4 [31,1-92,6], что существенно выше чем у новорожденных контрольной группы 25,1 [9,8-32,1] (p<0,001). Концентрация IL-1a у новорожденных от матерей, переболевших коронавирусной инфекцией, была равна 6,5 [1,8 – 21,3], а у новорождённых от



контрольной группы 1,8 [1,2-5,3] ( $p=0,018$ ). Также концентрации IL-6 у новорожденных группы I были достоверно выше по сравнению с новорожденными контрольной группы (13,8 [6,1-38,4] против 2,9 [1,3-10,1]  $p=0,032$ ). Достоверные различия были также в концентрациях IL-10 ( $p=0,003$ ), TNF-a ( $p<0,001$ ), а также MIP-1 $\beta$  ( $p<0,001$ ) у новорожденных группы I по сравнению с контрольной группой.

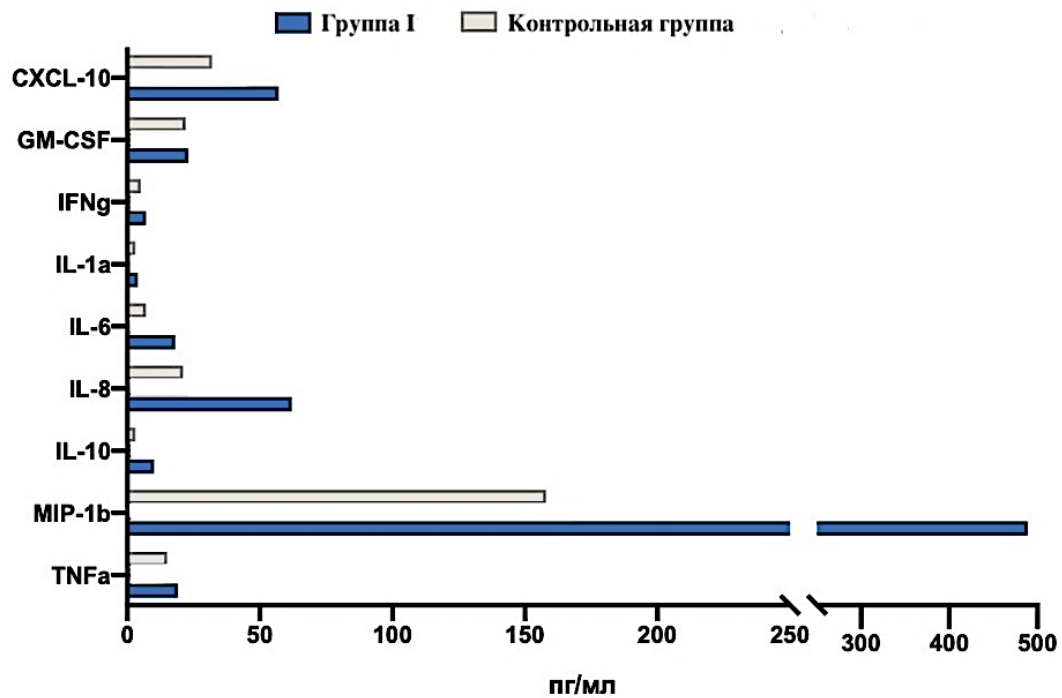


Рисунок 3.15 – Содержание цитокинов и хемокинов в пуповинной крови новорожденных от матерей, перенесших коронавирусную инфекцию (группа I) и от матерей контрольной группы

Как видно из рисунка 3.16 у новорождённых от матерей, перенесших COVID-19, обнаружено заметное повышение экспрессии CD80 и CD86 по сравнению с новорожденными от здоровых матерей. При этом у этих новорожденных медиана интенсивности флуоресценции (англ. median fluorescence intensity, MFI) маркера активации дендритных клеток CD80 составила 45,2 [35; 65,1], а вот у новорожденных, мать которых не болела коронавирусной инфекцией медиана MFI равнялась – 13,8 [4,9; 19,8] ( $p<0,001$ ); MFI маркера активации ДК CD86 у новорожденных от матерей реконвалесцентов составила 41,8

[36,8; 69,4], что статистически отличалось по сравнению с показателями контрольной группы – 17,8 [6,9; 25,1] ( $p < 0,001$ ).

Интересен тот факт, что при анализе MFI CD80 и CD86, экспрессируемых на ДК венозной крови беременных в группах обследования значимых различий выявлено не было.

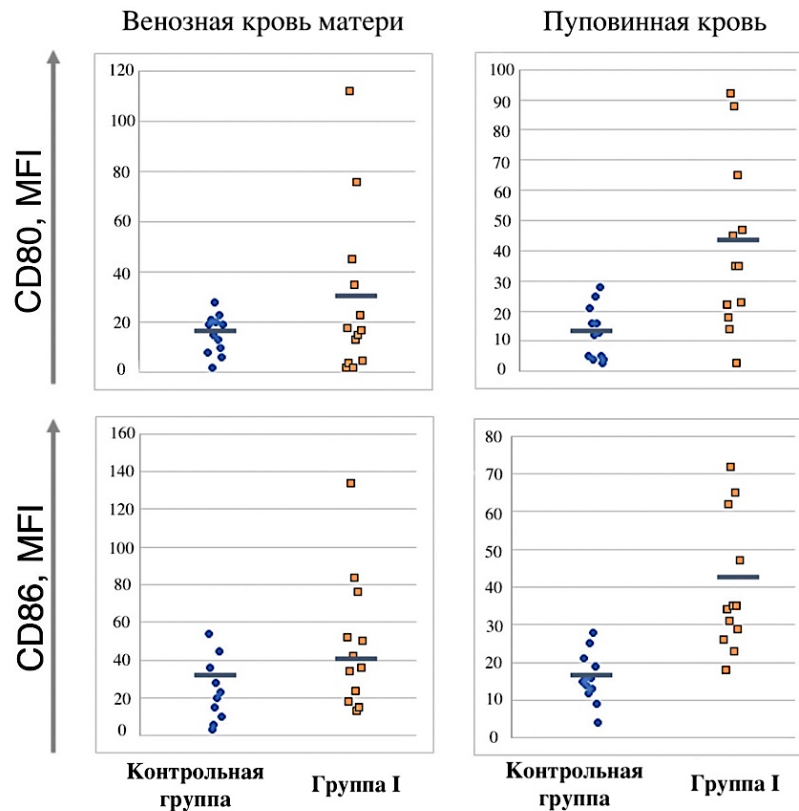


Рисунок 3.16 – Значения MFI (медиана интенсивности флуоресценции) маркеров активации CD80 и CD86 в периферической крови матери и пуповинной крови в исследуемых группах

В образцах пуповинной крови новорожденных, от матерей переболевших коронавирусной инфекцией во время беременности, при исследовании экспрессии CD45RA в подмножествах CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, была обнаружена повышенная доля центральных CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Т-клеток с одновременным снижением доли наивных CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток (21,0 [14; 28]%), по сравнению с новорожденными от матерей контрольной группы (9 [2; 13]%), ( $p = 0,018$ ).

При этом, у беременных перед родоразрешением были получены однородные результаты, которые достоверно не различались в исследуемых группах (рисунок 3.17).

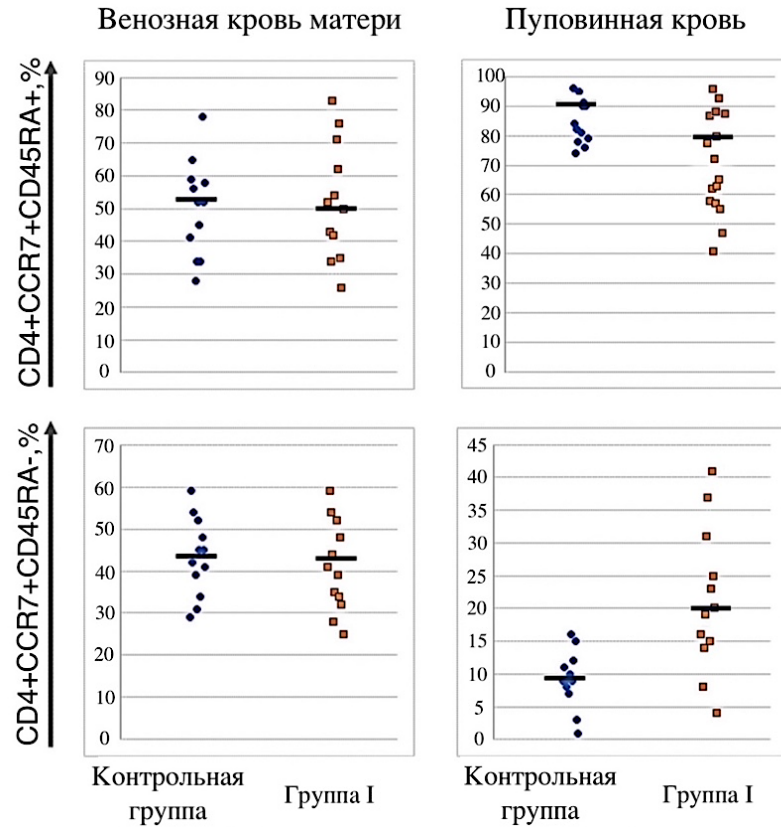


Рисунок 3.17 – Содержание CD4+CCR7+CD45RA+ и CD4+CCR7+CD45RA- Т-клеток в группах исследования

При анализе относительного количества CD3<sup>+</sup>CD45RO лимфоцитов в пуповинной крови новорожденных, было обнаружено достоверные высокие значения этого показателя в группе матеря, которых переболели коронавирусной инфекцией (43 [31; 57]%) по сравнению с новорожденными контрольной группы (14 [8; 21]%), ( $p < 0,001$ ). Однако в венозной крови у матерей значимой разницы не было выявлено.

### 3.3 Состояние Т-регуляторного звена иммунной системы матери и новорожденного

На основании того, что Treg клетки играют ведущую роль в регуляции Т-клеточного ответа, была выполнена оценка функциональной характеристики и количества Treg клеток у матерей и у их новорожденных.

У беременных женщин функциональная характеристика и количество Treg клеток в группах исследования достоверно не отличалось ( $p=0,248$ ).

Как показано на рисунке 3.18 функциональная активность Treg ( $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ ) у новорожденных, от матерей перенёсших COVID-19 во время беременности была значительно ниже ( $s\%= 43,8 [29,4;58,6]$ ), по сравнению с новорожденными от матерей контрольной группы ( $71,2 [53,1; 78,6]$ ), ( $p<0,001$ ).

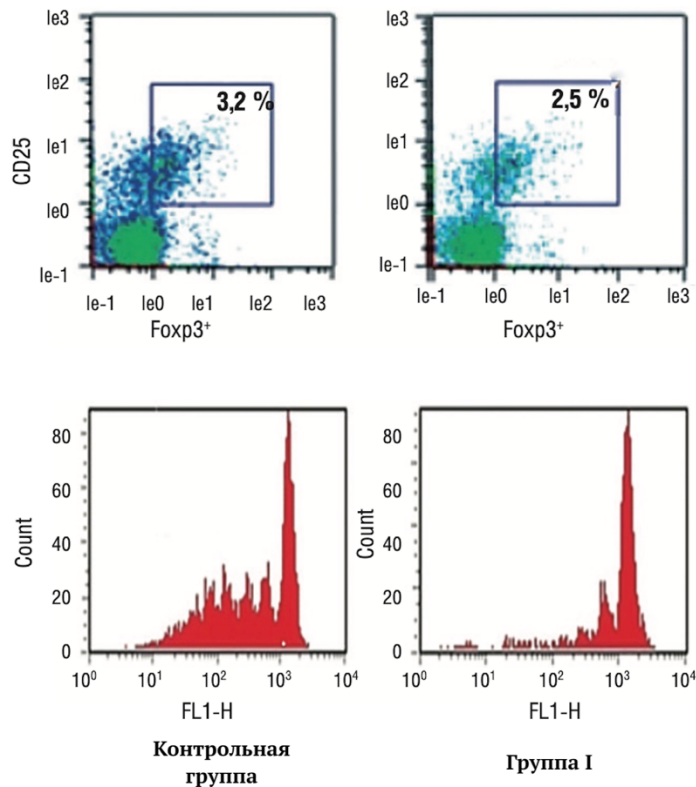


Рисунок 3.18 – Количественная и функциональная характеристика Treg в пуповинной крови новорожденных в исследуемых группах

**Клинический случай** снижения функциональной активности Treg клеток в пуповинной крови новорожденного, от матери перенесшей COVID-19 за 5 недель до родов с синдромом фетального системного воспалительного ответа.

Младенец (ГВ 36 недель) мужского пола, массой 2880 г, ростом 48 см, оценкой по шкале Апгар 7-7 баллов, родившийся через естественные родовые пути, из родильного блока был переведен в ОРИТН.

Из анамнеза беременной известно, что данная беременность II, протекала на фоне анемии легкой степени (Hb 98 г/л), умеренной преэклампсии (АД 145/95, белок 1 г/сут), ожирения 1 степени (ИМТ 31 кг/м<sup>2</sup>). В 31 неделю гестации находилась в инфекционной больнице с тяжелым течением COVID-19 (двусторонняя полисегментарная пневмония КТ-2, COVID-19 индуцированная, ДН 1 ст.), за время лечения, в течении 2х недель были назначены: НМГ (Клексан) в дозе 0,4 мл 2/сут, антибиотика терапия (цефтриаксон 1000 мг/сут), инфузионная терапия с контролем диуреза, ВПО. УЗИ и КТГ плода в пределах нормы, при доплерометрии кровотоков не нарушен. Из стационара была выписана в удовлетворительном состоянии.

За время наблюдения в женской консультации проводилась профилактика и терапия микронутриентной недостаточности (фолиевая кислота в дозе 400 мкг/сутки, препарат калия йодида 200 мг/сутки на протяжении всей беременности, бисглицинат железа 25 мг). Также проводилась профилактика фетоплацентарной недостаточности, преэклампсии: препарат ацетилсалициловой кислоты и магния гидроксида 75 мг/сутки, антигипертензивная терапия  $\alpha_2$ -адреномиметики (Допегит) 500мг 2/сут.

На сроке 36 недель беременности доставлена бригадой СМП в приемное отделение родильного дома с преждевременным излитием околоплодных вод, в приемном отделение поставлен диагноз: Беременность 36 недель, Головное предлежание, I период родов, Преждевременное излитие околоплодных вод, Преэклампсия, Анемия легкой степени, Ожирение 1 степени, Перенесенная коронавирусная инфекция в 31 неделю гестации тяжелой степени.

Из приемного отделения, учитывая клиническую картину и срок гестации переведена в родильный блок для родоразрешения.

Состояние новорожденного оценено как среднее-тяжелое за счет респираторного нарушения ДН 2 ст на фоне врожденной пневмонии. Первые сутки жизни новорожденному был проведен ряд лабораторных анализов, где оценивалась концентрация эритроцитов ( $1,91 \cdot 10^{12}/л$ ), гемоглобина (Hb 63 г/л), концентрация СРБ – 18 мг/л, функциональная активность Т-reg клеток (s - 25,3), провоспалительных цитокинов (таблица 3.5) Кислотно основное состояние (КОС) респираторный ацидоз (рН 7.0, рСО<sub>2</sub>-42, рО<sub>2</sub>-31), под контролем КОС проводилась антибактериальная, инфузионная терапия, гемотрансфузия, находился на СРАР. На 3 сутки общее состояние ребенка удовлетворительное с положительной динамикой. На 6-е сутки с диагнозом «врожденная пневмония неуточненная» новорожденного перевели на II этап выхаживания, а уже на 13 сутки жизни выписали домой в удовлетворительном состоянии.

Таблица 3.5 – Уровни провоспалительных цитокинов в ПК (пг/мл)

Показатели	Пуповинная кровь
CXCL 10	54,2
GM-CSF	32,9
IFN- $\gamma$	6,4
IL-1 $\alpha$	16,7
IL-6	26,9
IL-8	298
IL-10	32,7
MIP-1 $\beta$	378
TNF $\alpha$	22,8

## Оценка специфического Т-клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2

На рисунке 3.19 представлена специфическая Т-клеточная память к возбудителю коронавирусной инфекции. Так у беременных, переболевших коронавирусной инфекцией, мы видим сильный SARS-CoV-2 специфический Т-клеточный ответ.

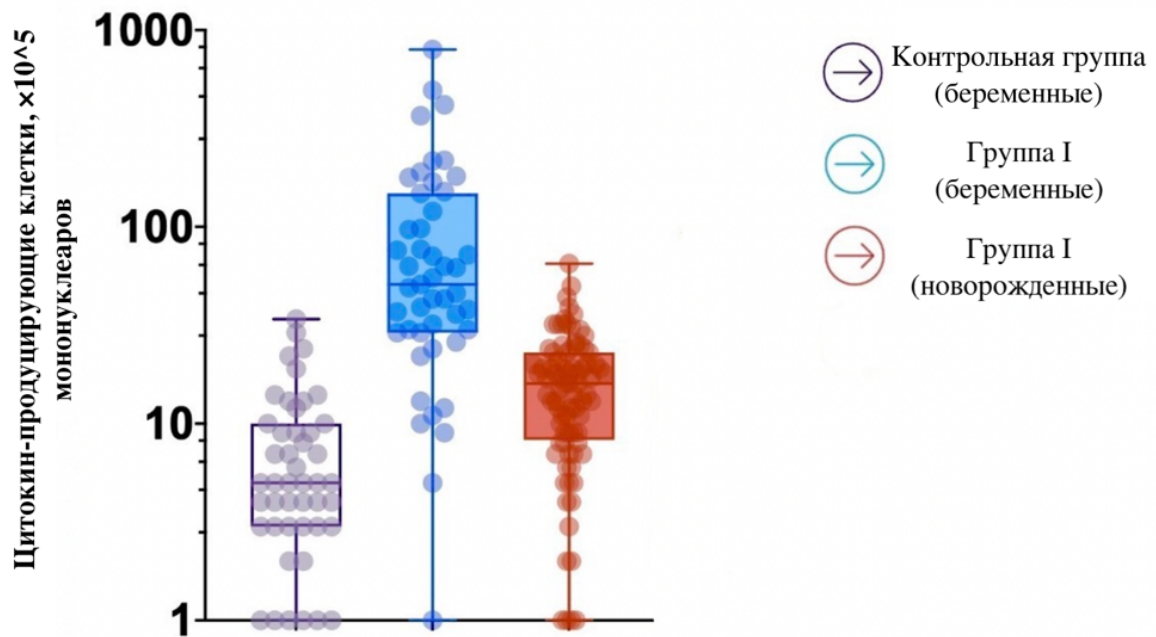


Рисунок 3.19 – Специфичная к SARS-CoV-2 Т-клеточная память

Более того у 22/62 (35,5%) всех новорожденных в группе реконвалесцентов COVID-19 в образцах пуповинной крови были выявлены специфические Т-клетки памяти.

Однако среди образцов ПК новорожденных, от матерей перенёсших COVID-19 в тяжелой форме, клетки памяти выявлены не были, более того слабый специфичный Т-клеточный ответ был и у матерей с тяжелой формой COVID-19 (рисунок 3.20, 3.21).

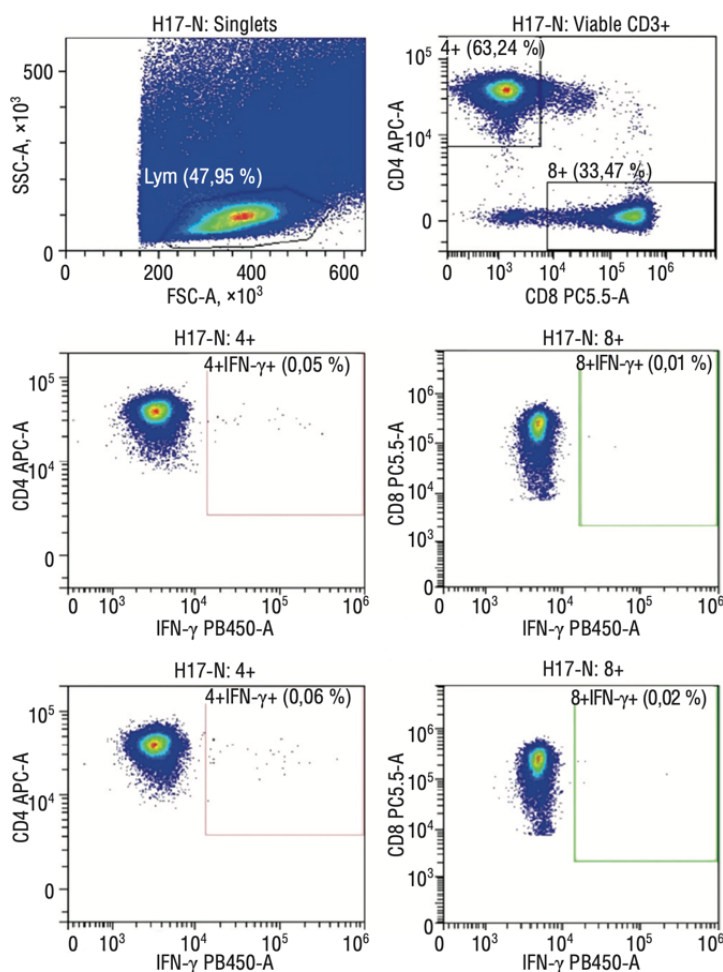


Рисунок 3.20 – Цитофлуориметрическая визуализация субпопуляций Т-клеток к SARS-CoV-2 у плодов, после легкого течения COVID-19 у матери

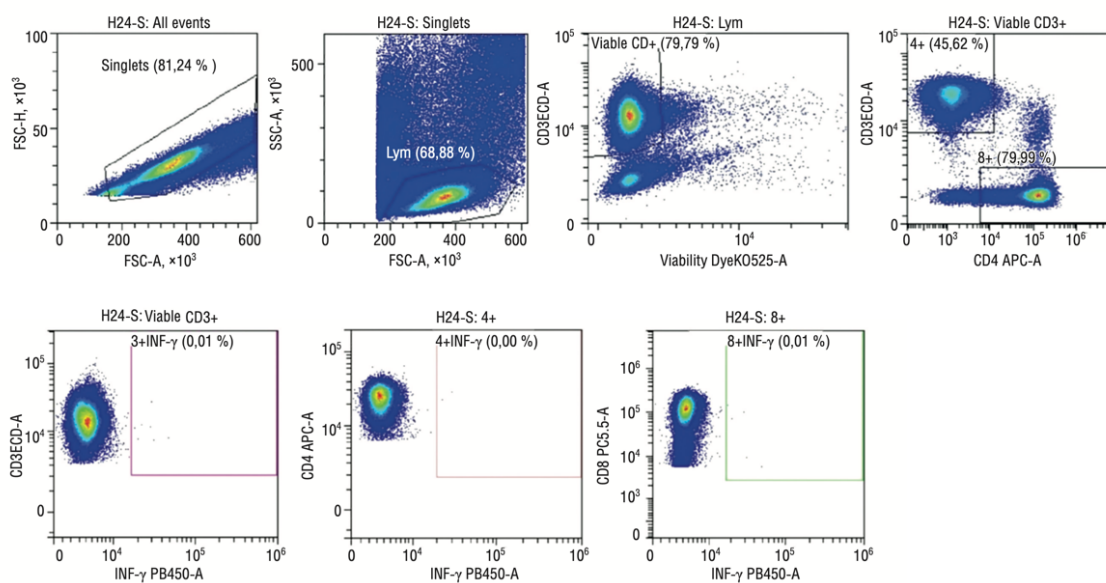


Рисунок 3.21 – Цитофлуориметрическая визуализация субпопуляций Т-клеток к SARS-CoV-2 у плодов, после тяжелого течения COVID-19 у матери



### Оценка размеров вилочковой железы

Всем новорожденным выполнялось УЗИ тимуса. На рисунке 3.22 представлены данные УЗИ вилочковой железы (тимус) новорожденных исследуемых групп.

В результате исследования отмечено достоверно меньшие размеры тимуса у новорожденных матери, которых переболели коронавирусной инфекцией по сравнению с контрольной группой ( $p=0,0056$ ).

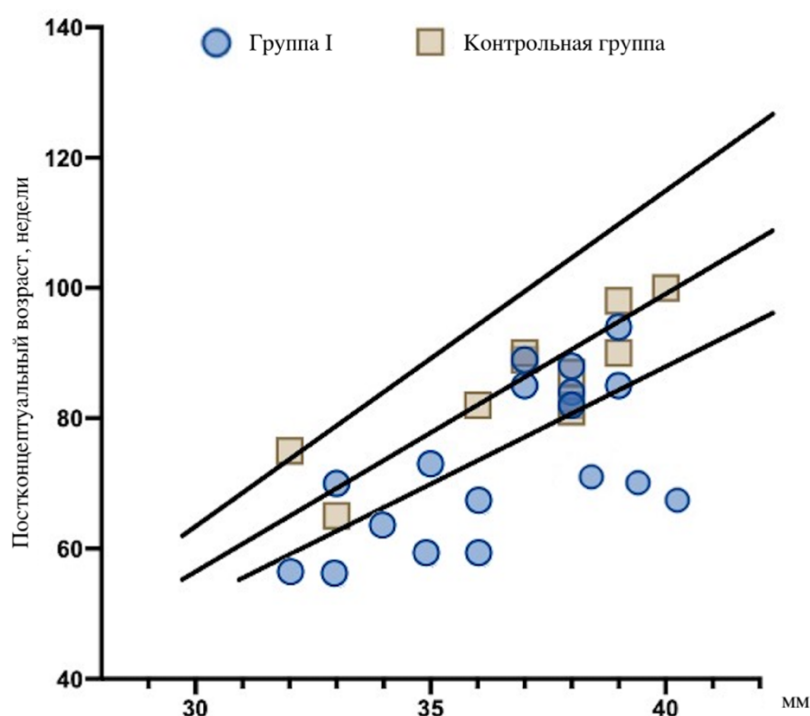


Рисунок 3.22 – Размеры вилочковой железы у новорожденных от SARS-CoV-2 положительных матерей (группа I) и матерей контрольной группы

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

COVID-19 является причиной целого ряда нарушений, которые весьма негативно влияют как на беременную женщину, так и на плод. Акушерские осложнения при COVID-19 могут быть вызваны как прямым вирусным воздействием, так и последующими гиперовоспалительными реакциями [125]. В настоящее время имеются данные, свидетельствующие о том, что беременные женщины особенно подвержены вирусным инфекциям и более предрасположены к заболеваемости и смертности, неонатальным осложнениям и осложнениям, связанных с беременностью [122]. Имеется четкая взаимосвязь между инфекцией у матери и осложнениями со стороны плода и новорожденного, обусловленными как плацентарными нарушениями, так и трансплацентарной передачей вируса.

R. Romero и его коллеги в мета-анализе дают убедительные доказательства того, что у беременных женщин с COVID-19 были признаки развития ПЭ, в том числе с эклампсией и HELLP синдромом [42]. Также многочисленные наблюдения свидетельствуют о таких плацента-ассоциированных осложнениях как ЗРП, антенатальная гибель плода (АПГ), ПОНРП, ПР и поздние потери плода. В настоящем исследовании распространённость плацента-ассоциированных осложнений у беременных после перенесённой коронавирусной инфекции составляет 30,6%, так ПРПО встречается у 17,7% случаев, ПР у 11%, ПЭ у 6,5%, ПОНРП у 3,2% случаев.

Как известно, тромботические осложнения являются характерной чертой для больных с новой коронавирусной инфекцией. Поэтому крайне важно изучение патогенеза различных осложнений и в том числе тромбозов при COVID-19. Считается, что именно тромбовоспаление (иммунотромбоз) и эндотелиопатия, вызванные COVID-19, являются ключевыми механизмами и приводят к тромбозам и плацента-ассоциированным осложнениям во время беременности.

Тромбовоспаление точно описывает сложную взаимосвязь между системой свертывания крови и врожденной иммунной системой. Иммунотромбоз может локально ограничивать инфекцию, способствуя распознаванию, ограничению и

уничтожению патогенов. Учитывая, что аналогичные механизмы существуют при вирусном и бактериальном сепсисе, иммуотромбоз был пересмотрен и при инфекции SARS-CoV-2. Механизмы нарушений системы гемостаза при COVID-19 включают одновременную взаимосвязь и активацию многих путей, а именно внешних и внутренних путей каскада свертывания крови, тромбоцитов, иммунных клеток, активацию и повреждение эндотелия, а также угнетение фибринолиза. Такие патофизиологические изменения приводят к артериальному и, главным образом, венозному тромбозу, тромботической микроангиопатии (ТМА) и ДВС-синдрому особенно у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

Как известно изменение в свертывающей системе во время беременности является естественным физиологическим состоянием, которое сопровождается повышением фибриногена и других факторов свертывания в сочетании со слабым снижением естественных антикоагулянтов. А присоединение COVID-19 вызывает более глубокие изменения в системе гемостаза с повышением риска тромбоэмболических осложнений у этих беременных. Так в работе J.Servante, авторы обращают внимание на то, что риск гемостатических и тромбоэмболических осложнений выше у беременных женщин с инфекцией COVID-19 (1,26%), чем у беременных женщин без инфекции COVID-19 [69].

Поиски маркеров, которые позволяют с высокой вероятностью предсказать развитие тромбовоспаления и эндотелиопатии являются первостепенной задачей медицины в настоящее постковидное время. Этой проблеме уделяется пристальное внимание многими авторами, по этой причине нами была поставлена задача изучить роль гемостаза и иммунной регуляции в системе мать-плод-новорожденный у беременных женщин после коронавирусной инфекции.

L. Hoteit с соавт. в своей работе выделяют несколько патогенетических механизмов тромботических осложнений при COVID-19, а именно прямое и косвенное повреждения эндотелия, нарушение регуляции иммунных клеток, приводящее к избыточному образованию цитокинов, и кроме того, образованию

нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые, как известно, являются протромботическими, и еще более усиливаются у пациентов с COVID-19 [149].

Настоящее исследование продемонстрировало, что для пациенток с коронавирусной инфекцией свойственно активация иммунной системы и системы гемостаза. В острый период COVID-19 нами были получены крайне интересные результаты. Так для этих пациенток характерна выраженная гиперагрегация тромбоцитов, достоверно высокие уровни Д-димера и фибриногена, в сочетании с низкими значениями естественных антикоагулянтов по сравнению с контрольной группой. Обращает на себя внимание и тот факт, что по нашим данным, у пациенток с перенесенной инфекцией во время беременности также присутствует гиперагрегация и гиперфибриногенемия по сравнению с контрольной группой, однако показатели Д-димера и естественных антикоагулянтов достоверно не отличались от показателей контрольной группы. Мы считаем, что высокие уровни фибриногена, по-видимому, связаны с воспалительными реакциями, обусловленными COVID-19.

Наши данные совпадают с данными мировой литературы, так в работе Wang с соав. у беременных пациенток с COVID-19 были выявлены более высокие уровни Д-димера по сравнению со здоровыми беременными женщинами [13]. Высокие уровни Д-димера свидетельствуют о повышении риска тромбоэмболических осложнений. Следовательно, наблюдения за беременными с COVID-19 требуют оценки как дыхательных нарушений, так и тяжелых осложнений, таких как ДВС-синдром, тромбоэмболия, тромбозы различных локализаций. Повышение концентрации Д-димера в сочетании с высоким ПВ, АЧТВ, ТВ и фибриногеном, наблюдаются у пациентов с SARS-CoV-2 и ДВС-синдромом [4], [45]. В нашем исследовании показатели рутинных общеоценочных методов исследования (АЧТВ, ПВ, ТВ) у беременных женщин в различных группах исследования были в пределах нормы и не выходили за границы референсных значений. Таким образом у обследованных женщин не было выявлено тяжелой формы ДВС-синдрома с тромбогеморрагическим составляющим.

Довольно интересно, что причиной нарушений микроциркуляции, возникающих в результате цитокинового и тромботического шторма, часто выступает ТМА. Типичным клиническим проявлением ТМА является полиорганная недостаточность, атипичными проявлениями: злокачественная артериальная гипертензия, неврологические расстройства и HELLP синдром во время беременности.

Как известно недостаточность металлопротеиназы ADAMTS-13 приводит к возникновению ТМА. Металлопротеиназа ADAMTS-13 относится к пептидазным белкам, основной и неотъемлемой функцией которого является расщепление мультимеров vWF. Фактором приводящим к избыточному потреблению ADAMTS-13 является поражение эндотелия, вследствие которого происходит высвобождение мультимеров vWF из телец Вейбеля-Паладе. Безусловно эндотелиальная дисфункция является не единственным фактором, приводящим к нарушению функционирования ADAMTS-13 при коронавирусной инфекции. Так мощный выброс NETs при COVID-19 может приводить к угнетению активности ADAMTS-13. Последствием нарушенного функционирования и угнетения концентрации металлопротеиназы является чрезмерное накопление ULvWF, которые в комплексе с активированными тромбоцитами вызывают тромбоз микроциркуляторного русла [7], [151].

Таким образом, нормальную циркуляцию в жизненно важных органах обеспечивает именно баланс между ADAMTS-13 и vWF. Поэтому о роли соотношения vWF к ADAMTS-13 все больше публикаций и исследований появляется в мировой медицинской литературе. В общей сложности данные мировой литературы демонстрируют, что в основе иммунотромбоза при COVID-19 лежит эндотелиопатия и нарушение в функционирования оси vWF/ADAMTS-13.

Одно из исследований, проведённых на нашей кафедре, продемонстрировало, что низкая выживаемость у пациентов с тяжелым течением COVID-19 достоверно коррелируют с высоким содержанием vWF, низкими значениями ADAMTS-13, в плазме у этих больных, кроме того, у них также

наблюдалось нарушение функционирования оси ADAMTS-13/vWF по сравнению с контрольной группой [9].

Н. Fogarty с соавт. в своей работе провели сравнительный анализ содержания vWF и фактора VIII (FVIII) в плазме у лиц, переболевших коронавирусной инфекцией и у здоровой контрольной группы, так они выяснили, что эти показатели остаются высокими даже через три месяца после выздоровления [113]. Таким образом можно предположить, что у реконвалесцентов COVID-19 происходит активация тромбоцитов и эндотелиоцитов, что также было продемонстрировано в данной диссертационной работе.

В рамках нашего исследования была изучена динамика концентрации vWF, концентрации, активности и ингибитора ADAMTS-13, соотношения ADAMTS13/vWF у 152 беременных женщин. При этом 62 из них (группа I) были реконвалесцентами COVID-19, 45 (группа II) в острый период COVID-19, а 45 беременных женщин составили контрольную группу.

Так нами были выявлены достоверно высокие уровни vWF у беременных женщин как в острый период COVID-19, так и в постковидный период по сравнению с контрольной группой. Более того у беременных после перенесенной коронавирусной инфекции межиндивидуальные различия в концентрации vWF были в диапазоне от 1,063 до 6,074 ЕД/мл, а у 80,6% (50/62) пациенток концентрации были выше верхней границы нормы, тогда как у беременных контрольной группы только 48,9% беременных уровни vWF были выше нормы. И наконец у 95,5 % беременных в острый период COVID-19 концентрации vWF были выше верхней границы нормы.

vWF является стойким маркером воспаления и повышенного риска тромбообразования в сосудах микроциркуляторного русла [5]. Из вышесказанного следует, что высокие цифры антигена vWF в плазме беременных реконвалесцентов COVID-19 демонстрирует продолжающуюся активацию как тромбоцитов, так и эндотелиоцитов, даже после выздоровления.

А вот тенденция к изменению активности и концентрации ADAMTS-13 в группах сравнения не была столь заметна. Так в группе II медиана концентрации и

активности металлопротеиназы была статистически ниже, чем соответствующие результаты здоровых беременных. В частности, показатель активности ADAMTS-13 во II группе у беременных составил 0,514 [0,41; 0,68] Ед/мл, а в контрольной группе – 0,696 [0,538; 0,859] Ед/мл; антигена ADAMTS-13 во II группе составил 0,39 [0,26; 0,45] Ед/мл, а в контрольной группе – 0,788 [0,684; 0,894] Ед/мл. Однако достоверных различий концентрации ADAMTS-13 в группе I и в контрольной группе не было выявлено.

Поскольку у большего числа беременных концентрация и активность ADAMTS-13 колебались на уровне нормативных значений или несущественно снижались, было решено посмотреть соотношение ADAMTS-13 к VWF в исследуемых группах.

Наиболее выраженная динамика соотношения концентраций ADAMTS-13/vWF была продемонстрирована в группе беременных в острый период болезни, а именно в более чем в половине случаев в острый период COVID-19 (55,6%; 25/45) был выявлен рост концентрации vWF с параллельным снижением концентрации ADAMTS-13, а соотношение концентраций ADAMTS-13/vWF было значительно ниже, чем в контрольной группе. Однако у беременных в постковидном состоянии только у 5/62 (8%) пациенток было повышение значений антигена vWF с одновременным снижением концентрации ADAMTS-13.

Таким образом, можно точно сказать, что регуляторная функция оси ADAMTS-13/vWF остается неповрежденной у значительно большего числа пациенток, после коронавирусной инфекции.

Исходя из данных предыдущих исследований в группе небеременных, было показано, что нарушение оси vWF/ADAMTS-13 коррелирует с тяжестью протекания COVID-19, то есть чем больше была нарушена ось, тем тяжелее протекало заболевание. А в исследовании E. Grandone с соав. были получены очень интересные выводы. В частности, нарушение функционирования оси vWF/ADAMTS-13 коррелировало с частотой преждевременных родов. [112]. Эта гипотеза подтверждается частотой встречаемости преждевременных родов, так в

мета-анализе, включающем 192 исследования и в общей сложности более 67 000 женщин, авторы обнаружили, что риск преждевременных родов у беременных с инфекцией SARS-CoV-2 в три раза выше, чем у женщин с отрицательным результатом [39].

На основании вышеизложенного можно предположить, что у беременных в острый период COVID-19 наблюдается картина тромботической формы ДВС-синдрома, а именно у этих пациенток мы видим гиперфибриногеномию, высокие концентрации Д-димера, vWF, существенное снижение концентрации естественных антикоагулянтов, а также нарушения в оси ADAMTS-13/vWF. Как известно COVID-19, а также бактериальный сепсис вызывают именно тромботическую форму ДВС-синдрома [55]. Важнейшей концепцией ДВС-синдрома является системная активация коагуляции с повреждением сосудистого эндотелия [54]. А как мы знаем SARS-CoV-2 в первую очередь поражает непосредственно эндотелий сосудов, приводя к нарушению в микроциркуляторном русле.

Многими авторами высказано предположение, что патологическим связующим звеном между повреждением эндотелия и иммунотромбозом могут служить NETs [33]. Совсем недавно NETs стал рассматриваться в качестве одного из ключевых участников патомеханизма повреждения многих органов при COVID-19 [141].

В совокупности, влияние образования NETs на тромбоз подтверждается растущим числом экспериментальных и клинических исследований, в которых биомаркеры NETs были качественно и количественно оценены. В частности, цитруллинрованный гистон H3 (H3Cit), миелопероксидаза (MPO), нейтрофильная эластаза (NE), нуклеосомы и ДНК, которые считаются биомаркерами NETs, были оценены при венозных тромбозах [106], ИБС [9], инфаркте миокарда [107], ТЭЛА, ассоциированной с раком [103] и с COVID-19 [105]. В вышеперечисленных исследованиях у всех больных маркеры NETs были достоверно выше, чем у здоровой популяции. А в недавнем исследовании, которое было проведено на базе нашей кафедры, была обнаружена зависимость исхода болезни при тяжелых и



критических формах COVID-19 от маркера МРО, а именно чем больше активность МРО, тем меньше шансы на выживание [2]. Таким образом циркулирующие в плазме больных маркеры NETs связаны с наличием тромбоза и коррелируют с тяжестью заболевания [41].

Учитывая вышесказанное в настоящем исследовании, задача стояла не только в выявлении циркулирующих в крови маркеров активации и повреждения эндотелия, но и маркера активации миелоидного ряда МРО. Как известно МРО является главным катализатором образования NETs, который не только разрушает внутриклеточные белки, но и формирует реактивные формы кислорода, поражающие эндотелий [108].

При исследовании концентрации МРО было выявлено достоверное увеличение показателей у беременных в острый период болезни по сравнению с контрольной группой. Однако при оценке уровня МРО у беременных после перенесенного заболевания достоверного различия с контрольной группой не было выявлено. Таким образом, можно говорить о том, что в острый период болезни идет активация клеток миелоидного ряда с выбросом в кровоток МРО, формируется NETs и происходит поражение эндотелия.

Эндотелиальные клетки играют колоссальную роль в воспалительной реакции, как посредством прямой регуляции активности нейтрофилов путем высвобождения цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-8 и активных форм кислорода), которые могут ускорять образование NETs [16], так и посредством модуляции других клеточных элементов, например тромбоцитов. При повреждении эндотелия секретируется огромное количество vWF и P-селектина, которые участвуют в адгезии тромбоцитов и рекрутировании нейтрофилов [3]. Следовательно активированный эндотелий индуцирует высвобождение NETs, которое приводит к эндотелиальной цитотоксичности с выведением медиаторов, способствующих увеличению NETs, создавая порочный круг. Этот процесс может приводить к хроническому системному воспалению [58], а также многими авторами считается, что повышенное высвобождение провоспалительных медиаторов (IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  и IL-6), активация, дисфункция эндотелия и неконтролируемый выброс

внеклеточных ловушек нейтрофилов связан с Long-COVID с точностью в 78,5-81,6% [77].

Аналогично А. Kruger с соавт. в недавнем исследовании обнаружили повышенные уровни vWF и PF4 (тромбоцитарный фактор 4) у больных с Long-COVID. Они показали, что у этих больных длительное время сохраняется гиперактивация тромбоцитов, а повышение концентрации vWF способствует развитию коагулопатий. Более того изучение тромбоцитов у пациентов с постковидным синдромом с помощью масс-спектрометрии продемонстрировало повышенную гиперактивность, в отличие от здоровых лиц [121].

Long COVID – подострое хроническое многосистемное заболевание, которое встречается по крайней мере в 10% COVID-19. В настоящее время точно не установлено, является ли Long COVID фактором риска осложнений беременности, однако бразильское исследование случай-контроль 84 беременных женщин с подтвержденным диагнозом COVID-19 во время беременности показал, что у 80% женщин были постковидные симптомы, а у трети женщин симптомы сохранялись даже в послеродовом периоде [94]. В нашем исследовании при сборе анамнеза только у 6 (9,6%) реконвалесцентов были выявлены симптомы Long COVID.

Кроме того, нами была поставлена задача, проанализировать содержание антигенов vWF, ADAMTS-13, маркера NETs – MPO, а также активность и ингибитор к ADAMTS-13 в пуповинной крови новорожденных.

При анализе концентраций ADAMTS-13 и vWF у новорожденных были получены однородные результаты в группах исследования. На основании полученных данных можно сделать вывод, что у новорожденных нарушения в системе ADAMTS-13 к vWF не наблюдается. Однако концентрации MPO были достоверно выше у новорожденных от матерей переболевших COVID-19 во время беременности, по сравнению с контрольной группой ( $p=0,048$ ).

Несомненно, COVID-19 вызывает иммунопатологические реакции в организме, которые характеризуются гиперпродукцией цитокинов. А как известно материнские цитокины и хемокины проникают к плоду через плацентарный барьер и таким образом стимулируют активацию иммунной системы с неблагоприятными

последствиями для плода [96]. Соответственно, баланс цитокинов и хемокинов является неотъемлемым фактором физиологически протекающей беременности.

Для понимания механизмов иммунологической регуляции в системе «мать-плод-новорожденный» при COVID-19, мы провели сравнительный анализ содержания цитокинов плазмы беременных и новорожденных, а также корреляцию с маркерами активации иммунокомпетентных клеток.

Так при проведении сравнительного анализа концентрации цитокинов в пуповинной крови, нами было обнаружено, что в случае перенесенной коронавирусной инфекции у новорожденных были высокие концентрация провоспалительных цитокинов и хемокинов по сравнению с новорожденными, матери которых не имели в анамнезе COVID-19. Более того в большей степени были повышены IL-1a, IL-6, IL-10, хемокин-10 (CXCL-10), воспалительный белок макрофагов-1 $\beta$  (MIP-1b) и TNFa. Но в то же время, содержание цитокинов в плазме крови у беременных в исследуемых группах на момент родоразрешения не различались.

Castelli с соав. в своей работе собрали данные из мировой литературы и показали, что избыточная выработка IL-6 чаще всего сочетается с неблагоприятными исходами беременности: хориоамнионит, ПР, ПРПО [31]. Более того в работах других авторов высокие концентрации IL-6 коррелировали с тяжелым течением коронавирусной инфекции и был сделан вывод [84].

В оригинальном исследовании R. Romero и соавт. показали, что у беременных женщин развивается умеренная системная воспалительная реакция на SARS-CoV-2, характеризующаяся повышением концентрации IL-8, IL-10 и IL-15, что аналогично у небеременных лиц с инфекцией SARS-CoV-2 [96]. Интересен тот факт, что они обнаружили, высокие уровни IL-8 не только у матери, инфицированные SARS-CoV-2, но и у новорожденных. Как известно, IL-8 является провоспалительным цитокином, основной функцией которого является привлечение нейтрофилов к местам повреждения. В связи с этим в недавних исследованиях было показано, что IL-8 также может служить биомаркером для

прогнозирования тяжести заболевания и прогноза выживаемости пациентов, инфицированных SARS-CoV-2.

Высокие концентрации цитокинов и хемокинов являются важными факторами чрезмерного воспалительного процесса при тяжелом течении COVID-19, а это в свою очередь может способствовать к дисфункции плацентарного барьера и внутриутробной передачи SARS-CoV-2 от матери к плоду [23] (рисунок 4.1).

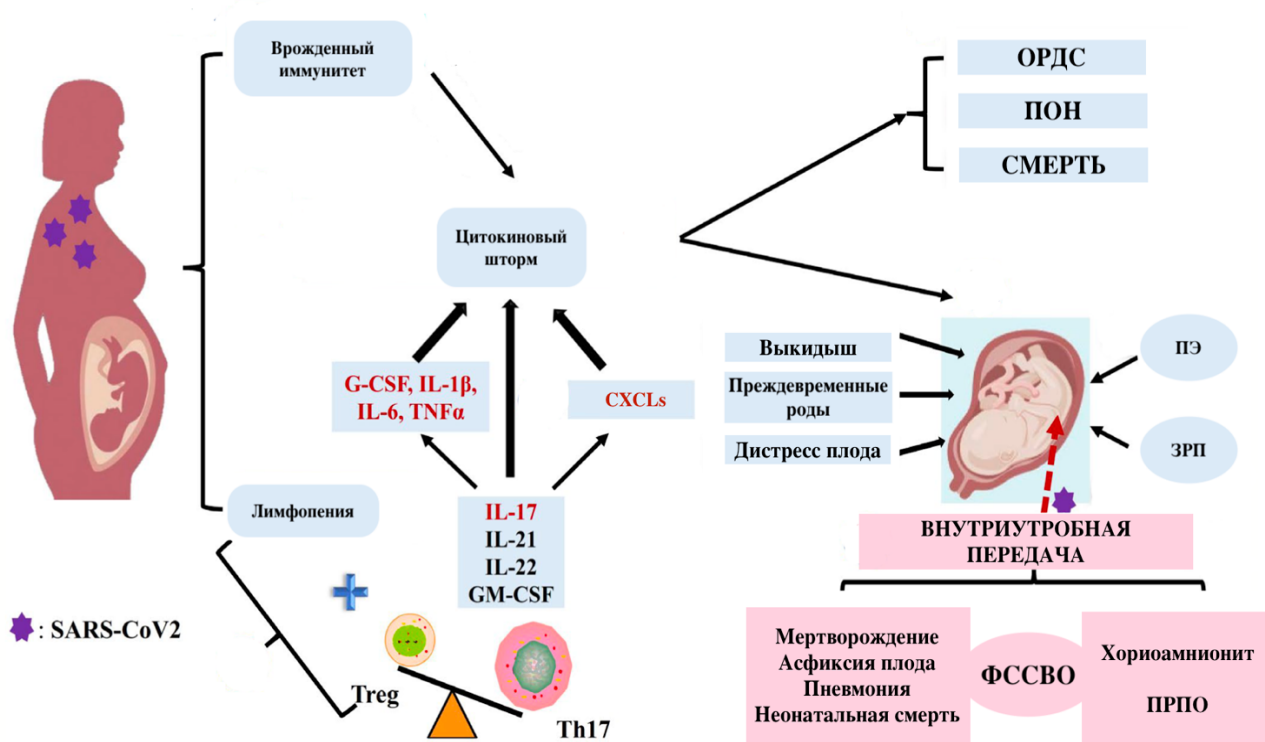


Рисунок 4.1 – Влияние SARS-CoV-2 во время беременности

Известно, что хемокин CXCL10 связан с необычным воспалительным процессом, чаще всего проявляющийся в реакциях отторжения [14]. Поскольку в ходе нашего исследования в группе новорожденных от матерей после COVID-19 были получены более высокие уровни CXCL10, а также IL-6, IL-8, требуется долгосрочное наблюдение и обследование этих новорожденных. Таким образом, механизмы, посредством которых материнская инфекция SARS-CoV-2 вызывает

цитокиновые реакции в организме плода/новорожденного, требуют дальнейшего изучения.

В связи с тем, что ряд цитокинов, а именно IL-1a, TNF-a, IL-6 MIP-1b синтезируются дендритными клетками, нами была поставлена задача проанализировать функциональные маркеры дендритных клеток, а именно экспрессию маркеров активации CD80 и CD86 в периферической крови матери и пуповинной крови новорожденного. Так нами были получены весьма интересные результаты, а именно представленные маркеры на момент родоразрешения не отличались у матерей, однако у новорождённых от матерей, переболевших коронавирусной инфекцией, была выраженная экспрессия CD80 и CD86, по сравнению с контрольной группой.

Провоспалительные цитокины и маркеры дендритных клеток играют одну из главных ролей в праймировании Т-клеток и могут приводить к их активации у плодов на фоне коронавирусной инфекции у матери.

В ходе нашего исследования нами также были проанализированы доли наивных CD4<sup>+</sup> (Т-хелперы) и CD8<sup>+</sup> (Т-киллеры) и подгруппы клеток эффекторной центральной памяти на основе экспрессии CCR7 и CD45RA. В частности, в пуповинной крови новорожденных основной группы доля CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Т-клеток эффекторной центральной памяти была выше, а доля наивных CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> Т-клеток ниже, по сравнению с контрольной группой.

Как известно отличительным признаком инфекции COVID-19 является лимфопения, которая в первую очередь отражается на Т-клеточном ответе. В исследовании Zhang с соавт. у пациентов с COVID-19 тяжесть заболевания коррелирует с лимфопенией, более того у критически больных пациентов было выявлено самое низкое количество общих лимфоцитов, включая Т-клетки [161]. У беременных женщин с легкими симптомами COVID-19 также выявлено снижение количества лимфоцитов по сравнению с контрольной группой. Кроме того, у SARS-CoV-2 положительных беременных было обнаружено снижение количества Т-клеток, которые включали специфические подмножества, такие как CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, Т-хелперы 1 (Th1), Т-хелперы 17 (Th17) по сравнению с SARS-CoV-2

отрицательными беременными [137]. Эти подмножества Т-клеток во время беременности участвуют в установлении и поддержании толерантности матери к плоду.

Как известно, специфические клетки памяти могут формироваться в двух случаях, при внутриутробной передаче вируса к плоду и за счет материнского микрохимеризма. Микрохимеризм – двусторонний трансплацентарный клеточный обмен, который рутинно протекает во время физиологической беременности. Считается, что у плода материнские микрохимерные клетки выявляются с созреванием тимуса и периферических лимфоидных тканей, таким образом можно предположить особую роль этих клеток в праймировании толерогенных реакций к материнским антигенам. Материнские клетки могут обеспечивать факторы роста и дифференцировки, ускоряя созревание иммунных клеток плода [8].

В диссертационной работе при анализе Т-клеточной памяти к SARS-CoV-2, выявлен сильный специфичный ответ у беременных, после COVID-19, кроме того, и у их новорожденных были выявлены специфичные Т-клетки памяти. Однако сильный клеточный ответ не был связан с тяжестью заболевания, поскольку у лиц, переболевших коронавирусной инфекцией в тяжелой форме и у их новорожденных был слабый Т-клеточный ответ.

Наши данные согласуются с результатами зарубежных исследований. Так, многими авторами было обнаружено присутствие Т-клеток памяти к SARS-CoV-2, когда уже IgG к вирусу не выявлялся, более того эти Т-клетки памяти присутствовали даже через 10 месяцев после выздоровления, независимо от тяжести заболевания [130].

Результаты нашего исследования и данные мировой литературы указывают на то, что инфекция SARS-CoV-2 изменяет специфические подмножества провоспалительных Т-клеток в кровотоке как матери, так и плода, что может нарушить механизмы иммунологической толерантности в системе «мать-плод».

Без сомнения, ключевую роль в регуляции Т-клеточного ответа играют Treg клетки. Поэтому нами было изучена количественная и функциональная характеристика Treg клеток у матерей и новорожденных. Было выявлено, что

количество Treg у беременных в исследуемых группах статистически значимо не отличалось. Однако, у новорожденных от матерей перенёсших COVID-19 функциональная активность Treg клеток была значительно подавлена, по сравнению с контрольной группой.

Как известно баланс между Treg/Th17 клетками имеет решающее значение для имплантации плода и протекания здоровой беременности. При неосложненной беременности соотношение Treg/Th17 смещается в пользу клеток Treg [82]. Treg клетки пролиферируют на границе между матерью и плодом, обеспечивая иммунную толерантность и успешную беременность. Напротив, неконтролируемая пролиферация Th17 и нарушение баланса между Treg и Th17-клетками приводит к неблагоприятным исходам беременности [63].

Патогенез тяжелой формы COVID-19 включает нарушение регуляции соотношения Treg/Th17-клеток в сторону увеличения Th17-клеток, что приводит к неконтролируемому системному воспалению. Таким образом, у беременных женщин, инфицированных SARS-CoV-2, дисбаланс Treg/Th17 потенциально может быть связан с неблагоприятными исходами беременности, а полученные нами результаты имеют колоссальное значение для понимания иммунорегуляции у новорожденных, родившихся от матерей, перенесших COVID-19.

Как известно основным местом продукции T-клеток является вилочковая железа (тимус), которая подвергается изменению в ответ на активацию иммунной системы плода [82]. По данным мировой литературы размеры вилочковой железы у плодов могут уменьшаться вследствие системного материнского воспаления. Учитывая активацию иммунной системы плода в ответ на SARS-CoV-2 у матери, нами была поставлена задача в измерении и сравнении размеров тимуса у новорожденных в обследуемых группах. В результате нами было выявлено уменьшение размеров тимуса у новорожденных группы I по сравнению с контрольной группой.

Таким образом мы видим мощную активацию иммунной системы плодов с повышенной продукцией цитокинов и развитием ФССВО, которое не связано с

тяжестью протекания коронавирусной инфекции у матери, и может проявляться от минимальных изменений до развития сепсиса и септического шока.

Другим важным вопросом, возникающим в связи с проблемой заражения COVID-19 во время беременности, является определение того, может ли SARS-CoV-2 передаваться внутриутробно. Косвенно, на основании полученных нами данных об выявленных специфичных Т-клетках памяти у новорожденных от матерей, перенесших COVID-19 мы показали, что такое возможно. Однако этого недостаточно и необходимы дальнейшие исследования. Так этой проблеме уделяется большое внимание во всем мире.

Одним из факторов, определяющих вирусный тропизм в децидуальной оболочке и плаценте является экспрессия вирусных рецепторов в этих тканях. Так Li M. с соавт. в своем исследовании продемонстрировали экспрессию рецепторов SARS-CoV-2 на границе мать-плод, а также в органах плода [152]. При иммуногистохимическом анализе плацент первого и второго триместров беременности была обнаружена экспрессия ACE2 и TMPRSS2 рецепторов. Более того, гистологические исследования плацент, полученных от женщин с подтвержденным диагнозом COVID-19 выявили наличие SARS-CoV-2 примерно в 27% случаев [112]. Помимо всего прочего в плацентах от беременных с COVID-19 были выявлены отложения фибрина и массивные инфаркты материнской части плаценты. Позже были описаны основные патоморфологические особенности плацент при COVID-19, а именно материнская и плодовая мальперфузия, межворсинчатый тромбоз, массивный хронический интервиллит с генерализованным воспалением (наличие макрофагов M2, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов и активированных В-лимфоцитов), отложение перивиллозного фибрина [27]. Интересно, что частота патоморфологических находок не отличается от степени тяжести COVID-19 [155].

Таким образом, патологическое воздействие SARS-CoV-2 на диадру мать-плод может быть вызвано как повреждением плаценты и осложнениями, опосредованными плацентой, так и прямым воздействием вируса. Более того, даже беременные женщины с легкой или умеренной формой COVID-19 также



подвергаются более высокому риску неблагоприятных исходов для плода и новорожденного, как и беременные с тяжелым течением COVID-19.

Беременные женщины с COVID-19 должны тщательно наблюдаться для динамической оценки за состоянием матери и плода, клинической картины, лабораторных показателей, в том числе системы гемостаза. Учитывая полученные результаты нашего исследования, беременные с COVID-19 нуждаются не только в рутинных лабораторных тестах, но и в тестах, определяющих тромбовоспаление, а также учитывая, высокие риски тромбозов, в динамической оценке за фето-плацентарной функцией.

На основании наших результатов можно сделать вывод, что профилактика тромбозов необходима у пациентов с коронавирусной инфекцией. Учитывая высокий риск венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений, независимо от тяжести течения COVID-19, всем беременным необходимо назначать профилактические дозы низкомолекулярного гепарина (НМГ) [140]. Как известно, использование антикоагулянтов увеличивает выживаемость у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции, несмотря на риски кровотечения, более того они являются препаратом выбора у беременных женщин с COVID-19, так как не проходят через плацентарный барьер, а также обладают противовоспалительным и даже возможным противовирусным эффектом [1]. В связи с этим НМГ рекомендуется применять как можно раньше у пациентов с COVID-19, чтобы на ранней стадии прервать наиболее важные патогенетические пути, включая NETs и, соответственно, тромбовоспаление.

В более тяжелых случаях COVID-19, терапия только НМГ может быть недостаточна. Такие пациенты нуждаются в применении препаратов, воздействующих на другие механизмы нарушений гемостаза и возникновении тромбовоспаления, в том числе восстановлении баланса между vWF и ADAMTS-13 (инфузия свежезамороженной плазмы или рекомбинантного ADAMTS-13), подавление взаимодействия vWF с тромбоцитами, использование антицитокиновых препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. COVID-19 у беременных вызывает развитие тромбовоспаления в системе «мать-плод». В остром периоде COVID-19 развивается тромботическая форма диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, особенностью которого является гиперфибриногенемия ( $p < 0,001$ ), резкое снижение уровня естественных антикоагулянтов (антитромбин III ( $p < 0,001$ ), протеин С ( $p < 0,001$ )), значительное повышение уровня Д-димера ( $p < 0,001$ ), а также существенные нарушения в оси ADAMTS-13/vWF ( $p < 0,001$ ), что сочетается с повышением уровня маркера нейтрофильных ловушек - миелопероксидазы (MPO) ( $p = 0,002$ ).

2. У 30,6% пациенток, перенесших COVID-19 во время беременности, развились плацента-ассоциированные осложнения: преждевременный разрыв плодных оболочек у 17,7%, преждевременные роды у 11%, преэклампсия у 6,5%, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты - у 3,2%.

3. У беременных, после перенесенного COVID-19, несмотря на выздоровление, сохраняются признаки умеренной гиперфибриногенемии ( $p < 0,001$ ) и высокие концентрации антигена фактора фон Виллебранда ( $p < 0,001$ ), что свидетельствует о сохранении гипервоспалительного процесса, а также отмечается нарушения в оси ADAMTS-13/vWF ( $p = 0,001$ ).

4. У беременных как в острый период COVID-19, так и у реконвалесцентов значительно увеличена агрегация тромбоцитов со стимуляторами агрегации: АДФ ( $p < 0,001$ ), ристомицином ( $p < 0,001$ ), коллагеном ( $p < 0,001$ ), адреналином ( $p < 0,001$ ).

5. Уровни провоспалительных цитокинов и хемокинов (Интерлейкина IL-1a ( $p = 0,018$ ), IL-6 ( $p = 0,032$ ), IL-10 ( $p = 0,003$ ), MIP-1 $\beta$  ( $p < 0,001$ ), TNF-a ( $p < 0,001$ ), CXCL10 ( $p < 0,001$ )), а также маркера нейтрофильных ловушек — MPO в пуповинной крови плодов, матери которых перенесли COVID-19 во время беременности, достоверно повышены, при этом не отмечается достоверных различий в уровне антигенов ADAMTS-13 и фактора фон Виллебранда.

6. У плодов, матери которых перенесли COVID-19 во время беременности, повышена экспрессия CD80 ( $p < 0,001$ ) и CD86 ( $p < 0,001$ ) на дендритных клетках, а также доля центральных CD4<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> Т-клеток с сопутствующим снижением доли наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток ( $p = 0,018$ ) по сравнению с плодами контрольной группы, что подтверждает наличие синдрома фетального воспалительного ответа.

7. Функциональная активность Т-регуляторных клеток у новорожденных, матери которых перенесли COVID-19 во время беременности, достоверно снижена ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой, в то время как у беременных, перенесших COVID-19, активность Т-регуляторных клеток в периферической крови достоверно не отличается от таковой у беременных контрольной группы ( $p = 0,248$ ).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая, что COVID-19 может сопровождаться тромботической формой диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (гиперфибриногенемия, высокие концентрации Д-димера, фактора фон Виллебранда, нарушение в оси ADAMTS-13/vWF), что является маркером микроциркуляторных нарушений, независимо от тяжести заболевания, беременные женщины требуют особого внимания с индивидуальным введением и наблюдением, с точки зрения плацента-ассоциированных осложнений:

- преждевременный разрыв плодных оболочек
- преждевременные роды
- преэклампсия
- преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты.

2. При оценке рисков плацента-ассоциированных и неонатальных осложнений, рекомендовано определение не только показателей системы гемостаза, но и маркеров воспаления как в периферической крови беременных, так и пуповинной крови.

3. Развитие тромботической формы ДВС-синдрома и тромбозов у беременных с COVID-19 может усугубиться при наличии:

- антифосфолипидного синдрома
- мутации FV Leiden
- мутации протромбина G20210A
- дефицит протеина С и др.

4. Определение специфических Т-клеток в пуповинной крови является доказательством перенесенной коронавирусной инфекции у матери, что является лабораторной верификацией диагноза.

5. Несмотря на нормализацию иммунологических показателей и цитокинового профиля у беременных, перенесших COVID-19, к моменту родов, у плодов происходит дисрегуляция иммунной системы с развитием

воспалительного статуса и активацией иммунной системы. Размеры тимуса у таких новорожденных также меньше, чем в контрольной группе. Соответственно риск развития тяжелого синдрома системного воспалительного ответа, включая развитие сепсиса и септического шока, особенно у недоношенных и маловесных новорожденных, выше. Эта группа новорожденных требует повышенного внимания неонатологов и своевременной профилактики полиорганной недостаточности.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АДФ	аденозиндифосфат
АПК	антигенпрезентирующие клетки
АТ	антитромбин III
АФК	активные формы кислорода
АЧТВ	активированное частичное тромбопластиновое время
ДК	дендритные клетки
ЗРП	задержка роста плода
НМГ	низкомолекулярные гепарины
ОРДС	острый респираторный дистресс-синдром
ОРИТ	отделение реанимации и интенсивной терапии
ПВ	протромбиновое время
ПК	пуповинная кровь
ПОН	полиорганная недостаточность
ПОНРП	отслойка нормально расположенной плаценты
ПР	преждевременные роды
ПРПО	преждевременный разрыв плодных оболочек
ПЭ	преэклампсия
РААС	ренин-ангиотензин-альдостероновая система
СД	сахарный диабет
ФССВО	фетальный синдром системного воспалительного ответа
ТВ	тромбиновое время
ТГВ	тромбоз глубоких вен
ТМ	тромбомодулин
ТЭЛА	тромбоэмболия легочных артерий
АСЕ2	ангиотензин-превращающий фермент 2
Ang II	ангиотензин II
АРС	активированный протеин С
citH3	цитруллинированные гистоны

CXCL	хемокины
dNK	децидуальные натуральные киллеры
EPCR	эндотелиальный рецептор протеина С
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
IDO	индоламин-2,3-диоксигеназа
IFN $\gamma$	интерферон гамма
IL	интерлейкин
MCV	средний объем тромбоцитов
MIP-1	воспалительный белок макрофагов 1
MPO	миелопероксидаза
NETs	нейтрофильные внеклеточные ловушки
PAI-1	тканевой активатор плазминогена 1-го типа
PC	протеин С
PDGF	фактора роста тромбоцитов
PS	протеин S
t-PA	активатор плазминогена тканевого типа
Teff	эффекторные Т-клетки
TF	тканевой фактор
TFPI	ингибитор пути тканевого фактора
TGF- $\beta$	трансформирующий фактор роста бета
Th	Т-хелперы
TLR	toll-подобные рецепторы
TNF- $\alpha$	фактор некроза опухоли-альфа
Treg	Т-регуляторные клетки
u-PA	активатор плазминогена урокиназного типа
U-test	непараметрический тест Манна-Уитни
ULvWF	ультравысокомолекулярный муьлтимер vWF
VEGF	фактор роста эндотелия сосудов
VEGFR	рецептор фактора роста эндотелия сосудов
vWF	фактора фон Виллебранда

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Антикоагулянты: методы контроля дозы и ингибиторы / В.О. Бицадзе, Е.В. Слуханчук, Н.Р. Гашимова [и др.] // *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. – 2022. – Т. 16.– № 2. – С. 158-175.
2. Внутриутробная активация иммунной системы плода в ответ на COVID-19 у матери / Н.Р. Гашимова, Л.Л. Панкратьева, В.О. Бицадзе [и др.] // *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. – 2023. – Т. 17. – № 2. – С. 252-265.
3. Дисрегуляция функции тромбоцитов у больных COVID-19 / Н.Р. Гашимова, В.О. Бицадзе, Л. Л. Панкратьева [и др.] // *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. – 2020. – Т. 16. – № 6. – С. 692-705.
4. Клиническое значение определения ADAMTS-13 и фактора фон Виллебранда у беременных после перенесенного COVID-19 / Н.Р. Гашимова, К.Н. Григорьева, В.О. Бицадзе [и др.] // *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. – 2023. – Т. 17. – № 1. – С. 8-17.
5. Клиническое значение состояния оси ADAMTS-13/vWF у беременных в различные триместры гестации / К.Н. Григорьева, Н.Р. Гашимова, В.О. Бицадзе [и др.] // *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. – 2023.– Т. 17. – № 2. – С. 221-230.
6. Металлопротеиназы как биохимические маркеры патологии беременности / К.Н. Григорьева, В.О. Бицадзе, Д.Х. Хизроева, М.В. Третьякова, Д.В. Блинов, В.И. Цибизова, Н.Р. Гашимова, Э. Грандоне, А.Д. Макацария // *Акушерство, Гинекология и Репродукция*. – 2022. – Т. 16. – № 1.– С. 38-47.
7. Муян, М. Клиническое значение определения ADAMTS13 как фактора высокого риска тромбоза у онкогинекологических больных : 14.01.01 «Акушерство и гинекология», 14.01.12 «Онкология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Муян Мэн ; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). – Москва, 2020. – 124 с.



8. Панкратьева, Л.Л. Клиническое значение фетоматеринского микрохимеризма и нарушений и иммунологической регуляции в развитии патологии перинатального периода: специальность 14.01.08 «Педиатрия», 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Панкратьева Людмила Леонидовна ; ФГБУ «НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева». – Москва, 2019. – 175 с.

9. Патогенетическое и прогностическое значение воспаления и нарушений в оси ADAMTS-13/vWF у больных тяжелой формой COVID-19 / В.О. Бицадзе, Д.Х. Хизроева, Ж. Гри [и др.] // Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2022. – Т. 16. – № 3. – С. 228-243.

10. Прогностическое значение фактора фон Виллебранда в клинической практике / К.Н. Григорьева, В.О. Бицадзе, Д.Х. Хизроева, В.И. Цибизова, М.В. Третьякова, Д.В. Блинов, Л.Л. Панкратьева, Н.Р. Гашимова, Ф.Э. Якубова, А.С. Антонова, Ж. Гри, И. Элалами, А.Д. Макацария // Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2022. – Т. 16. – № 5. – С. 588-599.

11. Функционирование оси ADAMTS-13/vWF и её клиническое значение / К.Н. Григорьева, Н.Р. Гашимова, В.О. Бицадзе [и др.] // Акушерство, Гинекология и Репродукция. – 2023. – Т. 17. – № 1. – С. 127-137.

12. COVID-19, тромбовоспаление и дисрегуляция гемостаза у беременных / В.О. Бицадзе, Н.Р. Гашимова, К.Н. Григорьева [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2023. – Т. 22. – № 3. – С. 86-94.

13. A considerable asymptomatic proportion and thromboembolism risk of pregnant women with COVID-19 infection in Wuhan, China / Y. Wang, X. Liang, H. Wang [et al.] // J Perinat Med. – 2020. – Vol. 49. – № 2. – P. 237-240.

14. A diagnostic classifier for pediatric chronic graft-versus-host disease: results of the ABLE/PBMTC 1202 study / G.D.E. Cuvelier, B. Ng, S. Abdossamadi [et al.] // Blood Adv. – 2023. – Vol. 7. – № 14. – P. 3612-3623.

15. Abbott, B.D. Placental defects in ARNT-knockout conceptus correlate with localized decreases in VEGF-R2, Ang-1, and Tie-2 / B.D. Abbott, A.R. Buckalew // Developmental Dynamics. – 2000. – Vol. 219. – № 04. – P. 526-538.

16. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death / A.K. Gupta, M.B. Joshi, M. Philippova [et al.] // *FEBS Lett.* – 2017. – Vol. 584. – № 14. – P. 3193-3197.
17. Activated Protein C / J.H. Griffin, J.A. Fernandez, A.J. Gale, L.O. Mosnier // *J Thromb Haemost.* – 2007. – Vol. 5. – № 1. – P. 73-80.
18. Activation of Endothelial Cell Protease Activated Receptor 1 by the Protein C Pathway / M. Riewald, R.J Petrovan, A. Donner [et al.] // *Science.* – 2002. – Vol. 296.– №5574. – P.1880-1882.
19. Alijotas-Reig, J. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells / J. Alijotas-Reig, E. Llurba, J.M. Gris // *Placenta.* – 2014. – Vol. 35. – № 3. – P. 241-248.
20. Aluvihare, V.R. T Cells Mediate Maternal Tolerance to the Fetus / V.R. Aluvihare, M. Kallikourdis, A.G. Betz // *Nature Immunology.* – 2004. – Vol. 5. – P. 266–271.
21. Amraei, R. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction / R. Amraei, N. Rahimi // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – № 7:1652. – P. 1-18.
22. An immune clock of human pregnancy / N. Aghaeepour, E.A. Ganio, D. Mcilwain [et al.] // *Science Immunology.* – 2017. – Vol. 2. – № 15. – E. 2946.
23. Analysis of SARS-CoV-2 vertical transmission during pregnancy / C. Fenizia, M. Biasin, I. Cetin [et al.] // *Nature Communications.* – 2020. – Vol. 11.– № 1.– P. 1-10.
24. Antigen-presenting cells in human endometrium during the menstrual cycle compared to early pregnancy / L. Rieger, A. Honig, M. Sutterlin [et al.] // *J Soc Gynecol Investig.* – 2004. – Vol. 11. – № 7. – P. 488-493.
25. Auvinen, K. Expression and Function of Endothelial Selectins during Human Development / K. Auvinen, S. Jalkanen, M. Salmi // *Immunology* – 2014.– Vol 143.– № 3. – P. 406–415.
26. AXL is a Candidate Receptor for SARS-CoV-2 That Promotes Infection of Pulmonary and Bronchial Epithelial Cells / S. Wang, Z. Qiu, Y. Hou [et al.] // *Cell Res.* – 2021. – Vol. 31. – № 2. – P. 126-140.

27. Baergen, R.N. Placental pathology in covid-19 positive mothers: preliminary findings / R.N. Baergen, D.S. Heller // *Pediatr. Dev. Pathol.* – 2020. – Vol. 23. – № 3. – P. 177–180.
28. Benirschke, K. *Pathology of the Human Placenta* / K. Benirschke, P. Kaufmann, N. Baergen. – New York: Springer-Verlag, – 2012. – P. 72-80.
29. Bremme, K.A. Haemostatic changes in pregnancy / K.A. Bremme // *Best Practice & Research Clinical Haematology.* – 2003. – Vol. 16. – № 2. – P. 153-168.
30. Brinkmann, V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade / V. Brinkmann // *J. Innate Immun.* – 2018. – Vol. 10. – № 6. – P. 414-421.
31. Castelli, V. Cytokine storm in COVID-19: «When you come out of the storm, you won't be the same person who walked in» / V. Castelli, A. Cimini, C. Ferri // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11.– P. 1-9.
32. Cellular immunity in COVID-19 convalescents with PCR-confirmed infection but with undetectable SARS-CoV-2 specific IgG / S. Schwarzkopf, A. Krawczyk, D. Knop [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2021. – Vol. 27. – № 1. – P. 122-129.
33. Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD / N. J. Gloude, P. Khandelwal, N. Luebbering [et al.] // *Blood.* – 2017. – Vol. 130. – № 10. – P. 1259-1266.
34. Citrullinated histone H3, a biomarker for neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of mortality in patients with cancer / E. Grilz, L.M. Mauracher, F. Posch [et al.] // *Br J Haematol.* – 2019. – Vol. 186. – № 2. – P. 311-320.
35. Clark, P. Interaction of the protein C/protein S anticoagulant system, the endothelium and pregnancy / P. Clark, I.A. Greer, I.D. Walker // *Blood Rev.* – 1999. – Vol. 13. – № 03. – P. 127-146.
36. Clinical and Immunological Features of Severe and Moderate Coronavirus Disease 2019 / G. Chen, D. Wu, W. Guo [et al.] // *The Journal of clinical investigation.* – 2020. – Vol. 130. – № 5. – P. 2620-2629.

37. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* / D. Wang, B. Hu, C. Hu [et al.] // *J Am Med Assoc.* – 2020. – Vol. 323. – № 11. – P. 1061-1069.
38. Clinical Features of Patients Infected With 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] // *Lancet (Lond Engl).* – 2020.– Vol. 395.– № 10223. – P.497-506.
39. Clinical manifestations, risk factors, and maternal and perinatal outcomes of coronavirus disease 2019 in pregnancy: living systematic review and meta-analysis / J. Allotey, E. Stallings, M. Bonet [et al.] // *BMJ.* – 2020. – Vol. 370. – P. 1-11.
40. Clinical relevance of decreased free protein S levels: Results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives / W.M. Lijfering, R. Mulder, M.K. Kate [et al.] // *Blood* – 2009. – Vol. 113. – № 6. – P. 1225-1230.
41. Clinical significance of neutrophil extracellular traps biomarkers in thrombosis / X. Xu, Y. Wu, S. Xu [et al.] // *Thrombosis J.* – 2022. – Vol. 20:63.
42. Conde-Agudelo, A. SARS-CoV-2 infection during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review and meta-analysis / A. Conde-Agudelo, R. Romero // *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* – 2021. – Vol. 226. – № 1. – P. 68-89.
43. Correlation between grade III placenta and plasma antithrombin III activity in full term pregnancy / H. Asakura, T. Ohshita, S. Suzuki, T. Araki // *Gynecol Obst Invest* – 2001. – Vol. 52. – № 1. – P. 47-50.
44. COVID-19 and Treg/Th17 imbalance: potential relationship to pregnancy outcomes / K.P. Muyayalo, D.-H. Huang, S.-J. Zhao [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2020. – Vol. 84. – № 5. – E. 13304.
45. COVID-19 Infection Complicated by Disseminated Intravascular Coagulation during Pregnancy – Two Cases Report / M. Skalska-Swistek, H. Huras, A.P. Jaworowski [et al.] // *Diagnostics (Basel).* – 2022.– Vol. 12. – № 3:655.
46. COVID-19-Associated Gastrointestinal and Liver Injury: Clinical Features and Potential Mechanisms / P. Zhong, J. Xu, D. Yang [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2020. – Vol. 5. – № 1:256.

47. Crosstalk between decidual NK and CD14<sup>+</sup> myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression / P. Vacca, C. Cantoni, M. Vitale [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2010. – Vol. 107. – № 26. – P. 11918-11923.

48. CTLA-4- mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy / C.A. Chambers, M.S. Kuhns, J.G. Egen, J.P. Allison // *Annual review of immunology*. – 2001. – Vol. 19. – P. 565-594.

49. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts / J. Wang, M. Jiang, X. Chen, L.J. Montaner // *J Leukoc Biol*. – 2020. – Vol. 108. – № 1. – P. 17-41.

50. Cytokines, implantation, and early abortion: re-examining the Th1/Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept / G. Chaouat, N. Ledee-Bataille, S. Zourbas [et al.] // *Am J Reprod Immunol*. – 2003. – Vol. 50. – № 3. – P. 177-186.

51. Decidual Interleukin-22-Producing CD4<sup>+</sup> T Cells (Th17/Th0/IL-22 $\beta$  and Th17/Th2/IL-22 $\beta$ , Th2/IL-22 $\beta$ , Th0/IL-22 $\beta$ ), which also produce IL-4, are involved in the success of pregnancy / F. Logiodice, L. Lombardelli, O. Kullolli [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol. 20. – № 2:428.

52. Decidual natural killer cell receptor expression is altered in pregnancies with impaired vascular remodeling and a higher risk of preeclampsia / A.E. Wallace, G.S. Whitley, B. Thilaganathan [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2015. – Vol. 97. – № 1. – P. 79-86.

53. Depletion of CD8<sup>+</sup> cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the Th1/Th2 cytokine profile / S.M. Blois, R. Joachim, J. Kandil [et al.] // *J Immunology*. – 2004. – Vol. 172. – № 10. – P. 5893-5899.

54. DIC score in pregnant women – a population-based modification of the International Society on Thrombosis and Hemostasis score / O. Erez, L. Novack, R. Beer-Weisel [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 4. – E. 93240.

55. Disseminated Intravascular Coagulation: The Past, Present, and Future Considerations / T. Iba, M. Levi, J. Thachil, J.H. Levy // *Semin Thromb Hemost.* – 2022. – Vol. 48. – № 8. – P. 978-987.

56. Distinct transcriptional and alternative splicing signatures of decidual CD4<sup>+</sup> T cells in early human pregnancy / W. Zeng, Z. Liu, X. Liu [et al.] // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8:682.

57. DNA, histones and neutrophil extracellular traps exert anti-fibrinolytic effects in a plasma environment / I. Varju, C. Longstaff, L. Szabo [et al.] // *Thromb Haemostasis.* – 2015. – Vol. 113. – № 6. – P. 1289-1298.

58. E-selectin and sICAM-1, biomarkers of endothelial function, predict recurrence of venous thromboembolism/ O. Dzikowska-Diduch, J. Domienik-Karłowicz, E. Gorska [et al.] // *Thrombosis research.* – 2017. – Vol. 157. – P. 173-180.

59. Effect of prolonged in vivo administration of progesterone in pregnancy on myometrial gene expression, peripheral blood leukocyte activation, and circulating steroid hormone level / J.E. Norman, M. Yuan, L. Anderson [et al.] // *Reprod Sci.* – 2011. – Vol. 18. – № 5. – P. 435-446.

60. Engelmann, B. Thrombosis as an Intravascular Effector of Innate Immunity / B. Engelmann, S. Massberg // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – № 1. – P. 34-45.

61. Erlebacher, A. Immunology of the maternal-fetal interface / A. Erlebacher // *Annu Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 387-411.

62. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4 / F. Semeraro, C.T. Ammollo, J.H. Morrissey [et al.] // *Blood J Am Soc Hematol.* – 2011. – Vol. 118. – № 7. – P. 1952-1961.

63. Figueiredo, A. S. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy / A. S. Figueiredo, A. Schumacher // *Immunology.* – 2016. – Vol. 148. – № 1. – P. 13-21.

64. Fontenot, J.D. Pillars Article: Foxp3 Programs the Development and Function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells / J.D. Fontenot, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 330-336.

65. Gardner, L. Dendritic cells in the human decidua / L. Gardner, A. Moffett // *Biol Reprod.* – 2003. – Vol. 69. – № 4. – P. 1438-1446.
66. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated / K. Ley, C. Laudanna, M.I. Cybulsky, S. Nourshargh // *Nat Rev Immunol.* – 2007.– Vol. 7.– № 9. – P. 678-689.
67. Griffin, J.H. Covid-19 Hypothesis: Activated Protein C for Therapy of Virus-Induced Pathologic Thromboinflammation / J.H. Griffin, P. Lyden // *Res Pract Thromb Haemost.* – 2020. – Vol. 4. –№ 4. – P. 506-509.
68. Gustine, J.N. Immunopathology of hyperinflammation in COVID-19 / J.N. Gustine, D. Jones // *The American Journal of Pathology.* – 2021. – Vol. 191. – № 1. – P.4-17.
69. Haemostatic and thrombo-embolic complications in pregnant women with COVID-19: a systematic review and critical analysis / J. Servante, G. Swallow, J.G. Thornton [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2021. – Vol. 21.– № 1:108.
70. Hellgren, M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium / M. Hellgren // *Semin Thromb Hemost.* – 2003. – Vol. 29. – № 02. – P. 125-130.
71. Histidine-rich glycoprotein binds DNA and RNA and attenuates their capacity to activate the intrinsic coagulation pathway / T.T. Vu, B.A. Leslie, A.R. Stafford [et al.] // *Thromb Haemostasis.* – 2016. – Vol. 115. – № 1. – P. 89-98.
72. Histone H4 promotes prothrombin autoactivation / S. Barranco-Medina, N. Pozzi, A.D. Vogt, E. Di Cera // *The Journal of biological chemistry.* – 2013. – Vol. 288. – № 50. – P. 35749-35757.
73. Host-viral infection maps reveal signatures of severe COVID-19 patients / P. Bost, A. Giladi, Y. Liu [et al.] // *Cell.* – 2020. – Vol. 181. – № 7. – P. 1475-1488.
74. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo / M. Hara, C.I. Kingsley, M. Niimi [et al.] // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – № 6.– P. 3789-3796.
75. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing / W. Wen, W. Su, H. Tang [et al.] // *Cell Discov.* – 2020.– Vol. 6. – P. 31-39.

76. Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: Perspectives and challenges / M. PrabhuDas, E. Bonney, K. Caron, [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2015. Vol. 16. – № 4. – P. 328-334.

77. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection / C. Phetsouphanh, D.R. Darley, D.B. Wilson [et al.] // *Nat Immunol.* – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 210-216.

78. Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19 / L.M. Khosroshahi, M. Rokni, T. Mokhtari, F. Noorbakhsh // *Int Immunopharm.* – 2021. – Vol. 93. – P. 1-14.

79. Immunomodulatory effects of hydroxychloroquine on Th1/Th2 balance in women with repeated implantation failure / H. Ghasemnejad-Berenji, M. Ghaffari Novin, M. Hajshafiha [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 107. – P. 1277-1285.

80. In vivo dendritic cell depletion reduces breeding efficiency, affecting implantation and early placental development in mice / G. Krey, P. Frank, V. Shaikly [et al.] // *Journal of Molecular Medicine.* – 2008. – Vol. 86. – № 9. – P. 999-1011.

81. Increased frequency of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression / F. Jadidi-Niaragh, M. Yousefi, A. Memarian [et al.] // *Cancer Invest.* – 2013. – Vol. 31. – № 2. – P. 121-131.

82. Inflammation and Immune Reactions in the Fetus as a Response to COVID-19 in the Mother / N.R. Gashimova, L.L. Pankratyeva, V.O. Bitsadze [et al.] // *J. Clin. Med.* – 2023. – Vol. 12. – № 13:4256.

83. Influence of Covid-19 infection on fetal thymus size after recovery / G.A. Sule, T. Ezgi, O. Deniz [et al.] // *J Perinatal Med.* – 2022. – Vol. 50. – № 2. – P. 139-143.

84. Interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis with premature rupture of the membranes: A meta-analysis / X. Qiu, L. Zhang, Y. Tong [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2018. – Vol. 97. – № 47. – E. 13146.

85. James, A.H. Pregnancy and thrombotic risk / A.H. James // *Critical Care Medicine.* – 2010. – Vol. 38. – №2. – P. 57-63.



86. Karlsson, O. A longitudinal study of factor XIII activity, fibrinogen concentration, platelet count and clot strength during normal pregnancy / O. Karlsson , A. Jeppsson, M. Hellgren // *Thrombosis Research*. – 2014. – Vol. 134.– № 3. – P. 750-752.
87. Kourtis, A.P. Pregnancy and infection / A.P. Kourtis, J.S. Read, D.J. Jamieson // *New England journal of medicine*. – 2014. – Vol. 370. – № 23. – P. 2211-2218.
88. Kumari, R. Maternal and fetal outcome among pregnant women presenting with thrombocytopenia / R. Kumari, M. Sharma // *Int J Clin Obstet Gynaecol*. – 2022.– Vol. 6. – № 5. – P. 16-19.
89. Longitudinal Characteristics of Lymphocyte Responses and Cytokine Profiles in the Peripheral Blood of SARS-CoV-2 Infected Patients / J. Liu, S. Li, J. Liu [et al.] // *EBioMedicine*. – 2020. – Vol. 55. – E.102763.
90. Macrophage M1/M2 polarization in patients with pregnancy-induced hypertension / Y. Li, Z. Xie, Y. Wang [et al.] // *Can J Physiol Pharmacol*. – 2018.– Vol. 96.– № 9. – P. 922-928.
91. Macrophage responses associated with COVID-19: A pharmacological perspective / G.W. Booz, R. Altara, A.H. Eid [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2020. – Vol. 887. – E.173547. – P. 1-7.
92. Maltepe, E. Placenta: the forgotten organ / E. Maltepe, S.J. Fisher // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 2015. – Vol. 31. – P. 523-552.
93. Martinod K. Thrombosis: tangled up in NETs / Martinod K., Wagner D.D. // *Blood*. – 2014. – Vol 123. – № 18. – P. 2768-2776.
94. Maternal and neonatal outcomes associated with mild COVID-19 infection in an obstetric cohort in Brazil / C.A.D. Santos, G.G. Fonseca Filho, M.M. Alves [et al.] // *Am J Trop Med Hyg*. – 2022. – Vol. 107. – № 5. – P. 1060-1065.
95. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy / B. Abu-Raya , C. Michalski, M. Sadarangani, P.M. Lavoie // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Vol. 11. – A. 575197.

96. Maternal-fetal immune responses in pregnant women infected with SARS-CoV-2 / V. Garcia-Flores, R. Romero, Y. Xu [et al.] // *Nat Commun.* – 2022. – Vol. 13. – A. 320.
97. Mellema, R.A. Platelet dysregulation in the pathobiology of COVID / R.A. Mellema, J. Crandel, A.C. Petrey // *Hamostaseologie.* – 2022. – Vol. 42. – № 4. – P. 221-228.
98. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells / F. Fallarino, U. Grohmann, K.W. Hwang [et al.] // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4. – № 12. – P. 1206-1212.
99. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities / C. Nathan // *Nature Reviews. Immunology.* – 2006. – Vol. 6. – № 3. – P. 173-182.
100. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface / B. Fu, X. Li, R. Sun [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 110. – № 3. – P. 231-240.
101. Neonatal Platelets from Cord and Peripheral Blood / A.G. Sitaru, S. Holzhauser, C.P. Speer [et al.] // *Platelets.* – 2005. – Vol. 16. – № 3. – P. 203-210.
102. Neonatal Sepsis and Hemostasis / D. Gialamprinou, G. Mitsiakos, G.N. Katsaras [et al.] // *Diagnostics.* – 2022. – Vol. 12. – № 2:261. – P. 1-12.
103. Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches / C.D. Maida, R.L. Norrito, M. Daidone [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 18:6454.
104. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos, K.D. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky // *J Cell Biol.* – 2010. – Vol. 191. – № 3. – P. 677-691.
105. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19 / Y. Zuo, M. Zuo, S. Yalavarthi [et al.] // *J Thromb Thrombolysis.* – 2021. – Vol. 51. – № 2. – P. 446-453.
106. Neutrophil extracellular traps are associated with enhanced procoagulant activity in liver cirrhosis patients with portal vein thrombosis / Y. Xing, Y. Jiang, S. Xing [et al.] // *J Clin Lab Anal.* – 2021. – Vol. 36. – № 5. – E. 24433.

107. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance / J. Valles, A. Lago, M.T. Santos [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2017. – Vol. 117. – № 10. – P. 1919-1929.

108. Neutrophil extracellular traps in Coronavirus disease-19-associated ischemic stroke: A novel avenue in neuroscience / T.I. Pramitasuri, A.A.A.P. Laksmidewi, I.B.K. Putra, F.A. Dalimartha // *Exp Neurobiol.* – 2021. – Vol. 30. – № 1. – P. 1-12.

109. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell subset / D.A. Somerset, Y. Zheng, M.D. Kilby [et al.] // *Immunology.* – 2004. – Vol. 112. – № 1. – P. 38-43.

110. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann [et al.] // *J Cell Biol.* – 2007. – Vol. 176. – № 2. – P. 231-241.

111. Obstetric outcomes in pregnant COVID-19 women: the imbalance of von Willebrand factor and ADAMTS13 axis / E. Grandone, A. Vimercati, F. Sorrentino [et al.] // *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2022. – Vol. 22. – № 1. – P. 142-149.

112. Penfield, C.A. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in placental and fetal membrane samples / C.A. Penfield // *Am. J. Obstet. Gynecol. MFM.* – 2020. – Vol. 2. – № 3. – E. 100133.

113. Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of long COVID syndrome / H. Fogarty, L. Townsend, H. Morrin [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2021. – Vol. 19. – №10. – P. 2546-2553.

114. Placental-specific Igf2 knockout mice exhibit hypocalcemia and adaptive changes in placental calcium transport / M.R. Dilworth, L.C. Kusinski, E. Cowley [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – Vol. 107. – № 8 – P. 3894-3899.

115. Platelets: "multiple choice" effectors in the immune response and their implication in COVID-19 thromboinflammatory process / R. Rolla, C. Puricelli, A. Bertoni [et al.] // *Int J Lab Hematol.* – 2021. – Vol. 43. – № 5. – P. 895-906.

116. Post-acute COVID-19 syndrome / A. Nalbandian, K. Sehgal, A. Gupta [et al.] // *Nat Med.* – 2021. – Vol. 27. – № 4. – P. 601-615.

117. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua / S. Miyazaki, H. Tsuda, M. Sakai [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2003. – Vol. 74. – № 4. – P. 514-522.

118. Pregnancy and Hemostasis: From Physiology to Pathological States / I. Tlamcani, N. El Mouh, K. Amrani, M. Amrani Hassani // *Clin Res Hematol.* –2018. – Vol. 1. – № 1. – P. 1-7.

119. Prevalence of Comorbidities and its Effects in Patients Infected With SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-Analysis / J. Yang, Y. Zheng, X. Gou [et al.] // *Int J Infect Dis.* – 2020. – Vol. 94. – P. 91-95.

120. Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4<sup>+</sup> T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface / S. Wang, X. Zhu, Y. Xu [et al.] // *Hum Reprod.* – 2016. – Vol. 31. – № 4. – P. 700-711.

121. Proteomics of fibrin amyloid microclots in long COVID/post-acute sequelae of COVID-19 shows many entrapped pro-inflammatory molecules that may also contribute to a failed fibrinolytic system / A. Kruger, M. Vlok, S. Turner [et al.] // *Cardiovasc Diabetology.* – 2022. – Vol. 21. – №1:190. – P. 1-23.

122. Racicot, K. Risks associated with viral infections during pregnancy / K. Racicot, G. Mor // *J Clin Invest.* – 2017. – Vol. 127. – № 5. – P. 1591-1599.

123. Reduced CD200 expression is associated with altered Th1/Th2 cytokine production in placental trophoblasts from preeclampsia / J. Xu, Y. Gu, J. Sun [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2018. – Vol. 79. – № 1. – E.12763.

124. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Inhibitors in Patients With Covid-19 / M. Vaduganathan, O. Vardeny, T. Michel [et al.] // *N Engl J Med.* – 2020. – Vol. 382. – № 17. – P. 1653–1659.

125. Risk factors for and pregnancy outcomes after SARS-CoV-2 in pregnancy according to disease severity: A nationwide cohort study with validation of the SARS-CoV-2 diagnosis / J.M. Aabakke, T.G. Petersen, K. Wojdemann [et al.] // *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica.* – 2023. – Vol. 102. – № 3. – P. 282-293.

126. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy / M.P. Piccinni, C. Scaletti, E. Maggi, S. Romagnani // *J Neuroimmunol.* – 2000. – Vol. 109. – № 1. – P. 30–33.

127. Role of Neutrophils, Platelets, and Extracellular Vesicles and Their Interactions in COVID-19-Associated Thrombopathy / A. Caillon, A. Trimaille, J. Favre [et al.] // *J. ThrombHaemost.* – 2021. – Vol. 20. – № 1.– P. 1-15.

128. Role of paternal antigen-specific Treg cells in successful implantation / S. Saito, T. Shima, A. Nakashima [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2016.– Vol. 75. – № 3. – P. 310-316.

129. Romero R. Preterm labor: one syndrome, many causes / R. Romero, S.K. Dey, S.J. Fisher // *Science.* – 2014. – Vol. 345. – № 6198. – P. 760-765.

130. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells / J.H. Jung, M.-S. Rha, M. Sa [ et al.] // *Nat Commun.* – 2021. – Vol. 12.– № 1:4043. – P. 1-12.

131. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder [et al.] // *Cell.* – 2020. – Vol. 181.– № 2. – P. 271-280.

132. Savasan, Z.A. Second- and third-trimester biochemical and ultrasound markers predictive of ischemic placental disease / Z.A. Savasan, L.F. Goncalves, R.O. Bahado-Singh // *Semin Perinatol.* – 2014. – Vol. 38.– № 03. – P. 167-176.

133. Schlagenhauf, A. Comparative Evaluation of PAR1, GPIb-IX-V, and Integrin AIIb $\beta$ 3 Levels in Cord and Adult Platelets / A. Schlagenhauf, S. Schweintzger, R. Birner-Grünberger // *Hamostaseologie* – 2010. – Vol. 30. – № 1.– P. 164-167.

134. Stafstrom, C.E. COVID-19: neurological considerations in neonates and children / C.E. Stafstrom, L.L. Jantzie // *Children (Basel).* – 2020. – Vol. 7. – № 9.– P. 133-137.

135. Staphylococcus Aureus-Induced Complement Activation Promotes Tissue Factor-Mediated Coagulation / E.W. Skjeflo, D. Christiansen, H. Fure [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2018. – Vol. 16. – № 5. – P. 905-918.

136. Stella, C.L. Preeclampsia: Diagnosis and management of the atypical presentation / C.L. Stella, B.M. Sibai // *J Matern Fetal Neonatal Med* – 2006. – Vol. 19. – № 7. – P. 381-386.

137. Symptoms and critical illness among obstetric patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) Infection / M. Andrikopoulou, N. Madden, T. Wen [et al.] // *Obstetrics & gynecology*. – 2020. – Vol. 136. – № 2. – P. 291–299.

138. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19 / X.-H. Luo, Y. Zhu, J. Mao, R.-C. Du // *Scand J Immunol*. – 2021. – Vol. 93. - № 3. – E. 12989.

139. Tanaka, T. IL-6 in inflammation, Immunity, and disease / T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2014. – Vol. 6. – № 10:016295.

140. Tang, N. Response to Lupus Anticoagulant is Frequent in Patients With Covid-19 / N. Tang // *J. Thromb. Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18. – № 8. – P. 2065-2066.

141. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps / B. J. Barnes, J. M. Adrover, A. Baxter-Stoltzfus et al. // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 217. – № 6. – A. 6405. – P. 1-7.

142. Term and preterm labour are associated with distinct microbial community structures in placental membranes which are independent of mode of delivery / R.M. Doyle, D.G. Alber, H.E. Jones [et al.] // *Placenta*. – 2014. – Vol. 35.– № 12. – P. 1099–1101.

143. The CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage / L.P. Jin, Q.Y. Chen, T. Zhang [et al.] // *Clin Immunol*. – 2009. – Vol. 133. – № 3. – P. 402-410.

144. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization / A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani [et al.] // *Trends Immunol*. – 2004.– Vol. 25. – № 12. – P. 677-686.

145. The cytokine storm in COVID-19: an overview of the involvement of the chemokine/chemokine receptor system / F. Coperchini, L. Chiovato, L. Croce [et al.] // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2020. – Vol. 53. – P. 25-32.

146. The Hemostatic System in Newborns and the Risk of Neonatal Thrombosis / J. Khizroeva, A. Makatsariya, A. Vorobev [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 18:13864.

147. The Impact of Pre-Existing Comorbidities and Therapeutic Interventions on COVID-19 / L.A. Callender, M. Curran, S.M. Bates [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – A. 1991. – P. 1-16.

148. The Indoleamine 2,3-Dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation / W. Chen, X. Liang, A.J. Peterson [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – № 8. – P. 5396–5404.

149. The Pathobiological Basis for Thrombotic Complications in COVID-19: a Review of the Literature / L. Hoteit, A.P. Deeb, E.A. Andraska [et al.] // *Curr Pathobiol Rep.* – 2021. – Vol. 9. – № 4. – P. 107-117.

150. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy / Pijnenborg R., Bland J.M., Robertson W.B., Dixon G., Brosens I. // *Placenta.* – 1981. – Vol 2. – №04. – P.303-316.

151. The prognostic value of ADAMTS-13 and von Willebrand factor in COVID-19 patients: prospective evaluation by care setting / G. Tiscia, G. Favuzzi, A. De Lorenzo [et al.] // *Diagnostics (Basel).* – 2021. – Vol. 11. – № 9:1648.

152. The SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression of maternal-fetal interface and fetal organs by single-cell transcriptome study / M. Li, L. Chen, J. Zhang [et al.] // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15. – № 4. – E. 0230295.

153. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function / M. Della Chiesa, S. Carlomagno, G. Frumento [et al.] // *Blood.* – 2006. – Vol. 108. – № 13. – P. 4118-4125.

154. The World Health Organization : офиц. сайт. – URL: <https://www.who.int>

155. Third trimester placentas of sars-cov-2-positive women: histomorphology, including viral immunohistochemistry and in situ hybridization / M.C. Smithgall, X. Liu-Jarin, D. Hamele-Bena [et al.] // *Histopathology.* – 2020. – Vol. 77. – № 6. – P. 994-999.

156. Trajectory of platelets in pregnancy - do low-risk women need an intrapartum full blood count prior to epidural / C. Duong, G. Kidson-Gerber, N. Peters [et al.] // *Aust. NZJ. Obstet. Gynaecol.* – 2015. – Vol. 55. – № 5. – P. 511-514.

157. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients / Y. Xiong, Y. Liu, L. Cao [et al.] // *Emerg. Microb. Infect.* – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 761-770.

158. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface / K. Red-Horse, Y. Zhou, O. Genbacev [et al.] // *J Clin Invest.* – 2004. – Vol. 114. – № 06 – P. 744-754.

159. Uchikova, E.H. Changes in haemostasis during normal pregnancy / E.H. Uchikova, II. Ledjev // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2005. – Vol. 119.– № 2.– P. 185-188.

160. Varga, Z. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 / Z. Varga // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395. – № 10234. – P. 1417-1418.

161. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19 / X. Zhang, Y. Tan, Y. Ling [et al.] // *Nature.* – 2020. – Vol. 583.– № 7816. – P. 437-440.