

DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ633994>

Оригинальное исследование | УДК 616-092.11: 616.151.5: 578.1



Анализ плазменного гемостаза и роли микровезикул в процессе коагуляции у пациентов с COVID-19

Е.С. Грачева, Р.Р. Абдуллина, И.Г. Мустафин, Д.И. Абдулганиева

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

АННОТАЦИЯ

Актуальность. Коагулопатии при COVID-19 — важный аспект в патофизиологических механизмах, клинической картине заболевания, возникновении отсроченных осложнений.

Цель. Изучение плазменного гемостаза методом турбидиметрии, тромбоэластографии и роли микровезикул в процессе коагуляции у пациентов с COVID-19.

Материал и методы. В исследовании использовали образцы крови пациентов временного инфекционного госпиталя на базе ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» г. Казани (n=213) в период с июня по август 2020 г. Пациенты разделены на две группы по степени тяжести заболевания: первая группа — среднетяжелое течение COVID-19 (n=138), вторая группа — тяжелое течение COVID-19 (n=75). Лечение пациентов проводили согласно протоколам Временных методических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации, версия 7. В качестве контрольной группы использовали кровь здоровых доноров (n=20). Плазменный гемостаз оценивали методами динамической турбидиметрии (измеряли lag-период — Lag, скорость полимеризации — V, максимальную оптическую плотность при данной длине волны — $A_{\max}$) и тромбоэластографии (определяли время активации коагуляции — R). Статистическую обработку результатов проводили с помощью IBM SPSS Statistics 26.0. Сравнение групп осуществляли с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Статистическую обработку результатов, подчиняющихся закону нормального распределения, выполняли с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Тяжелое течение COVID-19 отличается удлинением lag-периода ($9,4 \pm 0,8$ мин относительно контроля $6,2 \pm 1,2$ мин; $p < 0,0001$), снижением скорости полимеризации ($1,12 \pm 0,71$ ед. ОП/с относительно контроля $3,93 \pm 2,3$ ед. ОП/с; $p < 0,0001$) и уменьшением максимальной оптической плотности сгустка ($0,576 \pm 0,17$ ед. ОП относительно контроля $1,625 \pm 0,433$ ед. ОП; $p < 0,0001$). При среднетяжелом течении отметили укорочение lag-периода ($3,8 \pm 1,1$ мин относительно контроля $6,2 \pm 1,2$ мин; $p = 0,0004$), максимальная оптическая плотность сгустка была ниже контроля ($1,412 \pm 0,351$ ед. ОП при $1,625 \pm 0,433$ ед. ОП соответственно; $p = 0,0007$). У пациентов со средней степенью тяжести заболевания отмечено сокращение времени активации коагуляции в 1,6 раза относительно контрольной группы. У пациентов с тяжелым течением время активации коагуляции увеличено в 1,5 раза относительно контроля. После внесения в пробы микровезикул у пациентов со средним течением данный параметр сократился в 2,12 раза ($16,9 \pm 1,1$ мин и $8 \pm 0,6$ мин; $p < 0,0001$), а у пациентов с тяжелым течением в 1,44 раза ($10,8 \pm 0,9$ мин и $7,5 \pm 0,5$ мин; $p < 0,0001$).

Вывод. Для среднетяжелого течения COVID-19 характерны признаки гиперкоагуляции, что может привести к возникновению тромботических осложнений; тяжелое течение заболевания сопровождается гипокоагуляцией, которая способствует геморрагическим осложнениям.

Ключевые слова: COVID-19; полимеризация фибринового сгустка; плазменный гемостаз; микровезикулы.

Как цитировать:

Грачева Е.С., Абдуллина Р.Р., Мустафин И.Г., Абдулганиева Д.И. Анализ плазменного гемостаза и роли микровезикул в процессе коагуляции у пациентов с COVID-19 // Казанский медицинский журнал. 2024. Т. 105, № 6. С. 917–925. doi: <https://doi.org/10.17816/KMJ633994>

Original Study | DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ633994>

Analysis of plasma hemostasis and the role of microvesicles in the coagulation process in patients with COVID-19

Elena S. Gracheva, Rufina R. Abdullina, Il'shat G. Mustafin, Diana I. Abdulganieva

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Coagulopathies in COVID-19 are an important aspect in the pathophysiological mechanisms, clinical picture of the disease, and occurrence of delayed complications.

AIM: To study plasma hemostasis using turbidimetry, thromboelastography, and the role of microvesicles in the coagulation process in patients with COVID-19.

MATERIAL AND METHODS: The study used blood samples from patients of the temporary infectious diseases hospital based on the State Autonomous Healthcare Institution "Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan" in Kazan (n=213) in the period from June to August 2020. Patients were divided into two groups according to the severity of the disease: the first group — moderate COVID-19 (n=138), the second group — severe COVID-19 (n=75). Patients were treated according to the protocols of the Temporary Methodological Recommendations of the Ministry of Health of the Russian Federation, version 7. The blood of healthy donors (n=20) was used as a control group. Plasma hemostasis was assessed using dynamic turbidimetry (measured lag period — Lag, polymerization rate — V, maximum optical density at a given wavelength — $A_{\max}$) and thromboelastography (determined coagulation activation time — R). Statistical processing of the results was performed using IBM SPSS Statistics 26.0. The groups were compared using the nonparametric Mann–Whitney U-test. Statistical processing of the results following standart normal distribution was performed using the Student's t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS: Severe COVID-19 was characterized by an increase in the lag period (9.4 ± 0.8 min relative to the control 6.2 ± 1.2 min; $p < 0.0001$), a decrease in the polymerization rate (1.12 ± 0.71 OD units/s relative to the control 3.93 ± 2.3 OD units/s; $p < 0.0001$) and a decrease in the maximum optical density of the clot (0.576 ± 0.17 OD units relative to the control 1.625 ± 0.433 OD units; $p < 0.0001$). In moderate cases, a shortening of the lag period was noted (3.8 ± 1.1 min relative to the control 6.2 ± 1.2 min; $p = 0.0004$), the maximum optical density of the clot was lower than the control (1.412 ± 0.351 OD units at 1.625 ± 0.433 OD units, respectively; $p = 0.0007$). In patients with moderate disease severity, a 1.6-fold reduction in coagulation activation time was noted relative to the control group. In patients with severe disease, coagulation activation time was increased by 1.5 times relative to the control. After adding microvesicles to the samples, this parameter decreased by 2.12 times in patients with a moderate course of the disease (16.9 ± 1.1 min and 8 ± 0.6 min; $p < 0.0001$), and by 1.44 times in patients with a severe course of the disease (10.8 ± 0.9 min and 7.5 ± 0.5 min; $p < 0.0001$).

CONCLUSION: Moderate COVID-19 is characterized by signs of hypercoagulation, which can lead to the development of thrombotic complications; severe disease is accompanied by hypocoagulation, which contributes to hemorrhagic complications.

Keywords: COVID-19; fibrin clot polymerization; plasma hemostasis; microvesicles.

To cite this article:

Gracheva ES, Abdullina RR, Mustafin IG, Abdulganieva DI. Analysis of plasma hemostasis and the role of microvesicles in the coagulation process in patients with COVID-19. *Kazan Medical Journal*. 2024;105(6):917–925. doi: <https://doi.org/10.17816/KMJ633994>

Received: 01.07.2024

Accepted: 23.08.2024

Published: 07.11.2024

АКТУАЛЬНОСТЬ

Коронавирусная инфекция COVID-19 (от англ. COronaVirus Disease 2019 — коронавирусная инфекция 2019 г.) проявляется в разных формах и отличается степенью поражения и вовлечённости в процесс органов и тканей у пациентов [1]. Несмотря на то обстоятельство, что 5 мая 2023 г. Всемирная организация здравоохранения отменила статус пандемии для COVID-19, по сей день осложнения, связанные с COVID-19, остаются актуальными, и нет ответа на вопрос, как можно гарантированно их предотвратить. COVID-19 протекает по-разному — от практически бессимптомного течения до крайне тяжёлого, вплоть до подключения пациентов к искусственной вентиляции лёгких [2].

С первых месяцев изучения вируса SARS-CoV-2 (от англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2 — второй коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома) и заболевания, которое он вызывает, стало очевидно, что в патогенез активно вовлекается свёртывающая система крови [3]. Наиболее частой причиной смерти больных COVID-19 становятся тромботические осложнения: венозные и артериальные тромбозы, тромбозы глубоких вен, тромбозы лёгочной артерии, артериальная тромбоземболия, тромбозы на уровне микроциркуляторного русла и инсульты [4]. Частота тромботических осложнений зависит от тяжести течения заболевания, с более высокой распространённостью у пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии [5].

Нарушение работы свёртывающей системы при COVID-19 — важный аспект в патофизиологических механизмах, клинической картине заболевания и, что немаловажно, в возникновении отсроченных осложнений [6]. Крайне необходимо выявлять риск развития тромботических и геморрагических осложнений, используя верную интерпретацию показателей стандартной коагулограммы, а также данных дополнительных видов исследований системы гемостаза, таких как изучение процессов формирования фибриновых сгустков методом турбидиметрии и исследование плазменного гемостаза методом тромбоэластографии.

Эти методы способны дать дополнительную информацию при формировании корректной тактики лечения и назначении адекватной терапии. Благодаря комплексной оценке патогенетических нарушений системы свёртывания у пациентов с COVID-19 возрастает вероятность назначения эффективной терапии с благоприятным прогнозом.

Первые исследования, доказывающие прокоагулянтные свойства микровезикул (МВ), опубликованы в 60–70-х годах XX века [7, 8].

Опубликованы данные, где описано значительное влияние в развитии гиперкоагуляции при COVID-19, связанное с МВ [9–11]. В исследованиях Н.А. Namali и соавт. у пациентов с COVID-19 был отмечен значительно повышенный уровень прокоагулянтных МВ и МВ, несущих тканевой фактор, по сравнению с контрольной здоровой группой

($p < 0,001$). Сделано предположение о возможной роли повышенного содержания прокоагулянтных МВ и МВ, несущих тканевой фактор, у пациентов с COVID-19 в качестве ранних маркёров для прогнозирования тяжести COVID-19, в том числе возможного нового биомаркёра для оценки прокоагулянтной активности [12]. Было доказано, что МВ, выделяемые апоптозными стимулированными клетками клеточных линий различного происхождения (тромбоцитарные, лейкоцитарные, макрофагальные и т.д.), могут служить надёжными маркёрами повреждения сосудов [13].

С. Guervilly и соавт. получили данные о высоких уровнях внеклеточных МВ, несущих тканевой фактор, при тяжёлом течении COVID-19 [14]. Для пациентов с этим заболеванием характерно присутствие во внеклеточном пуле тромбоцитарных и лейкоцитарных МВ. Снижение количества МВ, отделяющихся от эндотелиоцитов, обусловлено их связыванием с другими клетками крови. МВ рассматривают в роли маркёров активации гемостаза, в том числе как показатель риска развития тромботических осложнений при COVID-19, превышающих по чувствительности такой зарекомендовавший себя тест, как определение содержания D-димера. Общее количество внеклеточных МВ (CD9⁺) в группе пациентов с COVID-19 при госпитализации было сопоставимо в группе пациентов с венозной тромбоземболией и с постэмболическими осложнениями [15].

Доказанное влияние МВ на свёртывающую систему при различных видах патологии даёт повод предположить, что при COVID-19 они активно задействованы. Именно поэтому изучение влияния МВ на свёртывающую систему у пациентов с COVID-19 так актуально на сегодняшний день.

Цель исследования — изучить плазменный гемостаз *in vitro* методами турбидиметрии, тромбоэластографии и роль микровезикул в процессе коагуляции у пациентов с новой коронавирусной инфекцией различной степени тяжести.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данное исследование относится к ретроспективным клиническим, рандомизированным, «случай-контроль». По типу принимаемых значений исследуемые (регистрируемые) показатели (конечные точки) — количественные (количество МВ, показатели тромбоэластограммы, динамической турбидиметрии).

Для исследования использована кровь, взятая однократно в пробирки с цитратом натрия, объёмом 4,5 мл из локтевой вены у 213 пациентов временного инфекционного госпиталя на базе ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» г. Казани в период с июня по август 2020 г. Диагноз «U07.1. Коронавирусная инфекция COVID-19» у пациентов, включённых в данное исследование, был подтверждён анализом содержимого носоглотки и ротоглотки методом полимеразной цепной реакции. Контрольная группа состояла из 20 здоровых

добровольцев. Взятие образцов крови осуществляли на базе отделения переливания крови ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» г. Казани параллельно со сбором материала для исследования.

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол №2 от 16.02.2021), все пациенты подписали информированное согласие на участие в данной работе.

Пациенты разделены на две группы в зависимости от тяжести течения заболевания:

- первая группа — среднетяжёлое течение, КТ2–3¹, получали эноксапарин натрия подкожно 0,6 мг 2 раза в день;

- вторая группа — тяжёлое течение, КТ4, установлена гепариновая помпа 20 000 ЕД (гепарин натрия), пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии.

Средний возраст пациентов первой группы составил $63 \pm 10,3$ года (от 35 до 79 лет), второй группы — $66,3 \pm 12,1$ года (от 32 до 87 лет; $p=0,008$), контрольной группы — $53,5 \pm 10,9$ года (от 33 до 71 года). В первой группе 131 (94,9%) пациент имел в анамнезе сопутствующие заболевания, в том числе 128 (92,7%) — гипертоническую болезнь I–III степени, 99 (71,7%) — сахарный диабет 2-го типа. Во второй группе 75 (100%) пациентов имели в анамнезе сопутствующие заболевания, в том числе 74 (98,6%) — гипертоническую болезнь I–III степени, 56 (74,6%) — сахарный диабет 2-го типа. Все пациенты второй группы были подключены к искусственной вентиляции лёгких, 66 (88%) больных скончались. Различия сравниваемых групп по полу не имели статистической значимости ($p=0,119$).

Критерии включения в исследование: подтверждённый методом полимеразной цепной реакции диагноз COVID-19, согласие пациента или его представителя на участие в исследовании. Критерии исключения: отказ пациента или его представителя от участия в исследовании, неподтверждённый диагноз COVID-19.

Бестромбоцитарную плазму крови (БТП) получали путём двойного центрифугирования: при 1500 g 15 мин и далее в режиме 10 000 g 5 мин для выделения тромбоцитов и последующего очищения от них образцов плазмы крови. Надосадочную жидкость отбирали в чистые эппендорфы для дальнейшего исследования.

Определение кинетики полимеризации фибрина проводили с помощью метода динамической турбидиметрии. Для измерения оптической плотности использовали спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ Спектр, г. Санкт-Петербург, Россия) с программным обеспечением «Кинетика». Для этого в кювете смешивали 400 мкл БТП и 400 мкл 0,025 М CaCl_2 . Начало активации свёртывающей системы регистрировали сразу после рекальцификации плазмы (нулевой момент времени). Формирование сгустка

определяли по увеличению оптической плотности образца вследствие образования нерастворимых фибриновых волокон из растворимого фибриногена. Регистрацию проводили при длине волны 340 нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм в течение 60 мин. Исследования выполняли при температуре +24 °С.

При анализе турбидиметрической кривой определяли lag-период (Lag), соответствующий времени генерации тромбина и образования протофибрилл, скорость полимеризации (V) — повышение оптической плотности на отрезке её нарастания в единицу времени, которое характеризует скорость латеральной агрегации и формирования волокон фибрина, и максимальную оптическую плотность при данной длине волны (A_{max}), определяемой количеством полимеризованного белка и толщиной фибриновых волокон.

Для оценки гемостаза также применяли метод тромбозластографии с использованием тромбозластографа TEG 5000 (Haemonetics, США). Тромбозластограмма, в отличие от классических клотинговых исследований, отображает кинетику всех стадий формирования тромба с учётом вклада как плазменных, так и клеточных (тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов) участников гемостатических реакций, а также фибринолиз [16]. В нашем исследовании данный метод использован для оценки коагуляционного гемостаза в образцах БТП.

Подсчёт абсолютного количества МВ определяли методом проточной цитометрии на приборе FACS Calibur (Becton Dickinson, США) методом L.V. Iversen (2013) с некоторыми доработками. БТП смешивали с фосфатным буфером (водородный показатель $\text{pH}=7,4$) в соотношении 9:1.

Абсолютное количество МВ в 1 мкл определяли по светорассеянию за фиксированное время (60 с) с использованием программы CellQuest, регистрируя количество событий за единицу времени (60 с) с учётом скорости потока. Цитометрический анализ распределения частиц по размеру (FSC) и гранулярности (SSC) в логарифмических шкалах позволяет локализовать сигналы МВ в определённой зоне. Для калибровки прибора и ограничения области подсчёта МВ использовали стандартные синтетические сферические частицы с диаметром 1, 2, 3, 5, 6 и 10 мкм (BD Pharmingen, США).

Для изучения влияния МВ на процессы свёртывания крови методом тромбозластографии БТП предварительно двукратно центрифугировали с забуференным изотоническим раствором натрия хлорида в режиме 10 000 g по 30 мин. Далее отбирали супернатант, в осадённые МВ добавляли 200 мкл изотонического раствора натрия хлорида, получая взвесь. В исследуемые образцы добавляли 240 мкл опытного образца БТП, 20 мкл 0,2 М CaCl_2 , 100 мкл МВ. Для исключения влияния гепаринотерапии на результаты исследование проводили в реакционных кюветах, содержащих гепариназу. В качестве контрольного образца

¹ КТ — компьютерная томография.

Таблица 1. Влияние степени тяжести течения COVID-19 на кинетику фибринообразования
Table 1. The influence of the COVID-19 severity on the kinetics of fibrin formation

Показатель	Контроль, n=20	Первая группа (среднее течение), n=138	Вторая группа (тяжёлое течение), n=75
V (скорость полимеризации фибринового сгустка), ед. ОП/с	3,93±2,3	5,44±2,47 p=0,0013	1,12±0,71 p<0,0001
Lag-период, мин	6,2±1,2	3,8±1,1 p=0,0004	9,4±0,8 p<0,0001
A _{max} , ед. ОП	1,625±0,433	1,412±0,351 p=0,0007	0,576±0,17 p<0,0001

Примечание: ОП — оптическая плотность; A_{max} — максимальная оптическая плотность при данной длине волны; p — достоверность различий в сравнении с контролем.

использовали 340 мкл нативной БТП пациентов, активировав фибринообразование 20 мкл 0,2 М CaCl₂. Таким образом, сравнивали результаты тромбоэластограмм пациентов без участия MB и после внесения их в образцы.

Параметр тромбоэластограммы, который мы использовали для оценки плазменного гемостаза, — R (reaction time), время активации коагуляции.

Обработку и графическое представление результатов турбидиметрии проводили с использованием программы OriginLab 2021 (OriginLab Corporation, США), статистический анализ результатов — с применением программы IBM SPSS Statistics 26.0. Количественные показатели оценивали на предмет нормальности распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Значимость различий между группами данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Статистическую обработку результатов исследования, подчиняющихся закону нормального распределения, выполняли с использованием t-критерия Стьюдента с расчётом среднего значения и стандартного отклонения.

В таблицах данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (M±m), где n — объём выборки. Все данные, представленные в работе, статистически значимы (p < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели динамики фибринообразования, полученные методом турбидиметрии, между опытными группами достоверно различаются. Тяжёлое течение COVID-19 отличается выраженной гипокоагуляцией, снижением плотности фибринового сгустка, что свидетельствует о нарушении процесса фибринообразования. Среднетяжёлое течение заболевания, напротив, характеризуется признаками гиперкоагуляции и развитием тромботических осложнений (табл. 1).

Нами были выделены в группе с тяжёлым течением COVID-19 15 (19%) пациентов из 75, не получающих гепаринотерапию (поступивших в инфекционный госпи-

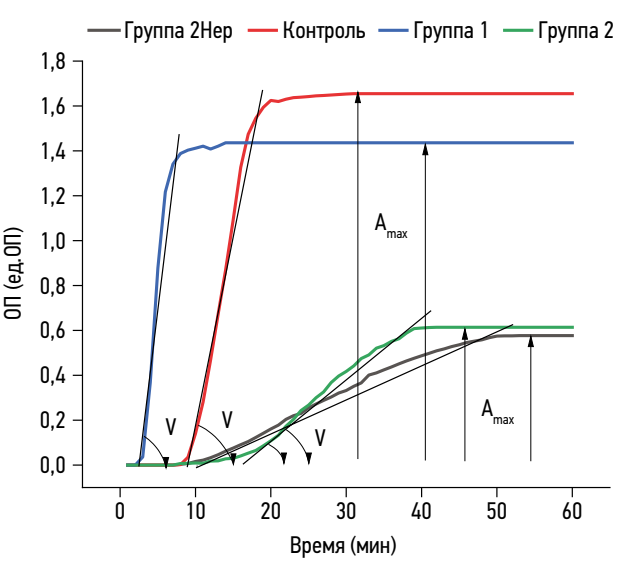


Рис. 1. Регистрация кинетики полимеризации фибрина методом динамической турбидиметрии. Определяемые параметры: лаг-период (Lag) — время до начала нарастания плотности; V — повышение оптической плотности на отрезке её нарастания в единицу времени; A_{max} — максимальная оптическая плотность при данной длине волны; контроль — группа здоровых доноров; группа 1 — среднетяжёлое течение; группа 2 — тяжёлое течение, пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии; группа 2Нер — пациенты с тяжёлым течением, не получавшие гепаринотерапию

Fig. 1. Registration of fibrin polymerization kinetics by dynamic turbidimetry. Determined parameters: lag period (Lag) — time before the density increase; V — increase in optical density during its increase per unit time; A_{max} — maximum optical density at a given wavelength; control — group of healthy donors; group 1 — moderate course; group 2 — severe course, patients of the intensive care unit; group 2Hep — patients with severe course who did not receive heparin therapy

таль в тяжёлом состоянии) (группа 2Нер). У всех пациентов этой группы, как и у пациентов на гепаринотерапии, зарегистрирована гипокоагуляция по данным кинетики фибринообразования. На рис. 1 показаны «типичные» для каждой из исследованных групп кинетические кривые.

Таблица 2. Отношение времени активации коагуляции нативного образца к времени активации коагуляции образца после введения микровезикул

Table 2. Ratio of coagulation activation time of native sample to coagulation activation time of sample after microvesicle injection

Показатель	Контроль, n=20	Первая группа (среднее течение), n=138	Вторая группа (тяжёлое течение), n=75
R/RMV	0,3±0,06	2,12±0,32 p <0,0001	1,44±0,19 p <0,0001

Примечание: R — время активации коагуляции нативного образца; RMV — время активации коагуляции после внесения микровезикул в образец; p — достоверность различий в сравнении с контролем.

Результаты тромбозластографии согласуются с полученными нами данными исследования БТП методом турбидиметрии. Исходя из результатов тромбозластографии, у группы со средней степенью тяжести COVID-19 мы отметили гиперкоагуляцию (сокращение параметра R — времени активации коагуляции), а у группы с тяжёлым течением — гипокоагуляцию (удлинение параметра R). Данные результаты отображены в табл. 2.

Из эксперимента, оценивающего влияние MB на плазменный гемостаз, мы получили данные, которые подтверждают их значительную роль в формировании фибринового сгустка путём сокращения времени активации коагуляции. У пациентов со средним течением после внесения в пробы MB данный параметр сократился в 2,1 раза (16,9±1,1 мин и 8±0,6 мин; p <0,0001), а у пациентов с тяжёлым течением — в 1,44 раза (10,8±0,9 мин и 7,5±0,5 мин; p <0,0001) (рис. 2). В контрольной группе достоверного влияния MB на время активации коагуляции R не зарегистрировано (p=0,0917).

Было отмечено, что чем выше значение параметра R (время активации коагуляции), тем влияние MB более выраженное (например, по нативной БТП R=39,3 мин, после добавления отмытых MB в опытный образец мы получили результат R=13,7 мин). И наоборот, если у пациента гиперкоагуляция, MB также укорачивают время активации фибрина, но менее выражено (по нативной БТП у пациента R=9,4 мин, а после добавления MB в опытный образец значение R=8,6 мин).

Методом проточной цитометрии нами было подсчитано абсолютное количество MB в исследуемых образцах БТП, результаты представлены в табл. 3.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты исследования кинетики фибринообразования методами турбидиметрии и тромбозластографии у больных COVID-19 свидетельствуют о наличии особенностей в патогенетических процессах развития коагулопатии в зависимости от степени тяжести. По данным исследования фибринообразования

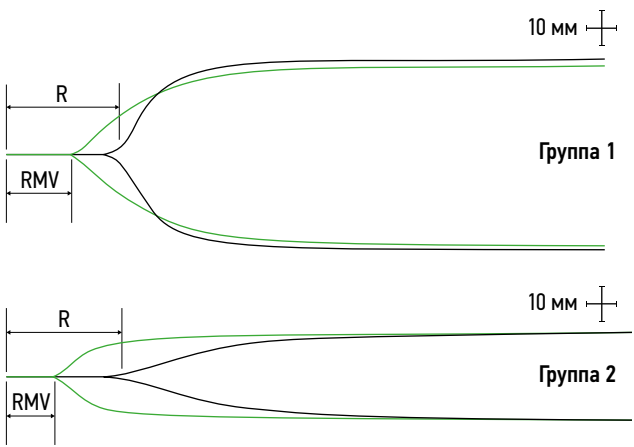


Рис. 2. Тромбозластограммы, демонстрирующие влияние микровезикул на параметры коагуляции, «типичные» для каждой из исследуемых групп (группа 1 и группа 2); R — время активации коагуляции нативного образца; RMV — время активации коагуляции после внесения микровезикул в образец

Fig. 2. Thromboelastograms demonstrating the effect of microvesicles on coagulation parameters, “typical” for each of the study groups (group 1 and group 2); R is the coagulation activation time of the native sample; RMV is the coagulation activation time after adding microvesicles to the sample

Таблица 3. Абсолютное количество микровезикул в образцах бестромбоцитарной плазмы у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести, полученные методом проточной цитометрии

Table 3. Absolute number of microvesicles in platelet-free plasma samples from patients with COVID-19 of varying severity, obtained by flow cytometry

Группа	Абсолютное количество MB в 1 мл
Контроль, n=20	14,4±1,9×10 ⁶
Первая группа (среднее течение COVID-19), n=138	12,2±1,6×10 ⁶ , p=0,3967
Вторая группа (тяжёлое течение COVID-19), n=75	3,7±0,3×10 ⁶ , p <0,0001

Примечание: p — достоверность различий в сравнении с контролем; MB — микровезикулы.

у пациентов с тяжёлым течением COVID-19 отмечена гипокоагуляция, при среднем течении — гиперкоагуляция. При этом у пациентов с тяжёлым течением гипокоагуляция определена как в группе больных, получающих гепарин, так и в группе без антикоагулянтной терапии.

Многочисленные публикации свидетельствуют о важной роли MB в процессе свёртывания крови. Отмечены прокоагулянтная роль MB и участие их в формировании фибринового сгустка, что было показано ранее в наших исследованиях [17].

В настоящем исследовании нами получены весьма интересные результаты о значительном и достоверном снижении содержания MB у пациентов с тяжёлым течением при наличии у них гипокоагуляции. В модельном эксперименте исследования влияния MB на плазменный гемостаз нами показано достоверное изменение кинетики

образования фибринового сгустка при добавлении к исследуемой плазме больных с тяжёлым течением COVID-19 БТП с высоким содержанием МВ. Это, безусловно, свидетельствует о прокоагулянтной роли МВ, и снижение их количества в периферической крови у пациентов, вероятно, связано с их активным участием в процессах коагуляции.

Увеличение времени активации коагуляции у пациентов с тяжёлым течением COVID-19, вероятно, следует считать маркёром синдрома диссеминированного сосудистого свёртывания (фазы потребления) и, как следствие, возможных геморрагических осложнений. Среднее течение заболевания характеризуется укорочением lag-периода, соответственно это свидетельствует о наличии гиперкоагуляции.

По показателям, полученным методом тромбоэластографии у данных пациентов, мы также отметили повышенную коагуляционную активность — уменьшение времени активации. Это состояние без корректной антикоагулянтной терапии с большой вероятностью приведёт к тромбозу (венозная тромбоземболия, тромбоземболия лёгочной артерии).

ВЫВОДЫ

1. Динамическая турбидиметрия и тромбоэластография служат объективными и наглядными методами исследования плазменного гемостаза пациентов с COVID-19, дополняющими рутинные методы. Они позволяют более подробно изучить изменения, происходящие в свёртывающей системе пациентов, и своевременно внести коррективы в тактику лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баклаушев В.П., Кулемзин С.В., Горчаков А.А., и др. COVID-19. Этиология, патогенез, диагностика и лечение // Клиническая практика. 2020. Т. 11, № 1. С. 7–20. doi: 10.17816/clinpract26339
2. Wang D., Hu B., Hu C., et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China // JAMA. 2020. Vol. 323, N. 11. P. 1061–1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585
3. Ройтман Е.В., Вавилова Т.В., Маркин С.М., и др. Реалии применения антикоагулянтной терапии при COVID-19 // Тромбоз, гемостаз и реология. 2021. № 1. С. 18–25. doi: 10.25555/THR.2021.1.0957
4. Колесников В.В., Ройтман Е.В., Леонов А.А. Антикоагулянтная терапия у пациентов с тяжёлым течением COVID-19 и высоким риском кровотечения // Тромбоз, гемостаз и реология. 2022. № 1. С. 59–68. doi: 10.25555/THR.2022.1.1010
5. Шатохин Ю.В., Снежко И.В., Рябикина Е.В. Нарушение гемостаза при коронавирусной инфекции // Южно-Российский журнал терапевтической практики. 2021. Т. 2, № 2. С. 6–15. doi: 10.21886/2712-8156-2021-2-2-6-15
6. Йокота Ш., Куройва Е., Нишиока К. Новая коронавирусная болезнь (COVID-19) и «цитокиновый шторм». Перспективы эффективного лечения с точки зрения патофизиологии воспалительного процесса // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 4. С. 13–25. doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-4-13-25

2. Система плазменного гемостаза пациентов с COVID-19 меняется в сторону гипокоагуляции и гиперкоагуляции в зависимости от тяжести течения заболевания.

3. Абсолютное количество микровезикул в периферической крови достоверно ниже у пациентов с тяжёлым течением заболевания по сравнению с группами со средней степенью тяжести и контрольной.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Е.С.Г. — концептуализация, анализ, редактирование рукописи, исследование; Р.Р.А. — методология, валидация, создание черновика; И.Г.М. — редактирование рукописи, окончательное утверждение статьи; Д.И.А. — ресурсы, общее руководство.

Источник финансирования. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. E.S.G. — conceptualization, formal analysis, writing — review and editing, investigation; R.R.A. — methodology, validation, writing — original draft; I.G.M. — writing — review and editing, final approval of the article; D.I.A. — resources, supervision.

Funding source. The study had no sponsorship support.

Competing interests. The authors declare no conflict of interest regarding the presented article.

7. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma // Br J Haematol. 1967. Vol. 13, N. 3. P. 269–288. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x
8. Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.Д. Микровезикулы в крови: функции и их роль в тромбообразовании. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 167 с.
9. Panigada M., Bottino N., Tagliabue P., et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis // J Thromb Haemost. 2020. Vol. 18, N. 7. P. 1738–1742. doi: 10.1111/jth.14850
10. Hippensteel J.A., Burnham E.L., Jolley S.E. Prevalence of venous thromboembolism in critically ill patients with COVID-19 // Br J Haematol. 2020. Vol. 190, N. 3. P. 134–137. doi: 10.1111/bjh.16908
11. Хисматуллин Р.Р., Иваева Р.А., Абдуллаева Ш., и др. Патоморфологические проявления воспалительного микротромбоза при COVID-19 // Казанский медицинский журнал. 2022. Т. 103, №4. С. 575–586. doi: 10.17816/KMJ2022-575
12. Hamali H.A., Saboor M., Dobie G., et al. Procoagulant microvesicles in COVID-19 patients: Possible modulators of inflammation and prothrombotic tendency // Infect Drug Resist. 2022. Vol. 15. P. 2359–2368. doi: 10.2147/IDR.S355395
13. Nieri D., Neri T., Petrini S., et al. Cell-derived microparticles and the lung // Eur Respir Rev. 2016. Vol. 141, N. 25. P. 266–277. doi: 10.1183/16000617.0009-2016

14. Guervilly C., Bonifay A., Burtsey S., et al. Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19 // *Blood Adv.* 2021. Vol. 5, N. 3. P. 628–634. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003308
15. Сироткина О.В., Ермаков А.И., Жиленкова Ю.И., и др. Динамика образования микровезикул клеток крови у больных COVID-19 на разных стадиях заболевания // *Профилактическая и клиническая медицина.* 2021. Т. 81, № 4. С. 68–74. doi: 10.47843/2074-9120_2021_4_68

REFERENCES

1. Baklaushev VP, Kulemsin SB, Gorchakov AA, Lesnyak VN, Yusubalieva GM, Sotnikova AG. COVID-19. Etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Practice.* 2020;11(1):7–20. (In Russ.) doi: 10.17816/clinpract26339
2. Wang D, Hu B, Hu C. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061–1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585
3. Roitman EV, Vavilova TV, Markin SM, Kravtsov PF, Mazayshvili KV. The realities of the anticoagulant therapy using in COVID-19. *Tromboz, Gemostaz i Reologiya.* 2021;(1):18–25. (In Russ.) doi: 10.25555/THR.2021.1.0957
4. Kolesnikov VV, Roitman EV, Leonov AA. Anticoagulant treatment for severe COVID-19 with high bleeding risk. *Tromboz, Gemostaz i Reologiya.* 2022;(1):59–68. (In Russ.) doi: 10.25555/THR.2022.1.1010
5. Shatohin YuV, Snezhko IV, Ryabikina EV. Violation of hemostasis in coronavirus infection. *South Russian Journal of Therapeutic Practice.* 2021;2(2):6–15. (In Russ.) doi: 10.21886/2712-8156-2021-2-2-6-15
6. Yokota S, Kuroiwa E, Nishioka K. Novel coronavirus disease (COVID-19) and cytokine storms. For more effective treatments from the viewpoints of an inflammatory pathophysiology perspective. *Infectious diseases: news, opinions, training.* 2020;9(4):13–25. doi: 10.33029/2305-3496-2020-9-4-13-25
7. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269–288. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x
8. Zubairov DM, Zubairova LD. *Mikrovezikuly v krovi: funktsii i ikh rol' v tromboobrazovanii.* (Microvesicles in the blood: functions and their role in thrombus formation.) Moscow: GEOTAR-MED; 2009. 167 p. (In Russ.)
9. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, Grasselli G, Novembrino C, Chantarangkul V, Pesenti A, Peyvandi F, Tripodi A. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2020;18(7):1738–1742. doi: 10.1111/jth.14850
10. Hippensteel JA, Burnham EL, Jolley SE. Prevalence of venous thromboembolism in critically ill patients with COVID-19. *Br J Haematol.* 2020;190(3):e134–e137. doi: 10.1111/bjh.16908
11. Khismatullin RR, Ivaeva RA, Abdullayeva S, Shakirova AZ, Khuzin FF, Kiassov AP, Litvinov RI. Pathological manifestations of inflammatory microthrombosis in COVID-19. *Kazan Medical Journal.* 2022;103(4):575–586 (In Russ.) doi: 10.17816/KMJ2022-575
12. Hamali HA, Saboor M, Dobie G, Madkhali AM, Akhter MS, Hakamy A, Al-Mekhlafi HM, Jackson DE, Matari YH, Mobarki AA. Procoagulant microvesicles in COVID-19 patients: Possible modulators of inflammation and prothrombotic tendency. *Infect Drug Resist.* 2022;15:2359–2368. doi: 10.2147/IDR.S355395
13. Nieri D, Neri T, Petrini S, Vagaggini B, Paggiaro P, Celi A. Cell-derived microparticles and the lung. *Eur Respir Rev.* 2016;25(141):266–277. doi: 10.1183/16000617.0009-2016
14. Guervilly C, Bonifay A, Burtsey S, Sabatier F, Cauchois R, Abdili E, Arnaud L, Lano G, Pietri L, Robert T, Velier M, Papazian L, Albanese J, Kaplanski G, Dignat-George F, Lacroix R. Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19. *Blood Adv.* 2021;5(3):628–634. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003308
15. Sirotkina OV, Ermakov AI, Zhilenkova YI, Zolotova EA, Kudlay DA, Vavilova TV, Gaykovaya LB. Dynamics of microvesicle formation in blood in patients with COVID-19 at different stages of the disease. *Preventive and clinical medicine.* 2021;81(4):68–74 (In Russ.) doi: 10.47843/2074-9120_2021_4_68
16. Yarets YI. *Tromboelastografiya: osnovnye pokazateli, interpretatsiya rezul'tatov.* (Thromboelastography: main indicators, interpretation of results.) Gomel: State Institution "RNPC RMiEH"; 2018. 26 p. (In Russ.)
17. Nabiullina RM, Mustafin IG, Ataulakhanov FI, Litvinov RI, Zubairova L.D. Thrombin-mediated effects of blood microparticles on formation, structure, and stability of fibrin clots. *IM Sechenov Russian Journal of Physiology.* 2015;101(7):812–821. (In Russ.) EDN: UABUTT

ОБ АВТОРАХ

***Грачева Елена Сергеевна**, асп., асс., каф. биохимии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия;
ORCID: 0000-0002-8543-6529;
eLibrary SPIN: 3290-5459;
e-mail: gracheva020688@mail.ru

Абдуллина Руфина Рустамовна, асс., каф. биохимии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия;
ORCID: 0009-0000-5975-4390;
eLibrary SPIN: 7099-8375;
e-mail: rufina.abdullina.r@mail.ru

Мустафин Ильшат Ганиевич, д-р мед. наук, проф., зав. каф., каф. биохимии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия;
ORCID: 0000-0001-9683-3012;
eLibrary SPIN: 1588-6988;
e-mail: ilshat.mustafin@kazangmu.ru

Абдулганиева Диана Ильдаровна, д-р мед. наук, проф., зав. каф., каф. госпитальной терапии, ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия;
ORCID: 0000-0001-7069-2725;
eLibrary SPIN: 6676-4270;
e-mail: diana_s@mail.ru

AUTHORS' INFO

***Elena S. Gracheva**, Postgrad. Stud., Assist.,
Depart. of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics,
Kazan State Medical University, Kazan, Russia;
ORCID: 0000-0002-8543-6529;
eLibrary SPIN: 3290-5459;
e-mail: gracheva020688@mail.ru

Rufina R. Abdullina, Assist., Depart. of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Kazan State Medical University, Kazan, Russia;
ORCID: 0009-0000-5975-4390;
eLibrary SPIN: 7099-8375;
e-mail: rufina.abdullina.r@mail.ru

Il'shat G. Mustafin, MD, D. Sci. (Med.), Prof., Head of Depart.,
Depart. of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics,
Kazan State Medical University, Kazan, Russia;
ORCID: 0000-0001-9683-3012;
eLibrary SPIN: 1588-6988;
e-mail: ilshat.mustafin@kazangmu.ru

Diana I. Abdulganieva, MD, D. Sci. (Med.), Prof., Head of Depart.,
Depart. of Hospital Therapy, Kazan State Medical University, Kazan, Russia;
ORCID: 0000-0001-7069-2725;
eLibrary SPIN: 6676-4270;
e-mail: diana_s@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author