

DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ685965> EDN: KLXJZX

Роль микровезикул и нетоза при коагулопатиях у пациентов с COVID-19: рандомизированное клиническое исследование

Е.С. Грачева¹, И.Г. Мустафин¹, Д.В. Самигуллин^{2,3}, Д.И. Абдулганиева¹¹ Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;² Казанский институт биохимии и биофизики — Казанский научный центр Российской академии наук, г. Казань, Россия;³ Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева-КАИ, г. Казань, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Высокая частота тромботических осложнений при COVID-19 существенно ухудшает прогноз заболевания. Ключевая проблема заключается в недостаточной изученности механизмов, связывающих системное воспаление и активацию нейтрофилов с образованием внеклеточных ловушек, а также нарушениями гемостаза, опосредованными микровезикулами.

Цель исследования. Изучить влияние микровезикул и нейтрофильных внеклеточных ловушек на развитие коагулопатий при COVID-19 в зависимости от тяжести течения, оценив их количественные и качественные характеристики.

Методы. В исследование включены 213 пациентов с COVID-19 (138 — среднетяжелое течение, 75 — тяжелое) и 20 здоровых доноров. Всем пациентам проведены биохимические, коагулометрические и гематологические исследования. Количественный анализ микровезикул выполняли методом проточной цитометрии с моноклональными антителами к поверхностным маркерам (CD45, CD3, CD14, CD15, CD61). Взаимодействие микровезикул с нейтрофильными внеклеточными ловушками изучали методом конфокальной микроскопии (Leica TCS SP5) с применением флуоресцентных меток (DAPI, FITC, APC, PE) и последующей колокализацией в пакете Las AF. Статистический анализ выполнен с использованием критерия Стьюдента, коэффициента корреляции Спирмена и методов линейной регрессии.

Результаты. У пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 выявлена гиперкоагуляция (фибриноген 4,8 [4,00; 5,60] г/л; D-димер 0,78 [0,30; 1,28] мг/л) с повышенным уровнем микровезикул нейтрофильного (CD15⁺ 53,34±6,92%) и тромбоцитарного (CD61⁺ 59,74±11,22%) происхождения. Обнаружены нитеподобные структуры нейтрофильных внеклеточных ловушек с микровезикулами, ассоциированные с тканевым фактором (TF⁺). При тяжелом течении зарегистрировано снижение микровезикул нейтрофильного (CD15⁺ 10,32±4,29%) и тромбоцитарного (CD61⁺ 20,9±6,01%) происхождения, тромбоцитопения (139,5 [104,25; 177,75]×10⁹/л) и гипокоагуляция (международное нормализованное отношение — 2,60 [2,32; 3,58]), а также агрегаты CD62⁺-позитивных микрочастиц.

Заключение. Микровезикулы и нейтрофильные внеклеточные ловушки играют ключевую роль в нарушении системы гемостаза при COVID-19: гиперкоагуляция на ранних стадиях опосредована их прокоагулянтной активностью, тогда как при тяжелом течении снижение уровня циркулирующих в периферической крови микровезикул отражает коагулопатию потребления.

Ключевые слова: COVID-19; микровезикулы; нейтрофильные внеклеточные ловушки; гиперкоагуляция; коагулопатия потребления; иммунотромбоз; конфокальная микроскопия; проточная цитометрия; системное воспаление.

Как цитировать:

Грачева Е.С., Мустафин И.Г., Самигуллин Д.В., Абдулганиева Д.И. Роль микровезикул и нетоза при коагулопатиях у пациентов с COVID-19: рандомизированное клиническое исследование // Казанский медицинский журнал. 2025. DOI: 10.17816/KMJ685965 EDN: KLXJZX

DOI: <https://doi.org/10.17816/KMJ685965> EDN: KLXJZX

Role of Microvesicles and Netosis in Coagulopathy in Patients With SARS-CoV-2 Infection: A Randomized Clinical Trial

Elena S. Gracheva¹, Il'shat G. Mustafin¹, Dmitry V. Samigullin^{2,3}, Diana I. Abdulganieva¹¹ Kazan State Medical University, Kazan, Russia;² Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics — Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia;³ Kazan National Research Technical University named after A.N. Tupolev-KAI, Kazan, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The high incidence of thrombotic complications in patients with SARS-CoV-2 infection significantly worsens the prognosis of the disease. The primary issue is limited comprehension on the mechanisms by which systemic inflammation, neutrophil activation, extracellular neutrophil traps, and microvesicle-mediated hemostasis disorders are interconnected.

AIM: This study aimed to investigate the link between microvesicles and extracellular neutrophil traps and the occurrence of coagulopathies in patients with SARS-CoV-2 infection. The quantitative and qualitative characteristics of these phenomena were assessed based on the severity of the patients' condition.

METHODS: The study included 213 patients with SARS-CoV-2 infection (138 patients with moderate disease and 75 with severe disease) and 20 healthy donors. The patients underwent blood chemistry, coagulation, and hematology tests. A quantitative analysis of microvesicles was performed using flow cytometry with monoclonal antibodies specific for surface markers (CD45, CD3, CD14, CD15, and CD61). The interaction of microvesicles with extracellular neutrophil traps was observed by confocal microscopy (Leica TCS SP5) using fluorescent labels (DAPI, FITC, APC, and PE) and subsequently analyzed for colocalization using a LAS AF package. Statistical analysis was conducted using the Student's *t*-test, Spearman's correlation coefficient, and linear regression methods.

RESULTS: The patients with moderate SARS-CoV-2 infection had hypercoagulation (fibrinogen, 4.8 [4.00; 5.60] g/L; D-dimer, 0.78 [0.30; 1.28] mg/L), with increased levels of neutrophil-derived (CD15⁺, 53.34% ± 6.92%) and platelet-derived (CD61⁺, 59.74% ± 11.22%) microvesicles. Tissue factor-enriched filamentous extracellular neutrophil traps with microvesicles were identified. The severe cases were associated with decreased levels of neutrophil-derived (CD15⁺, 10.32% ± 4.29%) and platelet-derived (CD61⁺, 20.9% ± 6.01%) microvesicles, thrombocytopenia (139.5 [104.25; 177.75] × 10⁹/L), hypocoagulation (international normalized ratio: 2.60 [2.32; 3.58]), and CD62⁺-positive aggregates.

CONCLUSION: Microvesicles and extracellular neutrophil traps play a key role in dysregulated hemostasis in patients with SARS-CoV-2 infection. Early hypercoagulation is mediated by their procoagulant activity, and severe cases are associated with decreased levels of peripheral microvesicles, which is indicative of consumptive coagulopathy.

Keywords: SARS-CoV-2 infection; microvesicles; extracellular neutrophil traps; hypercoagulation; consumptive coagulopathy; immunothrombosis; confocal microscopy; flow cytometry; systemic inflammation.

To cite this article:

Gracheva ES, Mustafin IG, Samigullin DV, Abdulganieva DI. Role of microvesicles and netosis in coagulopathy in patients with SARS-CoV-2 infection: a randomized clinical trial. *Kazan Medical Journal*. 2025. DOI: 10.17816/KMJ685965 EDN: KLXJZX

ОБОСНОВАНИЕ

Современные данные подтверждают, что SARS-CoV-2-индуцированные нарушения в системе гемостаза ассоциированы с повышенным риском развития жизнеугрожающих осложнений и ухудшением клинического исхода COVID-19 [1]. Патогенез микро- и макрососудистых дисфункций при COVID-19, включая тромбообразование и эндотелиопатию, связан с каскадом взаимосвязанных патофизиологических механизмов, ранее детально описанных исследователями [2, 3]. Ключевым звеном патогенеза является системный воспалительный ответ, индуцирующий гиперкоагуляцию через активацию нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), дисрегуляцию тромбоцитов и высвобождение прокоагулянтных микровезикул (МВ). Этот каскадный процесс — причина явления, получившего название «тромбовоспаление» [4–6].

НВЛ представляют собой фибриллярные структуры, образованные дегранулированной ДНК в комплексе с гистонами, которые служат каркасом для связывания антимикробных белков и ферментов, включая миелопероксидазу (МПО), нейтрофильную эластазу, кателицидин и кальпротектин [7]. Состав НВЛ отличается гетерогенностью и напрямую коррелирует с природой активирующего стимула, индуцирующего процесс нетоза — программированного высвобождения внеклеточных ловушек нейтрофилами [8, 9].

Вирус SARS-CoV-2 индуцирует формирование НВЛ, которые персистируют на всех стадиях заболевания, что свидетельствует о хроническом системном воспалении. Подтверждением этого механизма служит повышение уровней МПО и цитруллинированного гистона H3 (CitH3) в нейтрофилах, инкубированных с плазмой пациентов с COVID-19 [10]. НВЛ играют ключевую роль в патогенезе коагулопатии и иммунотромбоза — жизнеугрожающих осложнений, характерных для COVID-19. Экспрессия избыточного количества НВЛ ассоциирована с повышенным риском развития этих состояний [11]. Гиперактивация нейтрофилов в условиях цитокинового шторма, сопровождающаяся массивным выбросом НВЛ, приводит к дисрегуляции процессов тромбовоспаления, усугубляя течение заболевания.

В исследованиях было показано, что и артериальные, и венозные тромбы содержат нейтрофилы и НВЛ [12]. НВЛ увеличивают общие размеры тромба, удерживая в своём составе тромбоциты и МВ [13]. На животных моделях тромбоза продемонстрировано, что при субмаксимальном сдавлении нижней полой вены формировались тромбы, богатые НВЛ [14]. При лазерном повреждении сосудистой стенки у мышей нейтрофилы первыми приходили в участок повреждения. НВЛ всегда присутствуют в тромбах, особенно на стадии организации [15]. Это же касается артериальных тромбов у пациентов с инфарктами миокарда [16], инсультами [17] и заболеваниями периферических артерий [18].

МВ представляют собой мембраносвязанные структуры, секретируемые различными типами клеток, включая тромбоциты, лейкоциты, эндотелиальные клетки и эритроциты. В контексте COVID-19 их происхождение может быть связано не только с активированными тромбоцитами и эндотелием, но также с иммунными клетками, а у пациентов с сопутствующей онкопатологией — с опухолевыми клетками [19]. Важную роль в их прокоагулянтной активности играет фосфатидилсерин (ФС), экспонируемый на поверхности МВ. Данный фосфолипид обеспечивает платформу для сборки факторов свёртывания, что приводит к активации тромбина и последующему формированию фибриновых матриц, усиливая патологическое тромбообразование [20, 21].

Прокоагулянтные свойства МВ при COVID-19 определяются их клеточным происхождением. Наиболее распространёнными в системном кровотоке являются тромбоцитарные МВ, которые демонстрируют выраженную прокоагулянтную активность. Эти МВ экспрессируют тканевой фактор (ТФ) и отрицательно заряженные фосфолипиды, включая ФС, что создает каталитическую поверхность для генерации тромбина и активации каскада свёртывания [22]. Лейкоцитарные МВ, в особенности происходящие из нейтрофилов и моноцитов, также вносят вклад в гиперкоагуляцию. Помимо провоспалительных медиаторов, они способны взаимодействовать с тромбоцитами, усиливая их адгезию и агрегацию, что усугубляет тромботические процессы [23].

При COVID-19 значительное увеличение уровня эндотелиальных МВ коррелирует с дисфункцией эндотелия. Данные МВ содержат прокоагулянтные молекулы, такие как ТФ и фактор фон Виллебранда, которые опосредуют формирование фибриновых сгустков и микротромбоз [24]. Интересно, что тромбоцитарные МВ у пациентов с COVID-19 переносят специфические микроРНК (например, miR-21 и let-7b), способные активировать Toll-подобные рецепторы TLR7/8 в нейтрофилах. Это стимулирует продукцию реактивных форм кислорода (ROS) через никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидазу, индуцируя образование НВЛ, что связывает микровезикулярный транспорт с усилением НВЛ-ассоциированного воспаления и тромбоза [25].

Таким образом, гетерогенность МВ по клеточному происхождению при COVID-19 определяет их вклад в патологическую гиперкоагуляцию, сочетая прокоагулянтные, провоспалительные и протромботические эффекты.

В исследовании X. Gao и соавт. [26] ключевым аспектом стало изучение взаимодействия МВ тромбоцитарного происхождения и НВЛ в патогенезе тромбоза при остром ишемическом инсульте (ОИИ). Авторы использовали комплекс методов, включая ELISA для количественной оценки маркёров НВЛ (нуклеосомы, МПО-ДНК, H3Cit), проточную цитометрию для анализа экспрессии амфотерина (HMGB1) на МВ, а также моделирование ишемии на мышцах с последующей оценкой объёма инфаркта

и неврологического дефицита. Иммунофлуоресцентное окрашивание и вестерн-блоттинг позволили выявить, что HMGB1, переносимый МВ, индуцирует образование НВЛ через активацию аутофагии в нейтрофилах, усиливая прокоагулянтную активность за счёт ТФ и активации тромбоцитов. Эти данные подтвердили роль МВ как триггеров НВЛ-зависимого тромбогенеза.

В нашей работе мы фокусируемся на аналогичном взаимодействии МВ и НВЛ, но в контексте коагулопатий при COVID-19. Известно, что COVID-19 ассоциирован с гиперкоагуляцией, микротромбозами и системным воспалением, где активация тромбоцитов и нейтрофилов играет центральную роль [1]. Мы предполагаем, что при COVID-19 МВ, обогащённые провоспалительными медиаторами (например, HMGB1, цитокинами), могут стимулировать образование НВЛ, усугубляя эндотелиальную дисфункцию и тромбообразование.

Цель исследования — изучить участие МВ и НВЛ в нарушениях свёртывающей системы при COVID-19, оценив их количественные, качественные изменения в зависимости от тяжести заболевания, а также определить взаимосвязь с лабораторными маркерами коагулопатии и системного воспаления.

МЕТОДЫ

Выполнено клиническое рандомизированное исследование. Исследовали кровь пациентов, взятую 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. У пациентов, включённых в данное исследование, диагноз «U07.1. Коронавирусная инфекция COVID-19» был подтверждён анализом содержимого носоглотки и ротоглотки методом полимеразной цепной реакции. Контрольная группа состояла из 20 здоровых добровольцев. Сбор контрольных образцов осуществляли на базе отделения переливания крови ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» г. Казани параллельно с набором материала для исследования.

Клиническая характеристика исследуемых групп пациентов демонстрирует следующие особенности. В 1-й группе ($n=138$) со среднетяжёлым течением COVID-19 средний возраст пациентов составил $63 \pm 10,3$ года, при этом 92,7% ($n=128$) случаев имели сопутствующую гипертоническую болезнь I–III стадии, а сахарный диабет 2-го типа был диагностирован у 71,7% ($n=99$) пациентов. Данная группа получала антикоагулянтную терапию в виде подкожного введения эноксапарина натрия в дозе 0,6 мг 2 раза в сутки.

Вторая группа ($n=75$) с тяжёлым течением COVID-19 характеризовалась более старшим средним возрастом пациентов — $66,3 \pm 12,1$ года ($p=0,075$). Сопутствующая патология встречалась практически у всех пациентов: гипертоническая болезнь I–III стадии отмечена в 98,6% ($n=74$) случаев, сахарный диабет 2-го типа — в 74,6%

($n=56$). Пациенты данной группы получали антикоагулянтную терапию посредством гепариновой помпы с введением гепарина натрия в дозе 20 000 ЕД. Терапевтическая тактика при COVID-19 основывалась на действующих на момент исследования клинических рекомендациях Минздрава России (8-я версия), включая дифференцированный подход в зависимости от степени тяжести заболевания. Все пациенты с тяжёлым течением COVID-19 получали респираторную поддержку посредством искусственной вентиляции лёгких, при этом летальный исход зарегистрирован у 66 пациентов, что составило 88% от общего числа случаев в данной группе. 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 об/мин 15 мин и далее в режиме 10 000 об/мин 5 мин. Надосадочную жидкость отбирали в эппендорфы для дальнейшего исследования.

Всем пациентам были проведены лабораторные исследования биохимических (CRP, ферритин), коагулометрических [активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), международное нормализованное отношение (МНО), протромбиновый индекс по Квику (ПТ по Квику), фибриноген, D-димер] параметров, общий анализ крови. Показатели лабораторных исследований были получены на базе инфекционного госпиталя ГАУЗ «РКБ МЗ РТ» г. Казани с помощью автоматического коагулометра SYSMEX CA-1500 (Sysmex, Япония). Биохимические исследования проведены на автоматическом анализаторе COBAS C311 (Roche, Швейцария), гематологические исследования — на автоматическом анализаторе SYSMEX XN 1000 (Sysmex, Япония).

Подсчёт абсолютного количества МВ осуществляли методом проточной цитометрии на приборе BD FACSCanto II, Becton Dickinson and Company (BD Biosciences, США). В работе применяли модифицированную методику L.V. Iversen (2013). Для определения фенотипа МВ использованы меченные моноклональные антитела фирм BD Biosciences (США), Cloud-Clone (КНР), Affinity Biosciences (КНР). БТП смешивали с фосфатным буфером ($pH=7,4$) в соотношении 1:9. Абсолютное количество МВ в 1 мл определяли по светорассеянию с использованием программы FACSDiva, 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). Графическую обработку результатов проводили в программе FCS Express Research Edition, Novo Software 2024 (США).

Для подтверждения активации НВЛ и наличия на них МВ различного происхождения мы использовали следующие флуоресцентно меченые антитела к поверхностным маркерам клеток крови: CD45, CD3, CD4, CD14, CD15, CD61. С целью обнаружения фрагментов нуклеиновых кислот (ДНК) образцы БТП окрашивали флуоресцентным интеркалирующим красителем для визуализации ядра и других ДНК-содержащих органелл — пропидий йодидом (PI).

Для подтверждения наличия МВ на НВЛ использовали метод флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Этот метод позволяет получать высокодетализированные изображения и изучать взаимодействие МВ с другими компонентами плазмы. Все изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Вецлар, Германия). Для получения изображений использовали программное обеспечение Leica Las AF. Разрешение изображений составляло 1024×1024 или 512×512 пикселей. Для исследования НВЛ методом лазерной сканирующей микроскопии проводили окрашивание DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола), который связывается с участками ДНК, богатыми азотистыми основаниями аденин-тимин. Для его возбуждения использовали мультифотонный лазер Mai Tai (Spectra-Physics, США) с длиной волны 800 нм; эмиссию флуоресценции регистрировали в диапазоне 430–550 нм. Применяли флуоресцентно меченые антитела к поверхностным маркерам клеток крови фирм BD Biosciences (США), Cloud-Clone (КНР), Affinity Biosciences (КНР) — CD15, меченные флуорохромом FITC (флуоросцеиновый изотоп). Для возбуждения FITC использовали аргонный лазер с длиной волны 488 нм; флуоресценцию регистрировали в диапазоне 500–550 нм. Использовали антитела CD62, меченные флуорохромом APC (флуорохромный краситель Allophycocyanin). Для возбуждения APC использовали лазер с длиной волны возбуждения 633 нм, эмиссию регистрировали в диапазоне 640–700 нм. Антитела CD13, меченные флуорохромом PE (флуорохромный краситель Phycoerythrin), возбуждали лазером с длиной волны 495 нм, а эмиссию регистрировали в диапазоне 560–620 нм. Изображения анализировали с помощью программного пакета Las X или Las AF (Leica Microsystems, Германия). В каждом эксперименте выбирали не менее 20 репрезентативных полей наблюдения. Наблюдения проводили с использованием иммерсионного объектива HC X APO L 20×/1.0 W (1.00 NA). Колокализацию анализировали с помощью программного обеспечения Las AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия).

Статистический анализ проводили с использованием программы StatTech 4.7.2 (ООО «Статтех», Россия).

Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка и критерия Колмогорова–Смирнова. Количественные показатели, выборочное распределение которых соответствовало нормальному, описывали с помощью средних арифметических величин (М) и стандартных отклонений (SD). В качестве меры репрезентативности для средних значений указывали границы 95% доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывали с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1–Q3).

Категориальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. 95% ДИ для процентных долей рассчитывали по методу Клоппера–Пирсона. Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого в каждой из групп соответствовало нормальному, при условии равенства дисперсий выполняли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Направление и тесноту корреляционной связи между двумя количественными показателями оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (при распределении показателей, отличном от нормального). Прогностическую модель, характеризующую зависимость количественной переменной от факторов, разрабатывали с помощью метода линейной регрессии. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На 1-м этапе исследования были оценены коагулогические, гематологические и биохимические показатели у пациентов с COVID-19 в зависимости от тяжести течения заболевания. Установлены значимые изменения показателей коагулограммы [фибриноген ($p < 0,001$), ПТ по Квику ($p < 0,001$), АЧТВ ($p < 0,001$), МНО ($p < 0,001$)] относительно контроля. Для среднего течения COVID-19 преимущественно зарегистрированы показатели, характерные для гиперкоагуляции, а в группе с тяжёлым течением, напротив, преобладают показатели, свидетельствующие о гипокоагуляции. Обе группы характеризуются повышением белков острой фазы [С-реактивный белок (СРБ), ферритин]; с нарастанием тяжести течения заболевания показатели увеличиваются ($p < 0,001$). Количество тромбоцитов в обеих группах имеет тенденцию к снижению ($p < 0,001$); при тяжёлом течении отмечена выраженная тромбоцитопения (табл. 1).

Методом проточной цитометрии мы определили общее количество МВ у групп со средним и тяжёлым течением заболевания, а также у контрольной группы. Анализируя показатели количественного состава МВ у пациентов опытных групп, можно отметить значимое снижение количества МВ у группы с тяжёлым течением COVID-19 относительно контрольной группы ($p = 0,006$) и пациентов со среднетяжёлым течением ($p < 0,001$). Полученные нами

Таблица 1. Описательная статистика результатов лабораторных исследований в зависимости от степени тяжести COVID-19**Table 1.** Descriptive statistics for laboratory findings by severity of SARS-CoV-2 infection

Показатели	Референсные значения	Степень тяжести			<i>p</i>
		Контроль (К) (n=20)	1-я группа (1) (среднетяжёлое течение COVID-19, n=138)	2-я группа (2) (тяжёлое течение COVID-19, n=75)	
Лейкоциты ($\times 10^9/L$), Ме (IQR)	4–10	6,35 (5,97; 6,83)	8,59 (5,50; 11,80)	11,80 (9,75; 16,20)	$p_{1-K}=0,014$ $p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}=0,001$
Тромбоциты ($\times 10^9/L$), Ме (IQR)	100–300	250,00 (228,75; 266,25)	207,00 (178,00; 298,00)	139,50 (104,25; 177,75)	$p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}<0,001$
Фибриноген, г/л, Ме (IQR)	2–4	2,95 (2,80; 3,10)	4,80 (4,00; 5,60)	3,90 (3,40; 4,90)	$p_{1-K}<0,001$ $p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}=0,004$
ПТ по КВИКУ (%), Ме (IQR)	80–100	96,00 (94,00; 97,00)	102,00 (88,00; 113,00)	73,70 (66,50; 80,75)	$p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}<0,001$
Ферритин, нг/мл, Ме (IQR)	20–200	66,00 (57,75; 75,75)	225,20 (118,25; 366,52)	315,07 (172,00; 427,82)	$p_{1-K}<0,001$ $p_{2-K}<0,001$
ПВ, с, Ме (IQR)	9,2–12,2	12,35 (11,95; 12,72)	12,00 (10,20; 13,30)	14,60 (13,50; 16,43)	$p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}<0,001$
АЧТВ, с, Ме (IQR)	25–36	28,00 (26,75; 30,00)	23,50 (22,00; 25,40)	57,15 (40,00; 86,12)	$p_{1-K}<0,001$ $p_{2-K}=0,018$ $p_{2-1}<0,001$
МНО, у. е, Ме (IQR)	0,9–1,2	1,00 (0,99; 1,02)	0,97 (0,87; 1,11)	2,60 (2,32; 3,58)	$p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}<0,001$
D-димер, мг/л, Ме (IQR)	<0,5	0,24 (0,20; 0,28)	0,78 (0,30; 1,28)	2,27 (1,65; 5,23)	$p_{1-K}<0,001$ $p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}<0,001$
СРБ, мг/л, Ме (IQR)	<5	2,25 (1,65; 2,82)	26,20 (11,33; 62,63)	87,40 (56,50; 99,10)	$p_{1-K}<0,001$ $p_{2-K}<0,001$ $p_{2-1}<0,001$

Примечание. ПТ по Квику — протромбиновое время по Квику; ПВ — протромбиновое время; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; МНО — международное нормализованное отношение; СРБ — С-реактивный белок.

данные представлены в табл. 2. На рис. 1 продемонстрированы точечные диаграммы, полученные на проточном цитометре, характерные для каждой из исследуемых групп.

На точечных диаграммах пациентов с COVID-19 мы анализировали гейт с образованиями неизвестной природы, не характерный для образцов здоровых доноров (см. рис. 1, *a, b*). По характеристикам светорассеяния FSC (Forward Scatter) эти образования не соответствуют МВ.

В выделенном нами гейте было зарегистрировано статистически значимое преобладание частиц, меченных моноклональными антителами CD15 ($p < 0,001$), CD14 ($p < 0,001$), CD4 ($p = 0,003$), CD61 ($p < 0,001$), CD62 ($p < 0,001$), CD3 ($p = 0,027$), у пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19 относительно группы с тяжёлым течением. Данные о количестве и фенотипе циркулирующих в периферической крови МВ у пациентов с COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания представлены в табл. 3.

Таким образом, по данным, полученным методом проточной цитофлуориметрии, установлено, что у пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19 преобладают МВ лейкоцитарного (преимущественно лимфоцитарного и нейтрофильного) и тромбоцитарного происхождения (рис. 2).

У пациентов с тяжёлым течением COVID-19 отмечается статистически значимое снижение количества МВ нейтрофильного ($p < 0,001$), моноцитарного ($p < 0,001$), лимфоцитарного ($p = 0,027$), тромбоцитарного ($p < 0,001$) происхождения (рис. 3).

При окрашивании образцов БТП пациентов с COVID-19 использовали двойное мечение: флуоресцентный интеркалирующий краситель для визуализации ДНК-содержащих фрагментов — пропидий йодид (PI), а также моноклональные антитела CD15, CD61, CD3. Полученные результаты представлены в табл. 4.

На следующем этапе наших исследований выполнено определение флуоресценции по PI для выявления нуклеиновых кислот в БТП у пациентов с COVID-19 обеих групп. Проведённый анализ методом двойной флуоресцентной метки (PI и CD-маркёры) в образцах БТП пациентов достоверно продемонстрировал наличие ДНК-содержащих частиц, ассоциированных с мембранными антигенами нейтрофильного, лимфоцитарного и тромбоцитарного происхождения. Относительно степени тяжести пациентов отмечено статистически значимое снижение содержания исследуемых фрагментов при тяжёлом течении

Таблица 2. Абсолютное количество микровезикул в периферической крови пациентов с COVID-19 различной степени тяжести и контрольной группы
Table 2. Absolute numbers of peripheral microvesicles for patients with SARS-CoV-2 infection of varying severity and for controls

Группа	Абсолютное количество МВ, ×10 ⁶ /мл			p
	Me	Q ₁ –Q ₃	n	
1-я группа (среднетяжёлое течение COVID-19)	13,15	8,06–18,12	138	p _{1–2} <0,001 p _{K–2} =0,006
2-я группа (тяжёлое течение COVID-19)	3,00	1,79–4,78	75	
Контроль (n=20)	11,17	3,62–17,19	20	

Таблица 3. Содержание микровезикул в периферической крови пациентов с COVID-19, M±SD
Table 3. Peripheral microvesicles in patients with SARS-CoV-2 infection, M ± SD

Параметр, МВ %	1-я группа (среднетяжёлое течение COVID-19, n=138)	2-я группа (тяжёлое течение COVID-19, n=75)	p
CD15 ⁺	53,34±6,92	10,32±4,29	<0,001*
CD14 ⁺	27,12±3,09	2,17±1,53	<0,001*
CD45 ⁺	70,67±9,82	37,92±10,00	<0,001*
CD4 ⁺	68,21±9,56	46,52±3,39	0,003*
CD61 ⁺	59,74±11,22	20,90±6,01	<0,001*
CD62 ⁺	55,98±10,11	27,26±5,24	<0,001*
CD3 ⁺	64,74±11,24	63,33±17,08	0,869

Примечание. МВ — микровезикулы.

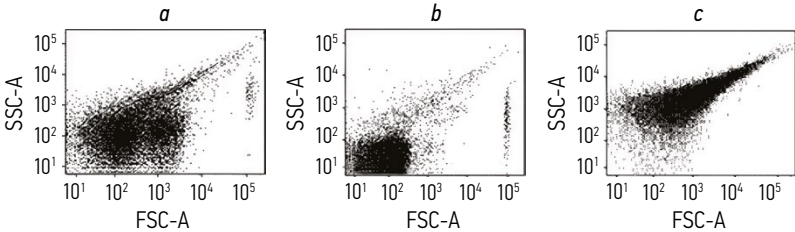


Рис. 1. Точечные диаграммы, типичные для каждой из исследуемых групп: *a* — среднее течение COVID-19; *b* — тяжёлое течение COVID-19; *c* — контроль.
Fig. 1. Scatter plots representative of each study group: *a*, moderate SARS-CoV-2 infection; *b*, severe SARS-CoV-2 infection; and *c*, controls.

заболевания COVID-19 (CD3⁺PI⁺ $p=0,018$, CD61⁺PI⁺ $p<0,001$, CD15⁺PI⁺ $p<0,001$).

Корреляционный анализ выявил различия во взаимосвязях между уровнем циркулирующих МВ и ключевыми лабораторными маркерами у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19.

У пациентов со среднетяжёлым течением заболевания наблюдалась высокая прямая корреляция между количеством МВ и уровнем D-димера ($\rho=0,882$, $p<0,001$), что подтверждает роль МВ в активации гиперкоагуляции. Умеренные положительные корреляции выявлены с маркерами воспаления: СРБ ($\rho=0,589$, $p<0,001$), ферритин ($\rho=0,459$, $p<0,001$). Эти данные свидетельствуют о взаимосвязи микровезикулярной активности с системным воспалением и тромботическими осложнениями. В то же время у пациентов с тяжёлым течением COVID-19 выявлена высокая отрицательная корреляция между абсолютным количеством МВ и СРБ ($\rho=-0,708$, $p<0,001$),

а также значимая обратная связь с D-димером ($\rho=-0,769$, $p<0,001$). Зафиксирована заметная отрицательная корреляция МВ с ферритином ($\rho=-0,558$, $p=0,001$). Снижение абсолютного количества МВ при тяжёлых формах COVID-19 может отражать их интенсивное расходование в патологических процессах, связанных с активацией системы гемостаза и воспалительным каскадом, что согласуется с лабораторными проявлениями коагулопатии потребления, характерной для данного состояния. Полученные результаты свидетельствуют о значительном вкладе МВ в патогенез тромботических и воспалительных реакций при прогрессировании заболевания. В табл. 5 представлены результаты корреляционного анализа взаимосвязи количественного состава МВ с основными лабораторными показателями воспаления и тромбообразования.

Методом конфокальной лазерной микроскопии у пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19 мы обнаружили фрагменты нитеобразных структур ДНК,

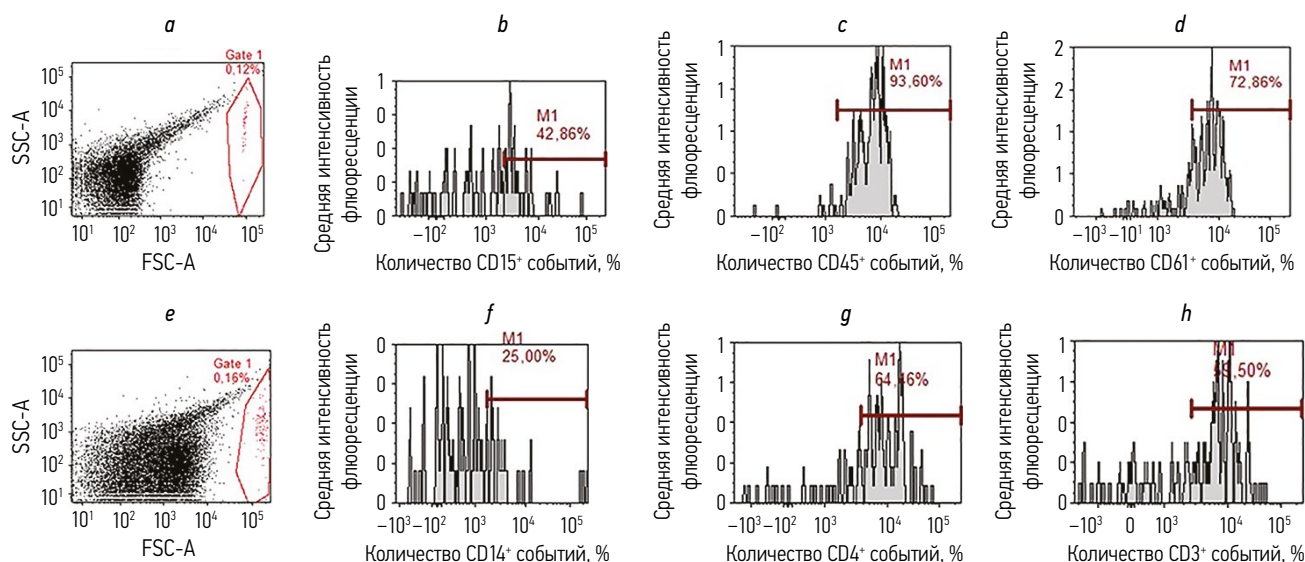


Рис. 2. Точечные диаграммы (а, е) и цитофлюорограммы микровезикул, экспрессирующих CD15 (b), CD45 (c), CD61 (d), CD14 (f), CD4 (g), CD3 (h), типичные для пациентов с COVID-19 среднетяжёлой степени тяжести. Анализ выполнен в пределах гейта, характерного для микровезикул при COVID-19.

Fig. 2. Scatter plots (a, e) and cytofluorograms of microvesicles expressing CD15 (b), CD45 (c), CD61 (d), CD14 (f), CD4 (g), and CD3 (h) attributed to patients with moderate SARS-CoV-2 infection. The analysis was performed within the gate characteristic of microvesicles in SARS-CoV-2 infection.

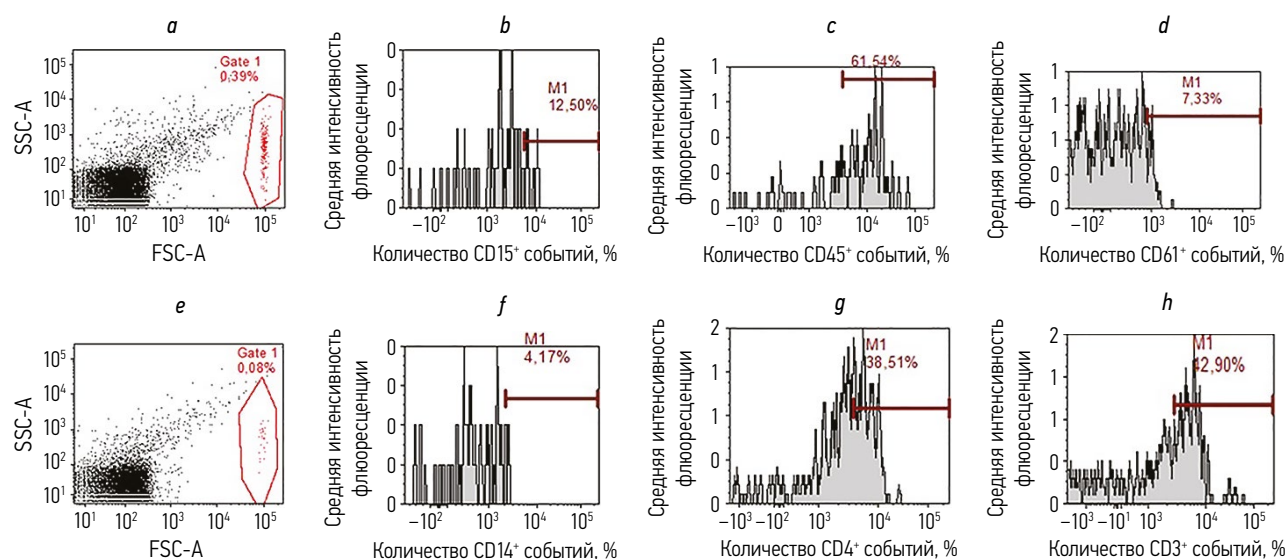


Рис. 3. Точечные диаграммы (а, е) и цитофлюорограммы микровезикул, экспрессирующих CD15 (b), CD45 (c), CD61 (d), CD14 (f), CD4 (g), CD3 (h), типичные для пациентов с COVID-19 тяжёлого течения. Анализ выполнен в пределах гейта, характерного для микровезикул при COVID-19.

Fig. 3. Scatter plots (a, e) and cytofluorograms of microvesicles expressing CD15 (b), CD45 (c), CD61 (d), CD14 (f), CD4 (g), and CD3 (h) attributed to patients with severe SARS-CoV-2 infection. The analysis was performed within the gate characteristic of microvesicles in SARS-CoV-2 infection.

на которых экспрессируются МВ нейтрофильного происхождения (CD15⁺FITC), тромбоцитарного происхождения (CD62⁺APC) и ТФ (рис. 4, 5). Применение лазерного сканирования с флуоресцентной меткой по CD62 позволило идентифицировать образование крупных агрегатов размером около 15 мкм, что морфологически соответствует конгломератам, состоящим из нуклеиновых кислот и МВ (рис. 6, 7). Данное наблюдение свидетельствует о наличии

процессов агрегации и формирования сложных надмолекулярных структур в исследуемых образцах.

Анализируя образцы БТП пациентов с тяжёлым течением COVID-19, подобных нитеобразных структур обнаружено не было. В то же время мы зафиксировали незначительное количество отдельно флуоресцирующих микрочастиц по CD13, CD15 и агрегаты микрочастиц, флуоресцирующих по CD62 размером до 28 мкм.

Таблица 4. Содержание в образцах бестромбоцитарной плазмы крови пациентов с COVID-19 различной степени тяжести микровезикул с двойной позитивной флуоресценцией по ДНК (PI) и моноклональным антителам CD3, CD61, CD15

Table 4. Microvesicles double positive for DNA (PI) staining and anti-CD3, anti-CD61, and anti-CD15 monoclonal antibodies in platelet-free blood plasma of patients with SARS-CoV-2 infection of varying severity

Параметр	Степень тяжести		p
	1-я группа (среднетяжёлое течение COVID-19, n=138)	2-я группа (тяжёлое течение COVID-19, n=75)	
CD3*PI ⁺ , M (SD)	41,67 (5,14)	20,03 (8,21)	0,018
CD61*PI ⁺ , M (SD)	70,57 (8,49)	19,43 (4,07)	< 0,001
CD15*PI ⁺ , MB % M (SD)	20,33 (1,53)	9,23 (1,07)	< 0,001

Примечание. PI – пропидиум йодид.

Таблица 5. Сводная таблица результатов корреляционного анализа взаимосвязи количественного состава микровезикул с ключевыми лабораторными маркерами у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19

Table 5. Correlation analysis of the quantitative composition of microvesicles and key laboratory markers in patients with moderate to severe SARS-CoV-2 infection

Маркёр	Группа пациентов	Коэффициент корреляции (ρ)	Теснота связи	p
D-димер	Среднетяжёлое течение	0,882	Высокая	<0,001
	Тяжёлое течение	-0,214	Слабая	0,042
СРБ	Среднетяжёлое течение	0,589	Умеренная	<0,001
	Тяжёлое течение	-0,321	Умеренная	0,006
Ферритин	Среднетяжёлое течение	0,459	Умеренная	<0,001
	Тяжёлое течение	-0,185	Очень слабая	0,089

Примечание. СРБ — С-реактивный белок.

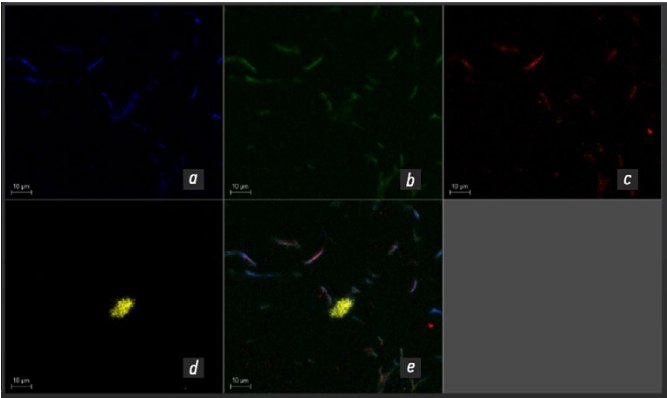


Рис. 4. Флуоресценция фрагментов ДНК и микровезикул в бестромбоцитарной плазме крови пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19: *a* — фрагменты ДНК, окрашенные DAPI; *b* — моноклональные антитела к CD15; меченные флуорохромом FITC; *c* — CD13, меченные флуорохромом PE; *d* — скопление микрочастиц, позитивных по CD62, меченные флуорохромом APC; *e* — наложение четырёх каналов красителей.

Fig. 4. Fluorescence of DNA fragments and microvesicles in platelet-free blood plasma of patients with moderate SARS-CoV-2 infection: *a*, DAPI-stained DNA fragments; *b*, FITC-labeled anti-CD15 monoclonal antibodies; *c*, PE-labeled CD13; *d*, APC-labeled CD62-positive microparticle aggregates; and *e*, overlapping of four dye channels.

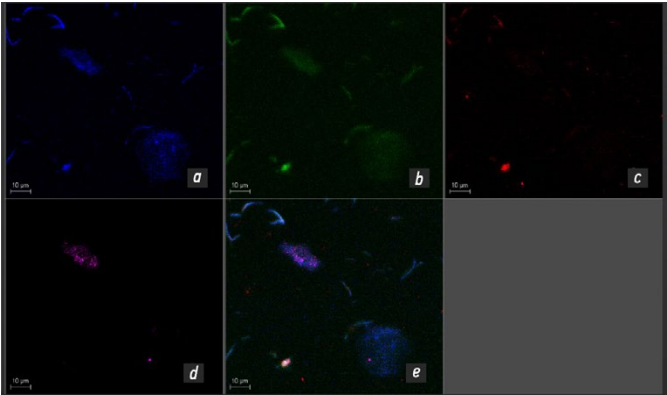


Рис. 5. Флуоресценция фрагментов ДНК и агрегатов микровезикул в бестромбоцитарной плазме крови пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19: *a* — фрагменты ДНК, окрашенные DAPI; *b* — моноклональные антитела к CD15; меченные флуорохромом FITC; *c* — CD13, меченные флуорохромом PE; *d* — скопление микрочастиц, позитивных по CD62, меченные флуорохромом APC; *e* — наложение четырёх каналов красителей.

Fig. 5. Fluorescence of DNA fragments and microvesicle aggregates in platelet-free blood plasma of patients with moderate SARS-CoV-2 infection: *a*, DAPI-stained DNA fragments; *b*, FITC-labeled anti-CD15 monoclonal antibodies; *c*, PE-labeled CD13; *d*, APC-labeled CD62-positive microparticle aggregates; and *e*, overlapping of four dye channels.

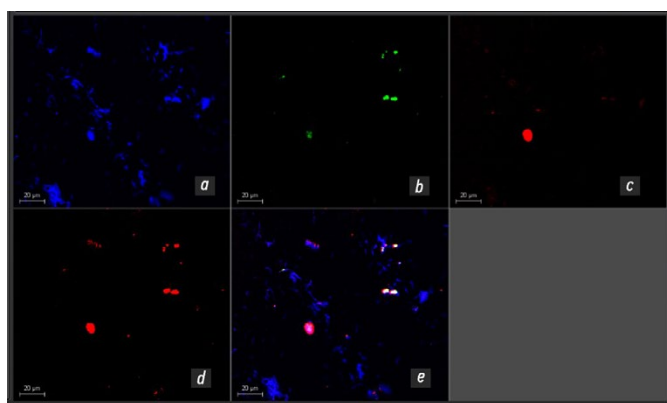


Рис. 6. Флуоресценция фрагментов ДНК и микровезикул в бестромбоцитарной плазме крови пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19: *a* — фрагменты ДНК, окрашенные DAPI; *b* — микровезикулы, позитивные по CD61, меченные флуорохромом FITC; *c* — TF, меченные флуорохромом PE; *d* — микровезикулы, позитивные по CD15, меченные флуорохромом APC; *e* — наложение четырёх каналов красителей.

Fig. 6. Fluorescence of DNA fragments and microvesicles in platelet-free blood plasma of patients with moderate SARS-CoV-2 infection: *a*, DAPI-stained DNA fragments; *b*, FITC-labeled CD61-positive microvesicles; *c*, PE-labeled TFs; *d*, APC-labeled CD15-positive microparticle aggregates; and *e*, overlapping of four dye channels.

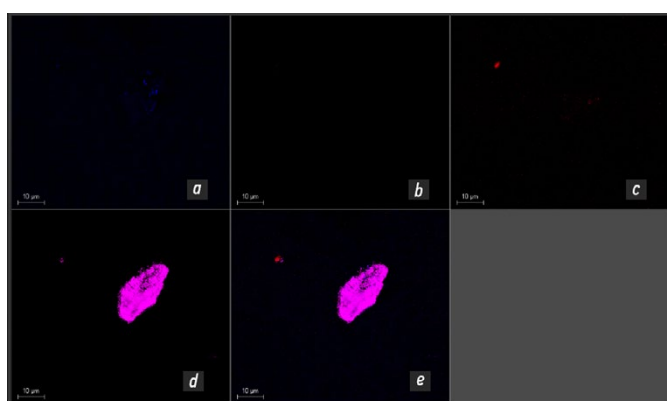


Рис. 7. Флуоресценция фрагментов ДНК и микровезикул в бестромбоцитарной плазме крови пациентов с тяжёлым течением COVID-19: *a* — фрагменты ДНК, окрашенные DAPI; *b* — моноклональные антитела к CD15, меченные флуорохромом FITC; *c* — CD13, меченные флуорохромом PE; *d* — скопление микрочастиц, позитивных по CD62, меченные флуорохромом APC; *e* — наложение четырёх каналов красителей.

Fig. 7. Fluorescence of DNA fragments and microvesicles in platelet-free blood plasma of patients with severe SARS-CoV-2 infection: *a*, DAPI-stained DNA fragments; *b*, FITC-labeled anti-CD15 monoclonal antibodies; *c*, PE-labeled CD13; *d*, APC-labeled CD62-positive microparticle aggregates; and *e*, overlapping of four dye channels.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в ходе исследования данные позволяют констатировать наличие существенных изменений в системе гемостаза у пациентов с COVID-19, опосредованных МВ и НВЛ. Результаты исследования демонстрируют достоверную корреляцию между количественными и качественными характеристиками МВ и тяжестью клинического течения COVID-19.

Проведённый анализ лабораторных данных выявил существенные различия в показателях гемостаза в зависимости от тяжести течения COVID-19. У пациентов со среднетяжёлой формой заболевания отмечены признаки гиперкоагуляции, проявляющиеся повышением уровня фибриногена и D-димера, что соответствует данным, представленным в работе N. Tang и соавт. [1]. В группе пациентов с тяжёлым течением заболевания зарегистрирована тенденция к гипокоагуляции, сопровождающаяся тромбоцитопенией и увеличением показателей АЧТВ и МНО, что может свидетельствовать о развитии коагулопатии потребления. Особого внимания заслуживает выявленное статистически значимое снижение количества циркулирующих МВ в данной группе пациентов. МВ нейтрофильного (CD15) происхождения, вероятно, являются предиктором инициации нетоза, который впоследствии из-за гиперактивации способен спровоцировать иммунотромбоз. Анализ полученных результатов позволяет предположить, что МВ и НВЛ совместно участвуют в активации

каскада коагуляции, эндотелиальной дисфункции и воспаления, что может объяснять повышенное абсолютное количество МВ, и, как следствие, высокий риск тромбообразования при среднетяжёлой степени тяжести COVID-19.

Нетоз представляет собой процесс, при котором активированные нейтрофилы во внеклеточном пространстве формируют «сетеподобные» структуры. Анализ полученных нами данных выявил взаимосвязь между количественным и качественным составом циркулирующих МВ. Преобладание МВ нейтрофильного и тромбоцитарного происхождения в комплексе с нитевидными структурами, позитивными по DAPI (фрагменты ДНК), даёт основание полагать, что это НВЛ, связанные с различными МВ. Присутствие этих агрегатов значительно влияет на развитие коагулопатии у пациентов с COVID-19, что подчёркивает их потенциальную роль в патогенезе механизмов нарушений свёртывающей системы. Полученные результаты согласуются с данными других исследований, подтверждающих роль НВЛ в развитии тромботических осложнений при различных патологических состояниях [27].

Выраженная лимфопения у пациентов с COVID-19 ассоциируется с риском развития тяжёлых форм и неблагоприятного исхода. Одной из причин лимфопении при COVID-19 является апоптоз лимфоцитов [28]. Рост количества лимфоцитарных МВ (CD3⁺CD4⁺) может свидетельствовать об активации SAR-CoV-2-индуцированного апоптоза лимфоцитов. Особый научный интерес представляет потенциальная роль микроРНК, содержащихся в МВ

(в частности, miR-21), в активации TLR7/8-зависимых сигнальных путей, что может способствовать усилению образования НВЛ и продукции провоспалительных цитокинов.

Абсолютное количество МВ тромбоцитарного происхождения у пациентов с тяжёлым течением COVID-19 значительно ниже, чем в группе среднетяжёлого течения ($p < 0,001$). Это явление согласуется с тромбоцитопенией, характерной для пациентов с тяжёлым течением. МВ усиливают прокоагулянтную активность и способствуют агрегации тромбоцитов, что подчёркивает их роль в развитии гиперкоагуляции и тромбообразования [29]. Значительное снижение МВ тромбоцитарного происхождения можно рассматривать как плохой прогностический признак из-за участия в тромбообразовании.

Обнаруженный феномен снижения количества МВ при тяжёлом течении COVID-19 может быть объяснён повышенным потреблением МВ в процессе формирования микротромбов.

Выявленные в исследовании корреляционные взаимосвязи между количеством МВ и уровнем маркёров системного воспаления подтверждают существование тесной патогенетической взаимосвязи между активацией системы гемостаза и воспалительным ответом. МВ лейкоцитарного происхождения участвуют в регуляции воспалительных процессов и иммунного ответа, что может как способствовать защите организма, так и усугублять патологические процессы. Полученные результаты корреляционного анализа отражают динамику взаимодействия МВ с ключевыми патогенетическими процессами при COVID-19 в зависимости от тяжести течения заболевания.

Выявлена высокая прямая корреляция между уровнем МВ и D-димером у пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19 ($p=0,882$). Это подтверждает, что МВ, особенно нейтрофильного (CD15⁺) и тромбоцитарного (CD61⁺) происхождения, выступают активными маркёрами гиперкоагуляции. МВ несут прокоагулянтные молекулы, такие как ТФ и ФС, обеспечивающие платформу для сборки факторов свёртывания, усиливая генерацию тромбина и фибрина. Это согласуется с данными о роли МВ в активации каскада коагуляции при COVID-19 [19, 23]. Одновременно умеренные положительные корреляции с СРБ ($p=0,589$) и ферритином ($p=0,459$) подчёркивают их участие в системном воспалении. МВ лейкоцитарного происхождения транспортируют провоспалительные цитокины и микроРНК (например, miR-21), которые могут усиливать образование НВЛ через активацию TLR7/8-зависимых путей [26], что способствует «цитокиновому шторму» и эндотелиальной дисфункции [30].

Обратные корреляции МВ с D-димером ($p=-0,769$), СРБ ($p=-0,708$) и ферритином ($p=-0,558$) в образцах плазмы пациентов с тяжёлым течением COVID-19 отражают патофизиологическую взаимосвязь между системным воспалением и нарушениями гемостаза и указывают на истощение циркулирующих МВ, вероятно, вследствие их массового потребления в процессах микротромбообразования

и воспаления. Это подтверждается лабораторными признаками коагулопатии потребления: тромбоцитопенией, гипокоагуляцией (удлинение АЧТВ, повышение МНО) и дисбалансом в системе «тромбоз — фибринолиз». Снижение МВ тромбоцитарного происхождения (CD61⁺) коррелирует с уменьшением количества тромбоцитов, что может быть связано с их активацией и включением в формирование тромбов [29]. Отсутствие значимой связи с ферритином ($p=-0,185$, $p=0,089$), несмотря на тенденцию к обратной зависимости, может объясняться преобладанием других механизмов гиперферритинемии, таких как массивный гемолиз или нарушение метаболизма железа на фоне полиорганной дисфункции.

Результаты конфокальной микроскопии выявили ключевые особенности взаимодействия МВ и НВЛ у пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19. Были обнаружены нитевидные структуры ДНК, ассоциированные с МВ нейтрофильного (CD15⁺) и тромбоцитарного (CD62⁺) происхождения, а также ТФ, что подтверждает их роль в активации фибриногенеза и формировании иммунотромбов. Колокализация CD15⁺ и CD62⁺ маркёров на НВЛ свидетельствует о межклеточной кооперации нейтрофилов и тромбоцитов в патогенезе гиперкоагуляции, характерной для данной группы пациентов. Эти данные согласуются с концепцией «тромбовоспаления», где МВ выступают медиаторами прокоагулянтной и провоспалительной активности.

У пациентов с тяжёлым течением COVID-19 нитевидные структуры отсутствовали, однако были зафиксированы крупные агрегаты микрочастиц, положительных по CD62⁺ (до 28 мкм). Это может отражать альтернативный механизм тромбообразования, связанный с активацией эндотелия и массовым высвобождением прокоагулянтных МВ, которые, вероятно, участвуют в формировании микротромбов на фоне коагулопатии потребления. Отсутствие структур, характерных для НВЛ, может объясняться истощением нейтрофильных ресурсов или усиленным клиренсом комплексов МВ–ДНК в системном кровотоке.

Важным результатом исследования стало обнаружение в плазме пациентов с COVID-19 агрегатов микрочастиц, экспрессирующих маркёры различных клеточных популяций. При проведении иммунофенотипирования методом проточной цитометрии были выявлены микрочастицы, несущие на своей поверхности антигены лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺), тромбоцитов (CD61⁺) и нейтрофилов (CD15⁺). Особый интерес представляет выявление частиц, одновременно экспрессирующих маркёры разных клеточных популяций (например, CD15⁺PI⁺, CD61⁺PI⁺, CD62⁺CD15⁺), что свидетельствует о формировании агрегатов. Эти данные согласуются с результатами конфокальной микроскопии, подтвердившей наличие в плазме нитевидных структур ДНК (окрашивание DAPI⁺), ассоциированных с микрочастицами различного происхождения. Полученные результаты позволяют предположить, что подобные агрегаты могут играть ключевую роль в патогенезе

тромботических осложнений при COVID-19, выступая в качестве каталитической поверхности для активации свёртывающей системы крови и способствуя формированию устойчивых к фибринолизу тромбов. Особенно показательно выявление прямой корреляции между уровнем таких агрегатов и показателями гиперкоагуляции (D-димер, фибриноген), что подтверждает их значимость в развитии коагулопатии. Обнаруженные нами изменения особенно выражены у пациентов со среднетяжёлым течением заболевания, тогда как при тяжёлых формах отмечается снижение количества микрочастиц, вероятно, вследствие их участия в процессах тромбообразования.

Полученные данные свидетельствуют о фазовом характере патогенеза COVID-19: среднетяжёлое течение характеризуется активным тромбообразованием, опосредованным НВЛ, тогда как при прогрессировании заболевания наблюдается сдвиг патогенетических механизмов в сторону преобладания процессов агрегации МВ. Описанная динамика отражает патофизиологические процессы при развитии заболевания. Выявленная специфичность МВ CD62⁺ открывает перспективы для разработки таргетных подходов, направленных на подавление их прокоагулянтной активности, что может снизить риск жизнеугрожающих тромботических осложнений.

Проведённое исследование углубляет понимание роли МВ и НВЛ в патогенезе тромботических осложнений у пациентов с COVID-19, при котором данные процессы приобретают особую клиническую значимость.

Результаты исследования демонстрируют двойственную роль МВ в патогенезе заболеваний: с одной стороны, они участвуют в поддержании гомеостаза, с другой — могут способствовать развитию патологических процессов, таких как тромбозы, воспаление и иммунная дисрегуляция. Сравнение полученных данных с результатами других исследований [11, 24, 30] позволяет предположить, что МВ и НВЛ могут быть ключевыми факторами, связывающими воспаление, гиперкоагуляцию и эндотелиальную дисфункцию при COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов со среднетяжёлым течением COVID-19 выявлена гиперкоагуляция, повышенный уровень МВ нейтрофильного (CD15⁺), тромбоцитарного (CD61⁺) и лимфоцитарного (CD3⁺) происхождения в агрегатах, что коррелирует с маркерами тромбоза и системного воспаления.

При тяжёлых формах COVID-19 отмечается выраженное снижение уровня циркулирующих МВ на фоне тромбоцитопении и гипокоагуляции, что соответствует коагулопатии потребления. Выявленные обратные корреляции между концентрацией МВ и маркерами гиперкоагуляции и системного воспаления свидетельствуют о ключевой роли МВ в патогенезе тромбовоспалительных нарушений.

Обнаружение нитевидных структур, позитивных по DAPI и ассоциированных с МВ (TF⁺), у пациентов со

среднетяжёлым течением, а также агрегатов МВ у пациентов с тяжёлым течением подтверждает их роль в патогенезе имунотромбоза.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Е.С.Г. — определение концепции, анализ данных, проведение исследования, валидация, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; Д.В.С. — проведение исследования, работа с данными; И.Г.М. — разработка методологии, пересмотр и редактирование рукописи, руководство исследованием; Д.И.А. — обеспечение исследования, руководство исследованием. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Получение флуоресцентных изображений методами лазерной конфокальной микроскопии выполнено при финансировании в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

Этическая экспертиза. Исследование одобрено локальным этическим комитетом КазГМУ (выписка из протокола заседания № 2 от 16 февраля 2021 г.). У всех пациентов получено письменное согласие на участие в исследовании.

Согласие на публикацию. Все представленные сведения обезличены, фотографии не публикуются.

Источники финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Все данные, полученные в настоящем исследовании, доступны в статье.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: E.S.G.: conceptualization, data curation, investigation, validation, writing—original draft, writing—review & editing; D.V.S.: investigation, data curation; I.G.M.: methodology, writing—review & editing, supervision; D.I.A.: resources, supervision. All authors approved the version of the manuscript to be published and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: Fluorescent images were obtained by laser confocal microscopy with funding support from the state assignment for the Kazan Research Center of the Russian Academy of Sciences. The work was performed using the equipment available at the Center for Physical and Chemical Research of the Structure, Properties and Composition of Substances and Materials (the Kazan Research Center of the Russian Academy of Sciences).

Ethics approval: The study was approved by the Local Ethics Committee of the Kazan State Medical University (extract from Protocol No. 2 of February 16, 2021). All patients provided written informed consent to participate in the study.

Informed consent: All data presented are anonymized, and no photographs are published.

Funding sources: The authors declare that this work was not supported by any external sources.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously published material (text, images, or data) was used in this work.

Data availability statement: All data generated during this study are available in this article.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited. The peer review process involved two external reviewers, a member of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Tang N, Li D, Wang X, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844–847. doi: 10.1111/jth.14768 EDN: NCKJIC
2. Allegra A, Innao V, Allegra AG, et al. Coagulopathy and thromboembolic events in patients with SARS-CoV-2 infection: Pathogenesis and management strategies. *Ann Hematol*. 2020;99:1953–1965. doi: 10.1007/s00277-020-04182-4 EDN: DZOFFV
3. Chowdhury P. COVID-19 coagulopathy — what should we treat? *Exp Physiol*. 2022;107(7):749–758. doi: 10.1113/EP089404 EDN: NMZUHM
4. Yavelov IS, Drapkina OM. COVID-19: Hemostasis system status and features of antithrombotic therapy. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(3):2571. doi: 10.15829/1728-8800-2020-2571 EDN: DHVKSZ
5. Matvienko OYu, Korsakova NE, Lerner AA, et al. Plasma hemostasis status in patients with SARS-CoV-2 coronavirus infection. *Thrombosis, Hemostasis and Rheology*. 2020;4:52–56. doi: 10.25555/THR.2020.4.0946 EDN: CKIYVW
6. Sirotkina OV, Ermakov AI, Gaikovaya LV, et al. Blood cell microparticles in COVID-19 patients as a marker of hemostasis system activation. *Thrombosis, Hemostasis and Rheology*. 2020;4:35–40. doi: 10.25555/THR.2020.4.0943 EDN: FJTAY
7. Urban CF, Ermer D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*. 2009;5(10):e1000639. doi: 10.1371/journal.ppat.1000639
8. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2013;5(178):178ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3005580
9. Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, et al. NETopathies? Unraveling the dark side of old diseases through neutrophils. *Front Immunol*. 2016;7:678. doi: 10.3389/fimmu.2016.00678 EDN: YZXGND
10. Kelly EJ, Oliver MA, Carney BC, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by coronavirus 2019 disease-positive patient plasma and persist longitudinally: A possible link to endothelial dysfunction as measured by syndecan-1. *Surg Infect*. 2023;24(10):887–896. doi: 10.1089/sur.2023.156 EDN: XLYUTF
11. Datla US, Vundurthy B, Hook JS, et al. Quantifying neutrophil extracellular trap release in a combined infection-inflammation NET-array device. *Lab Chip*. 2024;24(3):615–628. doi: 10.1039/d3lc00648d EDN: IJJQDP
12. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: Tangled up in NETs. *Blood*. 2014;123(18):2768–2776. doi: 10.1182/blood-2013-10-463646
13. Budnik I, Brill A. Immune factors in deep vein thrombosis initiation. *Trends in Immunology*. 2018;39(8):610–623. doi: 10.1016/j.it.2018.04.010 EDN: ZXCACX
14. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemostasis*. 2012;10(1):136–144. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04544.x
15. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemostasis*. 2014;12(6):860–870. doi: 10.1111/jth.12571
16. Mangold A, Alias S, Scherz T, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res*. 2015;116(7):1182–1192. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304944
17. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2018;49(3):754–757. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019896
18. Farkas AZ, Farkas VJ, Gubucz I, et al. Neutrophil extracellular traps in thrombi retrieved during interventional treatment of ischemic arterial diseases. *Thromb Res*. 2019;175:46–52. doi: 10.1016/j.thromres.2019.01.006
19. Jing H, Zuo N, Novakovic VA, et al. The central role of extracellular vesicles in the mechanisms of thrombosis in COVID-19 patients with cancer and therapeutic strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:792335. doi: 10.3389/fcell.2021.792335 EDN: GWLUZA
20. Wang C, Yu C, Novakovic VA, et al. Circulating microparticles in the pathogenesis and early anticoagulation of thrombosis in COVID-19 with kidney injury. *Front Cell Dev Biol*. 2022;9:784505. doi: 10.3389/fcell.2021.784505 EDN: AEYCNI
21. Zubairov DM, Andrushko IA, Storozhev AL. The role of cell membrane fragments in blood coagulation processes. *Kardiologiya*. 1974;14(11):75–80. (In Russ.)
22. Matvienko OYu, Smirnova OA, Golovina OG. The role of blood plasma microparticles in the development of procoagulant changes in patients after COVID-19. *Thrombosis, Hemostasis and Rheology*. 2024;2:48–53. doi: 10.25555/THR.2024.2.1098 EDN: FCELLB
23. Ebeyer-Masotta M, Eichhorn T, Weiss R, et al. Activated platelets and platelet-derived extracellular vesicles mediate COVID-19-associated immunothrombosis. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:914891. doi: 10.3389/fcell.2022.914891 EDN: CULBCA
24. Krishnamachary B, Cook C, Kumar A, et al. Extracellular vesicle-mediated endothelial apoptosis and EV-associated proteins correlate with COVID-19 disease severity. *J Extracell Vesicl*. 2021;10(9):e12117. doi: 10.1002/jev2.12117 EDN: RNERFQ
25. Liao T-L, Liu H-J, Tang K-T, et al. SARS-CoV-2 primed platelets-derived microRNAs enhance NETs formation by extracellular vesicle transmission and TLR7/8 activation. *Cell Commun Signal*. 2023;21(1):304. doi: 10.1186/s12964-023-01345-4
26. Gao X, Zhao X, Li J, et al. Neutrophil extracellular traps mediated by platelet microvesicles promote thrombosis and brain injury in acute ischemic stroke. *Cell Commun Signal*. 2024;22:50. doi: 10.1186/s12964-023-01379-8 EDN: CYVKPF
27. Ducroux C, Di Meglio L, Loyau S, et al. Thrombus neutrophil extracellular traps content impair tPA-induced thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2018;49(3):754–757. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019896
28. Khaertynov KhS, Boichuk SV, Anokhin VA, et al. Lymphocyte apoptosis in patients with COVID-19 coronavirus infection. *Kazan Medical Journal*. 2024;105(6):926–935. doi: 10.17816/KMJ633257 EDN: GCAXMM
29. Nabiullina RM, Mukhitov AR, Litvinov RI, Zubairova LD. Binding of cellular microvesicles with fibrin during blood clotting. *I.M. Sechenov Russian Journal of Physiology*. 2016;102(5):597–605. EDN: VVWNFR
30. Alekseeva EI, Tepaev RF, Shil'krot IYu, et al. COVID-19-induced "cytokine storm" — a special form of macrophage activation syndrome. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2021;76(1):51–66. doi: 10.15690/vramn1410 EDN: NFDLWC

ОБ АВТОРАХ

*** Грачева Елена Сергеевна**, аспирант, ассистент, каф. биохимии и клинической лабораторной диагностики; адрес: Россия, 420012, Казань, ул. Бутлерова, д. 49; ORCID: 0000-0002-8543-6529; eLibrary SPIN: 3290-5459; e-mail: gracheva020688@mail.ru

Самигуллин Дмитрий Владимирович, канд. биол. наук, заведующий, лаб. биофизики синаптических процессов; ORCID: 0000-0001-6019-5514; eLibrary SPIN: 4751-7443; e-mail: samid75@mail.ru

Мустафин Ильшат Ганиевич, д-р мед. наук, профессор, заведующий, каф. биохимии и клинической лабораторной диагностики; ORCID: 0000-0001-9683-3012; eLibrary SPIN: 1588-6988; e-mail: ilshat.mustafin@kazangmu.ru

Абдулганиева Диана Ильдаровна, д-р мед. наук, профессор, заведующий, каф. госпитальной терапии; ORCID: 0000-0001-7069-2725; eLibrary SPIN: 6676-4270; e-mail: diana_s@mail.ru

AUTHORS INFO

*** Elena S. Gracheva**, Postgrad. Student, Assistant, Depart. of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics; address: 49 Butlerova st, Kazan, Russia, 420012; ORCID: 0000-0002-8543-6529; eLibrary SPIN: 3290-5459; e-mail: gracheva020688@mail.ru

Dmitry V. Samigullin, Cand. Sci. (biology), Head, Lab. of Biophysics and Synaptic Processes; ORCID: 0000-0001-6019-5514; eLibrary SPIN: 4751-7443; e-mail: samid75@mail.ru

Il'shat G. Mustafin, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Head, Depart. of Biochemistry and Clinical Laboratory Diagnostics; ORCID: 0000-0001-9683-3012; eLibrary SPIN: 1588-6988; e-mail: ilshat.mustafin@kazangmu.ru

Diana I. Abdulganieva, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, Head, Hospital therapy depart.; ORCID: 0000-0001-7069-2725; eLibrary SPIN: 6676-4270; e-mail: diana_s@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author