

Особенности гемостаза у пациентов с коронавирусной инфекцией

А.И. Калинин^{1,2}, О.А. Духин^{1,2}, И.А. Молодцов¹, А.С. Анисимова², Д.А. Соколов¹, А.К. Елизарова^{1,2},
О.А. Сапожникова¹, К.А. Глебова¹, С.С. Шахиджанов³, И.С. Спиридонов³, Ф.И. Атауллаханов^{3,4},
А.В. Шпектор², Е.Ю. Васильева^{1,2}

¹ГБУЗ «Городская клиническая больница им. И.В. Давыдовского» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;
²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия;
³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва, Россия;
⁴Пенсильванский университет, Филадельфия, США

Аннотация

Цель. Анализ динамики разных этапов образования тромба и его лизиса у пациентов с различной тяжестью течения COVID-19.

Материалы и методы. Произведен анализ образцов 58 пациентов с COVID-19 (39 больных со средней тяжестью течения и 18 человек с тяжелым течением) и 47 здоровых добровольцев. Всем участникам проведены тест эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД) плечевой артерии, импедансная агрегометрия, ротационная тромбоэластометрия и тест тромбодинамики. Пациентам с COVID-19 также выполнено измерение антигена фактора фон Виллебранда (фФВ:Аг). Измерения проводили в динамике на 3 и 9-й день госпитализации.

Результаты. По сравнению с контрольной группой у пациентов с COVID-19 выявлены сниженные значения агрегации тромбоцитов и большие значения скорости роста сгустка, а также его размера и плотности. В 1-й день госпитализации не обнаружено различий в активности плазменного гемостаза и эндогенного фибринолиза между подгруппами пациентов. С течением заболевания скорость роста и размер тромба оказались выше в подгруппе тяжелого течения, даже несмотря на более высокие дозы антикоагулянтов у этой подгруппы больных. Зафиксирован рост агрегации тромбоцитов в ходе заболевания, особенно в подгруппе тяжелого течения. Различий в результатах теста ЭЗВД между подгруппами пациентов не зарегистрировано. Уровень фФВ:Аг был статистически значимо выше в подгруппе тяжелого течения.

Заключение. Показано, что плазменный гемостаз с последующей вторичной активацией тромбоцитов коррелирует с тяжестью течения заболевания COVID-19. У пациентов со средним и тяжелым течением коронавирусной инфекции имеется преимущественно локальная, нежели генерализованная эндотелиальная дисфункция.

Ключевые слова: COVID-19, тромбоциты, плазменный гемостаз, эндотелий

Для цитирования: Калинин А.И., Духин О.А., Молодцов И.А., Анисимова А.С., Соколов Д.А., Елизарова А.К., Сапожникова О.А., Глебова К.А., Шахиджанов С.С., Спиридонов И.С., Атауллаханов Ф.И., Шпектор А.В., Васильева Е.Ю. Особенности гемостаза у пациентов с коронавирусной инфекцией. Терапевтический архив. 2022;94(7):876–883. DOI: 10.26442/00403660.2022.07.201754

Информация об авторах / Information about the authors

✉ **Калинская Анна Ильинична** – канд. мед. наук, зав. отд-нием неотложной кардиологии для больных с острым инфарктом миокарда ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского», доц. каф. кардиологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». Тел.: +7(916)549-97-49; e-mail: kalinskaya.anna@gmail.com; ORCID: 0000-0003-2316-4238

Духин Олег Арменович – врач-кардиолог ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского», аспирант ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0003-2278-1154

Молодцов Иван Александрович – медицинский статистик ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского». ORCID: 0000-0001-8154-9350

Анисимова Александра Сергеевна – врач-ординатор ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-1215-132X

Соколов Денис Алексеевич – врач-кардиолог ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского». ORCID: 0000-0003-4887-2185

Елизарова Антонина Константиновна – врач-кардиолог ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского», аспирант ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-8715-8916

Сапожникова Ольга Алексеевна – врач-кардиолог ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского». ORCID: 0000-0002-6520-5926

Глебова Ксения Алексеевна – врач-кардиолог ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского». ORCID: 0000-0002-2559-9449

Шахиджанов Сослан Сергеевич – науч. сотр. лаб. биофизики ФГБУН «ЦТТ ФХФ». ORCID: 0000-0002-5677-8052

Спиридонов Илья Сергеевич – вед. инженер отдела разработок ФГБУН «ЦТТ ФХФ». ORCID: 0000-0001-7514-0559

Атауллаханов Фазил Иноятович – канд. физ.-мат. наук, д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотр. ФГБУН «ЦТТ ФХФ», приглашенный проф. Пенсильванского университета; ORCID: 0000-0003-3403-181X

✉ **Anna I. Kalinskaya.** E-mail: kalinskaya.anna@gmail.com; ORCID: 0000-0003-2316-4238

Oleg A. Dukhin. ORCID: 0000-0003-2278-1154

Ivan A. Molodtsov. ORCID: 0000-0001-8154-9350

Aleksandra S. Anisimova. ORCID: 0000-0002-1215-132X

Denis A. Sokorev. ORCID: 0000-0003-4887-2185

Antonina K. Elizarova. ORCID: 0000-0001-8715-8916

Olga A. Sapozhnikova. ORCID: 0000-0002-6520-5926

Kseniya A. Glebova. ORCID: 0000-0002-2559-9449

Soslan S. Shakhidzhanov. ORCID: 0000-0002-5677-8052

Ilya S. Spiridonov. ORCID: 0000-0001-7514-0559

Fazly I. Ataulakhanov. ORCID: 0000-0003-3403-181X

Peculiarities of hemostasis in patients with COVID-19

Anna I. Kalinskaya^{1,2}, Oleg A. Dukhin^{1,2}, Ivan A. Molodtsov¹, Aleksandra S. Anisimova², Denis A. Sokorev¹, Antonina K. Elizarova^{1,2}, Olga A. Sapozhnikova¹, Kseniya A. Glebova¹, Soslan S. Shakhidzhanov³, Ilia S. Spiridonov³, Fazly I. Ataullakhanov^{3,4}, Alexander V. Shpektor², Elena Yu. Vasilieva^{1,2}

¹Davydovsky City Clinical Hospital, Moscow, Russia;

²Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

³Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow, Russia;

⁴University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Abstract

Aim. Analysis of the dynamics of different stages of clot formation and its lysis in patients with different COVID-19 severity.

Materials and methods. We prospectively included 58 patients with COVID-19 (39 patients with moderate disease severity and 18 patients with severe disease) and 47 healthy volunteers as a control group. All participants underwent the assessment of flow-mediated dilation (FMD) of brachial artery, impedance aggregometry, rotational thromboelastometry and thrombodynamics. Von Willebrand factor antigen (vWF:Ag) quantification was also performed in patients with COVID-19. Measurements were repeated on the 3rd and 9th day of hospitalization.

Results. Compared to the control group, patients with COVID-19 showed reduced values of platelet aggregation and greater values of the clot growth rate, as well as its size and density. On the first day of hospitalization, we found no differences in the activity of plasma hemostasis and endogenous fibrinolysis between subgroups of patients. With the progression of the disease, the growth rate and size of the clot were higher in the severe subgroup, even despite higher doses of anticoagulants in this subgroup. An increase in platelet aggregation was noted during the progression of the disease, especially in the severe subgroup. There were no differences in the results of the FMD test by subgroups of patients. The vWF:Ag level was significantly higher in the severe subgroup.

Conclusion. Thus, plasma hemostasis followed by secondary platelet activation correlates with the severity of COVID-19. Patients with moderate to severe coronavirus infection have predominantly local rather than generalized endothelial dysfunction.

Keywords: COVID-19, platelets, plasma hemostasis, endothelium

For citation: Kalinskaya AI, Dukhin OA, Molodtsov IA, Anisimova AS, Sokorev DA, Elizarova AK, Sapozhnikova OA, Glebova KA, Shakhidzhanov SS, Spiridonov IS, Ataullakhanov FI, Shpektor AV, Vasilieva EYu. Peculiarities of hemostasis in patients with COVID-19. *Terapevticheskii Arkhiv (Ter. Arkh.)*. 2022;94(7):876–883. DOI: 10.26442/00403660.2022.07.201754

Введение

Коронавирусная инфекция COVID-19 зачастую ассоциирована с тромботическими осложнениями [1]. Частота возникновения венозных тромбозов разнообразной локализации у госпитализированных с COVID-19 пациентов приблизительно составляет 15–35% [2]. Характерной особенностью этого заболевания является развитие микроангиопатии в виде деструктивного тромбоваскулита и микротромбозов капилляров легочного русла [3, 4].

К настоящему моменту точные патофизиологические механизмы развития COVID-19-индуцированной коагулопатии остаются невыясненными. В ряде кратких отчетов сообщалось о прямом поражении эндотелия вирусной инфекцией [5, 6], однако эти данные остаются противоречивыми. В целом повреждение эндотелия может привести, с одной стороны, к активации агрегации тромбоцитов посредством усиления выброса фактора фон Виллебранда (фФВ), а с другой, к активации плазменного гемостаза посредством высвобождения тканевого фактора [7, 8]. В настоящее время для лечения COVID-19-индуцированной коагулопатии используют терапию антикоагулянтами [9, 10], однако остается неясным, насколько отдельные факторы формирования тромба влияют на течение заболевания.

Цель исследования – оценить взаимосвязь различных факторов формирования тромба с тяжестью течения заболевания у пациентов с COVID-19.

Материалы и методы

Условия проведения

Исследование проводили на базе ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского» (Москва) в период с мая по июнь 2020 г.

Критерии соответствия

В исследование включены 58 пациентов с COVID-19 и 47 здоровых добровольцев, набранных в качестве контрольной группы.

Критерии включения:

- пациенты с высокой вероятностью COVID-19-ассоциированной пневмонии по данным компьютерной томографии (КТ), подтвержденной результатами полимеразной цепной реакции;
- среднее либо тяжелое течение заболевания (**табл. 1**);
- наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения:

- прием антикоагулянтов в анамнезе;
- больные в критическом состоянии;
- несоблюдение протокола исследования.

Набор контрольной группы проводили до начала пандемии. В рамках настоящего исследования мы использовали группу, включенную ранее в наши работы по гемостазу [11, 12]. Критерии исключения для контрольной группы подразумевали наличие в анамнезе ишемической болезни сердца, инсульта, хронической обструктивной болезни

Информация об авторах / Information about the authors

Шпектор Александр Владимович – чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, проф., рук-ль Университетской клиники кардиологии ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0001-6190-6808

Васильева Елена Юрьевна – д-р мед. наук, проф., глав. врач ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского», рук-ль лаб. атеротромбоза ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова». ORCID: 0000-0002-6310-7636

Alexander V. Shpektor. ORCID: 0000-0001-6190-6808

Elena Yu. Vasilieva. ORCID: 0000-0002-6310-7636

легких, тромбозов любой локализации, онкологических заболеваний, употребление антикоагулянтов или антиагрегантов, отсутствие активного воспалительного процесса на момент включения в исследование.

Клиническое обследование

Всем пациентам проводилось стандартное клиническое обследование. Здоровым добровольцам выполнены осмотр и анализы крови.

При поступлении (точка №1, T1) всем пациентам проведены:

- тест эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД) плечевой артерии для оценки функции эндотелия;
- импедансная агрегометрия;
- тромбодинамика и ротационная тромбоэластометрия;
- количественный анализ антигена фактора фон Виллебранда (ффВ:Аг).

Все исследования (кроме измерения ффВ:Аг) выполняли повторно на 3-й (точка №2, T2) и 9-й (точка №3, T3) дни госпитализации.

Тест ЭЗВД. С целью оценки функции эндотелия всем пациентам проведен тест ЭЗВД в соответствии со стандартной методикой [13].

Анализ образцов крови. Образцы получали до введения антикоагулянтов. Периферическую венозную кровь набирали в количестве 4,5 мл в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 0,105 М цитрата натрия. В T2 и T3 взятие образцов производили не менее чем через 12 часов от последнего введения антикоагулянта. В случае постоянной инфузии нефракционированного гепарина взятие образцов осуществляли без четкой привязки ко времени. Промежуток между взятием крови и началом анализа составлял не более 15 мин.

Импедансная агрегометрия. Для проведения импедансной агрегометрии применяли анализатор Multiplate (Roche, Швейцария) [14]. В качестве активаторов тромбоцитов использовались арахидоновая кислота – ASA (20 мкг), аденозиндифосфат (АДФ, 20 мкг), пептид-6, активирующий рецептор тромбина (Thrombin Receptor-Activated Peptide – TRAP-6; 20 мкг) и ристоцетин (RISTO, 12 мкг).

Ротационная тромбоэластометрия. Исследование проводили на аппарате ROTEM (Roche, Швейцария) в режиме NATEM. Для анализа использовали следующие показатели: время свертывания (Clotting Time – CT, в секундах), время формирования тромба (Clot Formation Time – CFT, в секундах), размер тромба в разные промежутки времени (A5–A30, в мм), угол α (α , в градусах), максимальная плотность сгустка (Mean Clot Firmness – MCF, в мм), индекс лизиса тромба в разные промежутки времени (Li30, %; Li45, %; Li60, %), время начала лизиса (Lysis Onset Time – LOT, в секундах).

Тромбодинамика. Исследование выполняли на анализаторе «Тромбодинамика Т-2» (ООО «ГемаКор», Россия) по стандартной методике [15]. Анализировали следующие параметры: средняя скорость роста сгустка (V , мкм/мин), начальная и стационарная скорости роста тромба (V_i , мкм/мин; V_{st} , мкм/мин), размер сгустка (Clot Size – CS, мкм), плотность тромба (Density, усл. ед.), время появления спонтанных сгустков (Time of spontaneous clots onset – Tsp, в минутах). Для индукции лизиса добавляли стандартный активатор с урокиназой. В качестве параметров лизиса оценивали время начала лизиса (LOT, в минутах), скорость развития лизиса (Lysis Progression – LP, % лизиса исходного сгустка в минуту), время лизиса сгустка (Clot Lysis Time – CLT, в минутах) и ожидаемое время лизиса (Lysis Time Estimated – LTE, в минутах).

Таблица 1. Критерии определения тяжести течения заболевания у пациентов с COVID-19

Table 1. Criteria for determining the severity of the course of the disease in patients with COVID-19

Среднее течение	Тяжелое течение
Температура тела $>37,5^{\circ}\text{C}$	Частота дыхательных движений >30 в минуту
Частота дыхательных движений 22–30 в минуту	$\text{SpO}_2 \leq 93\%$
I или II стадии пневмонии по данным КТ	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ мм рт. ст. III или IV стадии пневмонии по данным КТ
Повышение концентрации С-реактивного белка ≥ 10 мг/л	Сниженный уровень сознания, ажитация Концентрация лактата в артериальной крови >2 ммоль/л

Количественный анализ ффВ:Аг производили с использованием системы латексного иммуноферментного анализа HemosIL (Werfen, США) по стандартной методике. В качестве анализатора использовали ACL TOP (Werfen, США).

Соответствие принципам этики

Протокол исследования был сформирован в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрен Московским городским независимым этическим комитетом (протокол №70, 11.05.2020). Каждый пациент подписал письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с использованием языка программирования Python 3 и пакетов NumPy, SciPy и Pandas. Для сравнения распределения количественных показателей между независимыми выборками пациентов использовали U-критерий Манна–Уитни. Для сравнения качественных показателей между независимыми выборками пациентов применяли точный тест Фишера. Для оценки изменения количественных показателей у одного пациента между различными временными отметками использовали знаково-ранговый тест Уилкоксона. Уровень значимости α для значений p определен как 0,05. Для контроля ошибок I типа мы рассчитали значения q уровня ложных находок с помощью процедуры Бенджамин–Хохберга, при этом установлен порог в 0,1 для ограничения уровня ложноположительных результатов ниже 10%.

Результаты

Клиническая информация

1. Сравнение контрольной группы и пациентов с COVID-19.

Пациенты с COVID-19 достоверно чаще страдали артериальной гипертензией по сравнению с контрольной группой. В группе с COVID-19 отмечено повышение концентрации креатинина, общего холестерина, высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ), глюкозы и увеличение активности аспаратаминотрансферазы.

Таблица 2. Сравнение подгрупп пациентов**Table 2. Comparison of patient subgroups**

Характеристики	Контроль (n=47)	COVID-19 (n=58)	p
Возраст, годы	52,0 [33,0; 61,5]	56,0 [46,0; 65,0]	0,06
Мужской пол, %	40	39	1,00
Курение, %	13	7	0,34
Артериальная гипертензия, %	17	63	<0,01
Сахарный диабет, %	4	16	0,11
Инфаркт миокарда в анамнезе, %	0	4	0,50
Креатинин, мкмоль/л	72,5 [64,8; 96,0]	103 [9,8; 122,25]	<0,01
Общий холестерин, ммоль/л	5,2 [4,7; 5,8]	4,365 [3,4; 4,6]	0,03
вч-СРБ, мг/л	0,7 [0,1; 1,7]	37,2 [17,2; 76,0]	<0,01
Глюкоза, ммоль/л	5,7 [5,5; 6,3]	6,25 [5,8; 7,48]	0,03
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л	25,0 [20,0; 34,0]	47 [34,8; 72,25]	<0,01
Характеристики	Среднее течение (n=39)	Тяжелое течение (n=18)	p
Возраст, годы	55,0 [45,4; 65,0]	57,0 [52,5; 70,25]	0,17
Мужской пол, %	38	39	1,00
День заболевания в Т1, дни	7,3 [4,5; 9,0]	7,4 [6,0; 9,7]	0,16
Курение, %	5	11	0,59
Артериальная гипертензия, %	61	67	0,77
Креатинин, мкмоль/л	101 [90,3; 117,5]	101 [84,8; 120,25]	0,47
вч-СРБ, мг/л	25,65 [12,4; 50,35]	71,1 [29,9; 99,57]	<0,01
D-димер, нг/мл	337,0 [186,0; 558,0]	745,0 [376,0; 1502,0]	<0,01
Прокальцитонин, нг/мл	0,05 [0,0; 0,09]	0,2 [0,1; 0,32]	<0,01
КТ-стадия, n	КТ-1 – 14 КТ-2 – 17 КТ-3 – 7	КТ-1 – 0 КТ-2 – 6 КТ-3 – 12	<0,01
Необходимость в дыхательной поддержке, %	5	94	<0,01

2. Сравнение подгрупп пациентов.

В исследовании участвовали 58 пациентов с COVID-19: 39 – в подгруппе со средней тяжестью течения заболевания и 19 – в подгруппе с тяжелым течением. Между подгруппами не отмечено значимых различий по клинико-демографическим характеристикам (табл. 2). У пациентов с тяжелым течением заболевания зарегистрировано более значимое повышение маркеров системного воспаления (см. табл. 2).

Во время госпитализации все пациенты получали антикоагулянтную терапию; 7 пациентам (все из «тяжелой» подгруппы) потребовалась инвазивная или неинвазивная вентиляция легких, 2 из них умерли.

Тест ЭЗВД

1. Пациенты с COVID-19 имели сниженные значения ЭЗВД по сравнению с контрольной группой, средние значения оставались в пределах нормы: 9,2 [6,4; 15,1]% vs 7,14 [4,2; 11,1] % (p=0,02; рис. 1).

2. Между пациентами разных подгрупп значимых различий в результатах ЭЗВД не наблюдалось (см. рис. 1).

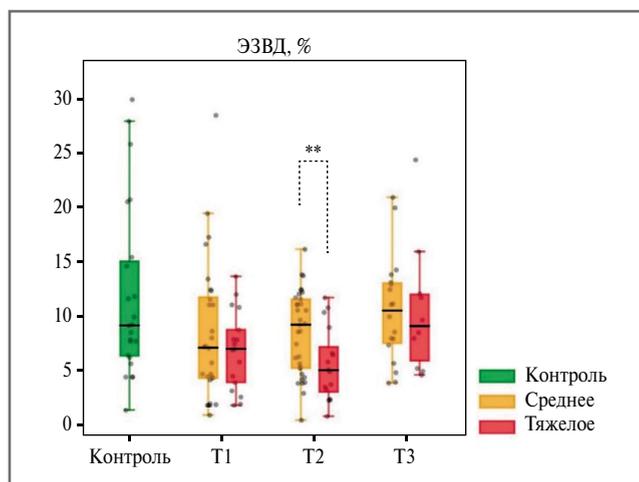


Рис. 1. Результаты теста ЭЗВД в 1, 2 и 3-й точках.

Примечание. Здесь и на рис. 2–4: *p<0,05, q>0,1; **p<0,05, q<0,1.

Fig. 1. The results of the test for endothelium-dependent vasodilation at the 1st, 2nd and 3rd points.

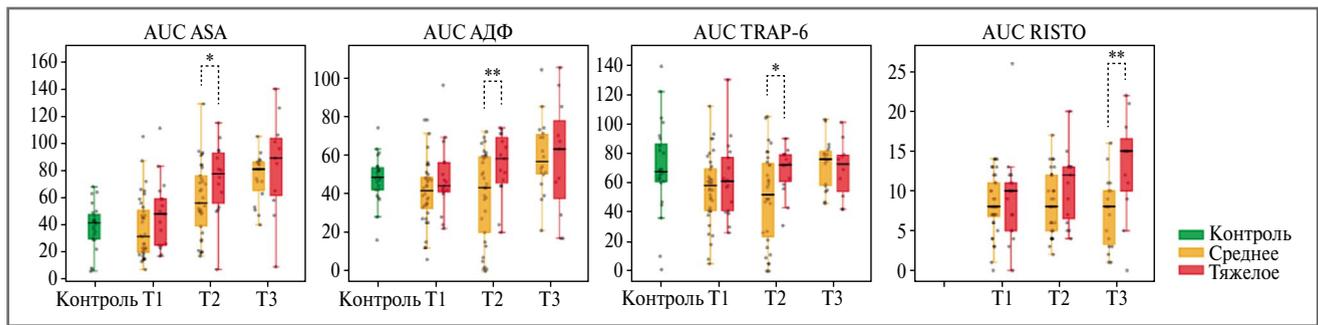


Рис. 2. Результаты исследования импедансной агрегометрии в 1, 2 и 3-й точках.

Fig. 2. The results of the study of impedance aggregometry at the 1st, 2nd and 3rd points.

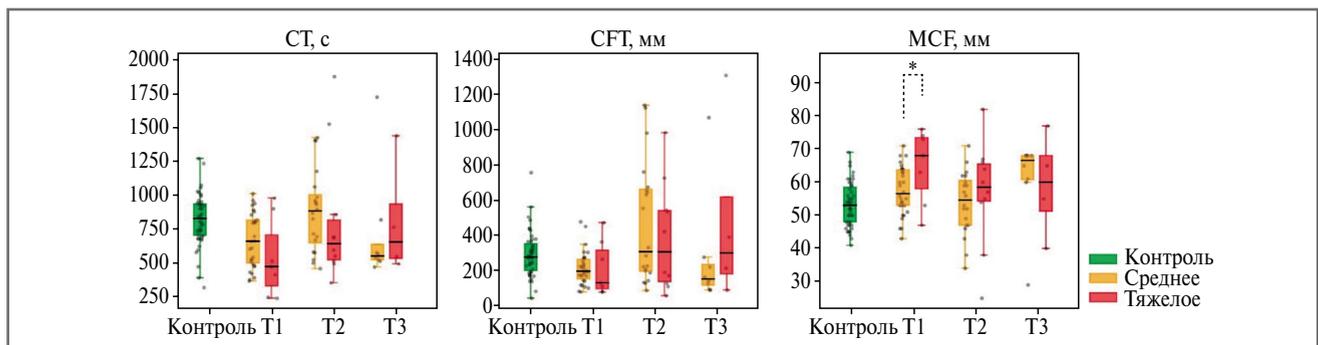


Рис. 3. Результаты исследования ротационной тромбоэластометрии во временных точках 1, 2 и 3.

Fig. 3. The results of the study of rotational thromboelastometry at time points 1, 2 and 3.

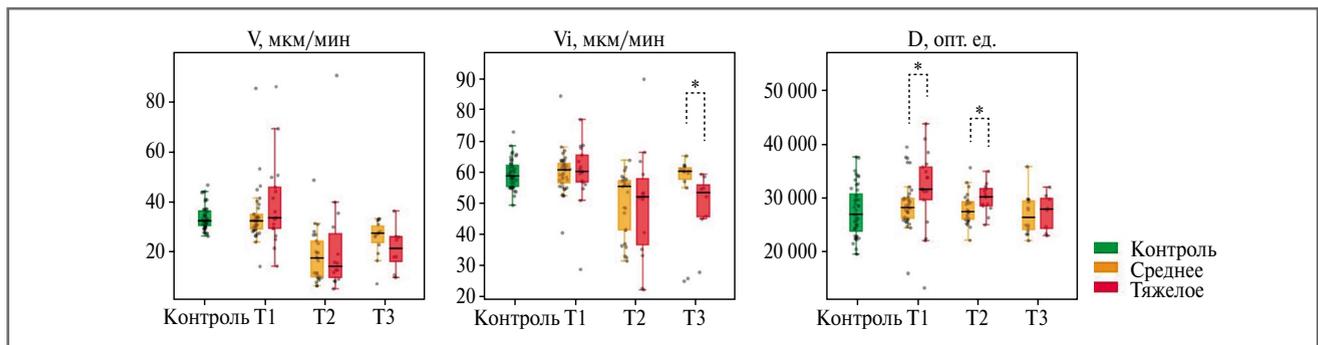


Рис. 4. Результаты исследования тромбодинамики во временных точках 1, 2 и 3.

Fig. 4. The results of the thrombodynamic study at time points 1, 2 and 3.

Агрегация тромбоцитов

1. У пациентов с COVID-19 зафиксированы более низкие значения агрегации, индуцированной АДФ (AUC АДФ составила 43,9 [34,0; 50,0] vs 48,5 [42,0; 53,3]; $p=0,04$) и TRAP-6 (AUC TRAP-6 составила 60,0 [41,0; 71,0] vs 67,5 [60,8; 86,3]; $p=0,05$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

2. Значимых различий между подгруппами в значениях индуцированной агрегации тромбоцитов в T1 не зарегистрировано. Показатели индуцированной агрегации находились на нижнем уровне референсных значений. В динамике наблюдали увеличение показателей агрегации, индуцированной ASA, АДФ и TRAP-6, в обеих подгруппах. Увеличение показателей агрегации, индуцированной АДФ, тромбином и RISTO, оказалось статистически зна-

чительно более выраженным в подгруппе с тяжелым течением (см. рис. 2).

Ротационная тромбоэластометрия

1. У пациентов с COVID-19 отмечался более быстрый рост тромба (СТ, с, 638,5 [481,0; 848,5] vs 832,0 [709,0; 937,0]; $p<0,01$) и его больший размер (A30, мм, 59,0 [53,0; 64,0] vs 53,0 [47,0; 56,5]; $p<0,01$) в разных временных интервалах эксперимента, так же как и более раннее начало лизиса сгустка (LOT, с, 5108 [4655,5; 5214,5] vs 5674,0 [5090,0; 8093,0]; $p=0,05$), по сравнению с контрольной группой (рис. 3).

2. Между подгруппами пациентов не имелось значимой разницы в размере тромба и скорости его роста в разных временных интервалах исследования. В подгруппе средней

тяжести течения заболевания отмечалось значимое уменьшение размера и скорости роста сгустка в T2 по сравнению с T1. В группе тяжелого течения присутствовала только тенденция.

Тромбодинамика

1. У пациентов с COVID-19 зафиксирована большая оптическая плотность сгустка (D, опт. ед., 29 425,0 [26 724,0; 31 945,0] vs 26 913,0 [23 858,5; 30 786,8]; $p=0,01$) и более раннее появление спонтанных сгустков в плазме крови (Tsp, мин, 29,7 [19,0; 54,2] vs 55,5 [44,4; 85,7]; $p<0,01$) по сравнению с контрольной группой (рис. 4).

2. У подгруппы пациентов с тяжелым течением по сравнению с подгруппой пациентов с течением заболевания средней тяжести отмечалась большая оптическая плотность фибринового сгустка (D, опт. ед., 28 212,0 [26 229,0; 29 939,0] vs 31 630,0 [29 690,0; 35 770,0]; $p=0,02$), но различие не сохранилось статистически значимым после применения поправки на множественные сравнения ($FDR>0,1$). В обеих подгруппах в динамике показано уменьшение степени роста сгустков (размер и плотность). Однако этот эффект оказался более выраженным среди пациентов из группы средней тяжести течения заболевания.

Фибринолиз

1. У пациентов с COVID-19 имело место более раннее начало лизиса сгустка (LOT, мин, 30,5 [26,8; 38,5] vs 63,3 [42,6; 80,7]; $p<0,01$), а также большая скорость и эффективность лизиса (LP, % в минуту, 5,2 [3,1; 8,1] vs 2,0 [1,4; 3,4]; $p<0,01$).

2. Между разными подгруппами пациентов не обнаружено значимой разницы в параметрах фибринолиза как в T1, так и при дальнейших измерениях.

Обсуждение

Гиперкоагуляция описана при различных вирусных инфекциях: гриппе H1N1, лихорадке Эбола, СПИДе, гепатите С, цитомегаловирусной инфекции и др. [16–20]. Коронавирусная инфекция часто осложняется развитием коагулопатии, что приводит к возникновению синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания и различным тромбоэмболическим осложнениям [21, 22]. Более того, в посмертных исследованиях пациентов, умерших от коронавирусной инфекции, в 87% случаев наблюдали тромбоцитарно-фибриновые тромбы в артериях малого калибра [23].

Процесс формирования тромба состоит из следующих основных этапов: повреждение эндотелия, активация тромбоцитов, активация плазменных факторов свертывания и фибринолиз. Для изучения возможного вклада каждого компонента в процесс тромбообразования у пациентов с COVID-19 проводилась отдельная оценка каждого фактора и исследовалась их взаимосвязь с тяжестью течения заболевания.

Предположение, что повреждение эндотелия играет ведущую роль в коагулопатии, вызванной коронавирусной инфекцией, является достаточно рациональным. В серии работ описана возможная роль повреждения эндотелия и его дисфункции в прогрессировании коронавирусной инфекции [7, 24–26], что, в целом, может быть обусловлено прямым инфицированием эндотелия вирусом SARS-CoV-2 [6, 27]. Повреждение эндотелия также подтверждено прямым измерением эндотелиальных биомаркеров, таких как ффВ, ADAMTS 13 и т.д. [28–30].

В настоящей работе мы оценивали функцию эндотелия с помощью теста ЭЗВД, который широко используется в качестве предиктора нежелательных событий у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [31, 32]. У 70% пациентов значения теста ЭЗВД находились в пределах нормальных значений, более того, у 24% пациентов отмечались значения ЭЗВД в 2–2,5 раза выше среднего значения у здоровых людей ($12,0\pm 3,2$) [33]. Известно, что острые воспалительные процессы влияют на эндотелиальную функцию [34]. Именно поэтому мы наблюдали снижение значений теста ЭЗВД на 3-й день нашего исследования, к 9-му же дню значения теста ЭЗВД восстанавливались. Однако следует отметить, что даже на 3-й день исследования значения теста оставались в пределах нормы.

Одним из важнейших регуляторов процессов гемостаза является ффВ. Серия работ показала повышение уровня ффВ у пациентов с коронавирусной инфекцией, особенно в случае тяжелого ее течения [30, 35–37]. В настоящем исследовании мы также получили статистически значимое повышение содержания ффВ:Ag, наиболее выраженное среди более тяжелых пациентов. Таким образом, с одной стороны, мы видим признаки повреждения эндотелия в виде значимого повышения ффВ, с другой – отсутствие значимого снижения способности эндотелия выделять NO. Как же объяснить это противоречие? Вероятнее всего, у пациентов с коронавирусной инфекцией среднего и тяжелого течения имеется преимущественно локальное поражение эндотелия микроциркуляторного русла (предположительно, легких), что не отражается на его генерализованной функции.

Значимая активация тромбоцитов при коронавирусной инфекции продемонстрирована в серии работ [8, 38]. Недавний метаанализ, включивший 12 исследований, показал улучшение прогноза у пациентов, получавших лечение аспирином в случае тяжелого течения коронавирусной инфекции [39]. Однако ряд других авторов ставят под сомнение пользу от назначения аспирина, которая может быть нивелирована повышенным риском развития кровотечений [40, 41]. В нашем исследовании исходное снижение уровня агрегации тромбоцитов у пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой сопровождалось последующим увеличением реактивности тромбоцитов. Данный феномен оказался более выраженным среди пациентов с тяжелым течением заболевания, что соответствует данным литературы [8]. В настоящей работе мы впервые показали отсроченный характер активации тромбоцитов при коронавирусной инфекции.

Напротив, мы обнаружили, что активация плазменного звена коагуляции была более выражена у пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой уже с самого начала заболевания. Более того, уровень активации коррелировал с тяжестью течения заболевания, особенно во время прогрессирования болезни. Важным является тот факт, что активация определялась несмотря на 100% применение антикоагулянтов у этих больных. Оптимальная антикоагулянтная терапия, в особенности у тяжелых пациентов, требует дальнейшего изучения.

Кроме того, мы показали, что процесс эндогенного фибринолиза оказался значительно более активным у больных с COVID-19 по сравнению с контрольной группой. Однако мы не нашли различий в процессах эндогенного фибринолиза между подгруппами пациентов с тяжелым течением и средней тяжестью течения заболевания, за исключением повышенного уровня D-димера (особенно среди тяжелобольных пациентов), как и описано большинством других авторов [42, 43].

Заключение

Исследование показало ведущую роль плазменного звена гемостаза у пациентов с COVID-19-индуцированной коагулопатией. Активация тромбоцитов, по-видимому, носит вторичный характер и запускается после плазменного гемостаза. Плазменный гемостаз с последующей вторичной активацией тромбоцитов коррелируют с тяжестью течения заболевания COVID-19. У больных со средним и тяжелым течением коронавирусной инфекции имеется преимущественно локальная, нежели генерализованная эндотелиальная дисфункция.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Список сокращений

АДФ – аденозиндифосфат
вч-СРБ – высокочувствительный С-реактивный белок
КТ – компьютерная томография
фФВ – фактор фон Виллебранда
фФВ:Аг – антиген фактора фон Виллебранда
ЭЗВД – эндотелий-зависимая вазодилатация
А – размер тромба в разные промежутки времени
ASA – арахидоновая кислота
AUC – Area Under the Curve (площадь под кривой)
CFT – Clot Formation Time (время формирования тромба)
CLT – Clot Lysis Time (время лизиса сгустка)
CS – Clot Size (размер сгустка)
CT – Clotting Time (время свертывания)
D – Density (плотность тромба)
Li – индекс лизиса тромба в разные промежутки времени

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria.

Источник финансирования. Исследование поддержано грантом Правительства Москвы на реализацию научно-практического проекта в медицине №2312-44/22.

Funding source. The study was supported by a grant from the Government of Moscow for the implementation of a scientific and practical project in medicine No. 2312-44/22.

Информированное согласие на публикацию. Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information and all of accompanying images within the manuscript.

LOT – Lysis Onset Time (время начала лизиса)
LP – Lysis Progression (скорость развития лизиса)
LTE – Lysis Time Estimated (ожидаемое время лизиса)
MCF – Mean Clot Firmness (максимальная плотность сгустка)
PaO₂/FiO₂ – индекс оксигенации
RISTO – ристоцетин
SpO₂ – насыщение крови кислородом
TRAP-6 – Thrombin Receptor-Activated Peptide-6 (пептид-6, активирующий рецептор тромбина)
Tsp – Time of spontaneous clots onset (время появления спонтанных сгустков)
V – средняя скорость роста сгустка
Vi – начальная скорость роста тромба
Vst – стационарная скорость роста тромба

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507-13. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30211-7
- Jenner WJ, Gorog DA. Incidence of thrombotic complications in COVID-19: On behalf of ICODE: The International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;52(4):999-1006. DOI:10.1007/s11239-021-02475-7
- Edler C, Schröder AS, Aepfelbacher M, et al. Dying with SARS-CoV-2 infection – an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. *Int J Legal Med*. 2020;134(4):1275-84. DOI:10.1007/s00414-020-02317-w
- McGonagle D, Bridgewood C, Ramanan AV, et al. COVID-19 vasculitis and novel vasculitis mimics. *Lancet Rheumatol*. 2021;3(3):e224-33. DOI:10.1016/S2665-9913(20)30420-3
- Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120-8. DOI:10.1056/NEJMoa2015432
- Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020;395(10234):1417-8. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30937-5
- O'Sullivan JM, Gonagle DM, Ward SE, et al. Endothelial cells orchestrate COVID-19 coagulopathy. *Lancet Haematol*. 2020;7(8):e553-5. DOI:10.1016/S2352-3026(20)30215-5
- Manne BK, Denorme F, Middleton EA, et al. Platelet Gene Expression and Function in COVID-19 Patients. *Blood*. 2020;136(11):1317-29. DOI:10.1182/blood.2020007214
- Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(23):2950-73. DOI:10.1016/j.jacc.2020.04.031
- Thachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020;18(5):1023-6. DOI:10.1111/jth.14810
- Калинская А.И., Саввинова П.П., Васильева Е.Ю., Шпектор А.В. Особенности тромбообразования и эндогенного фибринолиза у пациентов с острым коронарным синдромом. *Российский кардиологический журнал*. 2018;(9):12-6 [Kalinskaya AI, Savvinova PP, Vasileva EYu, Shpektor AV. The specifics of clotting and endogenous fibrinolysis in acute coronary syndrome patients. *Russian Journal of Cardiology*. 2018;(9): 12-6 (in Russian)]. DOI:10.15829/1560-4071-2018-9-12-16
- Dukhin OA, Kalinskaya A, Uzhakhova H, et al. Clot formation and endogenous fibrinolysis in ACS patients compared to patients with a history of ST elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2020;315:e233. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.733
- Rodriguez-Miguel P, Seigler N, Harris RA. Ultrasound assessment of endothelial function: A technical guideline of the flow-mediated dilation test. *J Vis Exp*. 2016;(110):54011. DOI:10.3791/54011
- Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*. 2015;11:133-48. DOI:10.2147/VHRM.S44469
- Balandina AN, Serebriyskiy II, Poletaev AV, et al. Thrombodynamics – A new global hemostasis assay for heparin monitoring in patients under the anticoagulant treatment. *PLoS One*. 2018;13(6):e0199900. DOI:10.1371/journal.pone.0199900
- Funderburg NT, Lederman MM. Coagulation and morbidity in treated HIV infection. *Thromb Res*. 2014;133Suppl. 1(01):S21-4. DOI:10.1016/j.thromres.2014.03.012
- Yang J-R, Lo J, Ho Y-L, et al. Pandemic H1N1 and seasonal H3N2 influenza infection in the human population show different distributions of viral loads, which substantially affect the performance of rapid influenza tests. *Virus Res*. 2011;155(1):163-7. DOI:10.1016/j.virusres.2010.09.015

18. Wang CC, Chang CT, Lin CL, et al. Hepatitis C virus infection associated with an increased risk of deep vein thrombosis: A population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(38):e1585. DOI:10.1097/MD.0000000000001585
19. Geisbert TW, Young HA, Jahrling PB, et al. Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic Fever in Primate Models: Evidence that Hemorrhage Is Not a Direct Effect of Virus-Induced Cytolysis of Endothelial Cells. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2371-82. DOI:10.1016/S0002-9440(10)63592-4
20. Squizzato A, Gerdes VEA, Büller HR. Effects of human cytomegalovirus infection on the coagulation system. *Thromb Haemost*. 2005;93(3):403-10. DOI:10.1160/TH04-08-0523
21. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2021;397(10285):1637-45. DOI:10.1016/S0140-6736(21)00676-0
22. 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;18(7):1738-42. DOI:10.1111/jth.14850
23. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(10):1135-40. DOI:10.1016/S1473-3099(20)30434-5
24. Gattinoni L, Chiumello D, Caironi P, et al. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? *Intensive Care Med*. 2020;46(6):1099-102. DOI:10.1007/s00134-020-06033-2
25. Teuwen LA, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P. COVID-19: the vasculature unleashed. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(7):389-91. DOI:10.1038/s41577-020-0343-0. Erratum in: *Nat Rev Immunol*. 2020.
26. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML, et al. Articles Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol*. 2020;7(8):e575-82. DOI:10.1016/S2352-3026(20)30216-7
27. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120-8. DOI:10.1056/NEJMoa2015432
28. Mancini I, Baronciani L, Artoni A, et al. The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients. *J Thromb Haemost*. 2021;19(2):513-21. DOI:10.1111/jth.15191
29. Evans PC, Rainger GE, Mason JC, et al. Endothelial dysfunction in COVID-19: A position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc Res*. 2020;116(14):2177-84. DOI:10.1093/cvr/cvaa230
30. Ward SE, Curley GF, Lavin M, et al. Von Willebrand factor propeptide in severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): evidence of acute and sustained endothelial cell activation. *Br J Haematol*. 2021;192(4):714-9. DOI:10.1111/bjh.17273
31. Shechter M, Shechter A, Koren-Morag N, et al. Usefulness of brachial artery flow-mediated dilation to predict long-term cardiovascular events in subjects without heart disease. *Am J Cardiol*. 2014;113(1):162-7. DOI:10.1016/j.amjcard.2013.08.051
32. Vasilieva E, Vorobyeva I, Lebedeva A, et al. Brachial Artery Flow-mediated Dilation in Patients with Tako-Tsubo Cardiomyopathy. *Am J Med*. 2011;124(12):1176-9. DOI:10.1016/j.amjmed.2011.05.033
33. Maruhashi T, Kajikawa M, Kishimoto S, et al. Diagnostic Criteria of Flow-Mediated Vasodilation for Normal Endothelial Function and Nitroglycerin-Induced Vasodilation for Normal Vascular Smooth Muscle Function of the Brachial Artery. *J Am Heart Assoc*. 2020;9(2):e013915. DOI:10.1161/JAHA.119.013915
34. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):803-15. DOI:10.1038/nri2171
35. Helms J, Tacquard C, Severac F, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 2020;46(6):1089-98. DOI:10.1007/s00134-020-06062-x
36. Ladikou EE, Sivaloganathan H, Milne KM, et al. Von Willebrand factor (vWF): Marker of endothelial damage and thrombotic risk in COVID-19? *Clin Med (Lond)*. 2020;20(5):e178-82. DOI:10.7861/clinmed.2020-0346
37. Philippe A, Chocron R, Gendron N, et al. Circulating Von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality. *Angiogenesis*. 2021;24(3):505-17. DOI:10.1007/s10456-020-09762-6
38. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*. 2020;136(11):1330-41. DOI:10.1182/blood.2020007252
39. Abdi M, Hosseini Z, Shirjan F, et al. Effect of Aspirin on the prevention of pro-thrombotic states in hospitalized COVID-19 patients: Systematic review. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2022. DOI:10.2174/1871525720666220401102728
40. Zareef R, Diab M, Al Saleh T, et al. Aspirin in COVID-19: Pros and Cons. *Front Pharmacol*. 2022;13:849628. DOI:10.3389/fphar.2022.849628
41. RECOVERY Collaborative Group. Aspirin in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2022;399(10320):143-51. DOI:10.1016/S0140-6736(21)01825-0
42. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844-7. DOI:10.1111/jth.14768
43. Lippi G, Favaloro EJ. D-dimer is Associated with Severity of Coronavirus Disease 2019: A Pooled Analysis. *Thromb Haemost*. 2020;120(5):876-8. DOI:10.1055/s-0040-1709650

Статья поступила в редакцию/The article received: 20.06.2022



OMNIDOCTOR.RU