

АНАЛИЗ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И МАРКЕРОВ АПОПТОЗА ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Агапов А.Б.^{1,2}, Калинин Р.Е.¹, Мжаванадзе Н.Д.¹, Поваров В.О.¹, Никифоров А.А.¹, Максаев Д.А.^{1,3}, Чобанян А.А.³, Сучков И.А.*¹

DOI: 10.25881/20728255_2023_18_4_45

¹ ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова», Рязань

² ГБУ РО «Областная клиническая больница», Рязань

³ ГБУ РО «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Рязань

Резюме. Цель исследования: провести анализ маркеров воспаления MCP1, IP 10 и маркеров апоптоза тромбоцитов фосфатидилсерина и кальретикулина при проведении антикоагулянтной терапии (АКТ) у пациентов с COVID-19.

Материал и методы. В исследование включено 370 пациентов. Больные были разделены на 3 группы: 1 группа — 190 человек, которые получали низкомолекулярный гепарин (НМГ); 2 группа — 123 человека, принимавшие нефракционированный гепарин (НФГ); 3 группа — 57 человек, принимавших прямые оральные антикоагулянты (ПОАК). Всем пациентам при поступлении и в конце стационарного лечения проводилась оценка общих лабораторных показателей, а также динамика специфических маркеров воспаления (IP-10 и MCP-1) и апоптоза тромбоцитов (фосфатидилсерин и кальретикулин) с июля 2021 по январь 2022 гг.

Результаты. Исследуемые группы в начале АКТ были сопоставимы по возрасту, степени тяжести COVID-19 и лабораторным показателям, которые имели высокие значения. У пациентов получавших НМГ (1 группа), наблюдается достоверное уменьшение специфических провоспалительных цитокинов (IP-10, MCP1), при этом показатели апоптоза увеличились к концу АКТ в стационаре. Во 2 группе (группа НФГ) среди специфических маркеров снижается только IP-10, а MCP-1, фосфатидилсерин и кальретикулин без динамики. В 3 группе пациентов, принимавших ПОАК, также наблюдается снижение уровня IP 10, а уровень MCP-1, фосфатидилсерина и кальретикулина без достоверных отличий от начала АКТ. При оценке частоты развития ВТЭО отмечено, что у пациентов получавших НФГ наблюдается высокая частота изолированной ТЭЛА без источника в нижних конечностях — 11,40% случаев, ТГВ и ТЭЛА с источником в нижних конечностях (6,5% и 6,5% случаев, соответственно), в сравнении с пациентами принимавших НМГ (1,6%, 1,1% и 0,5% случаев, соответственно).

Заключение. Исходный уровень изучаемых показателей у пациентов с COVID-19 имеет высокие значения. Снижению уровня провоспалительных маркеров (СРБ, ферритина, IP-10, MCP 1) и коагуляционных маркеров (Д-димера и фибриногена) наиболее выражено у пациентов получавших НМГ. Статистически значимое повышение маркеров апоптоза (фосфатидилсерина и кальретикулина) отмечены у пациентов, получавших профилактику ВТЭО низкомолекулярным гепарином.

Ключевые слова: венозные тромботические осложнения, антикоагулянтная терапия, коронавирусная инфекция, маркеры воспаления, апоптоз тромбоцитов.

Введение

Антикоагулянтная терапия (АКТ) имеет широкий диапазон применения в клинической практике, который захватывает практически любой раздел медицины [1]. Кроме лечебной цели, она также выполняет задачу профилактики венозных тромботических осложнений

ANALYSIS OF INFLAMMATORY MARKERS AND PLATELET APOPTOSIS MARKERS DURING ANTICOAGULANT THERAPY IN PATIENTS WITH COVID-19

Agapov A.B.^{1,2}, Kalinin R.E.¹, Mzhavanadze N.D.¹, Povarov V.O.¹, Nikiforov A.A.¹, Maksaeov D.A.^{1,3}, Chobanyan A.A.³, Suchkov I.A.*¹

¹ Ryazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlova, Ryazan

² Regional Clinical Hospital, Ryazan

³ City Clinical Hospital of Emergency Medical Care, Ryazan

Abstract. Purpose of the study: to analyze the inflammatory markers MCP1, IP 10 and platelet apoptosis markers phosphatidylserine and calreticulin during anticoagulant therapy (ACT) in patients with COVID-19.

Material and methods. The study included 370 patients. The patients were divided into 3 groups: group 1 — 190 people who received low molecular weight heparin (LMWH); Group 2 — 123 people taking unfractionated heparin (UFH); Group 3 — 57 people taking direct oral anticoagulants (DOACs). All patients upon admission and at the end of hospital treatment were assessed for general laboratory parameters, as well as the dynamics of specific markers of inflammation (IP-10 and MCP-1) and platelet apoptosis (phosphatidylserine and calreticulin) from July 2021 to January 2022.

Results. The study groups at the beginning of ACT were comparable in age, severity of COVID-19 and laboratory parameters, which had high values. In patients receiving LMWH (group 1), there was a significant decrease in specific pro-inflammatory cytokines (IP-10, MCP1), while apoptosis rates increased by the end of ACT in the hospital. In group 2 (UFH group), among specific markers, only IP-10 decreased, and MCP-1, phosphatidylserine and calreticulin showed no changes. In group 3 of patients taking DOACs, there was also a decrease in the level of IP 10, and the levels of MCP-1, phosphatidylserine and calreticulin were without significant differences from the start of ACT. When assessing the incidence of VTEC development, it was noted that in patients receiving UFH there was a high incidence of isolated PE without a source in the lower extremities — 11.40% of cases, DVT and PE with a source in the lower extremities (6.5% and 6.5% of cases, respectively), in comparison with patients taking LMWH (1.6%, 1.1% and 0.5% of cases, respectively).

Conclusion. The initial level of the studied indicators in patients with COVID-19 has high values. The decrease in the level of pro-inflammatory markers (CRP, ferritin, IP-10, MCP 1) and coagulation markers (D-dimer and fibrinogen) was most pronounced in patients receiving LMWH. A statistically significant increase in apoptosis markers (phosphatidylserine and calreticulin) was observed in patients receiving VTEC prophylaxis with low molecular weight heparin.

Keywords: venous thrombotic complications, anticoagulant therapy, coronavirus infection, inflammatory markers, platelet apoptosis.

(ВТЭО) при различных факторах риска в травматологии и ортопедии, акушерстве и гинекологии и т.д. [2].

Но иногда в организме возникают совсем нестандартные явления, связанные с развитием тромбоза, которые могут быть вызваны выраженным воспалительным процессом [3]. Тогда механизм тромбообразования может

* e-mail: suchkov_med@mail.ru

быть заключен в единую систему гиперовоспалительного ответа, который возник при атаке других видов живой природы на организм человека [4].

Пандемия COVID-19 преподнесла научному сообществу возможность изучения новых представлений о развитии тромбозов и эффективности применения известных вариантов АКТ у больных коронавирусной инфекцией [5]. Исследование COVID-19 ассоциированного тромбоза должно проводиться не только с помощью стандартных тестов коагуляции и воспаления, но также затрагивать патофизиологические механизмы данного заболевания [6].

Особый интерес среди лабораторных маркеров представляют показатели, которые встречаются одновременно при воспалении и гиперкоагуляции. К ним относятся белок-хемоаттрактант моноцитов-1 (MCP-1) и индуцируемый интерфероном гамма-белок-10 (IP-10), которые являются воспалительными цитокинами, связанные с тромбозом [7]. Высокий уровень цитокина MCP-1 был обнаружен в плазме крови пациентов с венозным тромбозом, а высокая концентрация IP-10 наблюдалась при эндотелиальной дисфункции, а это в свою очередь является предиктором тромбообразования [8]. Z. Varga и соавт. подтвердили в своём исследовании наличие прямой вирусной инвазии вируса SARS-CoV-2 в эндотелиальные клетки, что приводит к диффузному воспалению эндотелия и апоптозу клеток [9]. Данный механизм приводит к повреждению тромбогенной базальной мембраны, что обуславливает активацию тромбоцитов и факторов свертывания.

При апоптозе возрастает концентрация кальретикулина и фосфатидилсерина, которые связаны кальций зависимым образом [10]. Фосфатидилсерин представляет собой белок, который может экспонироваться на поверхности тромбоцитов и при их активации, происходит выработка тромбина, способствующего свертыванию [11]. Кальретикулин является кальций связывающий белком, функциями которого являются шаперонная функция и регуляция кальциевого гомеостаза [12]. Кальретикулин способен связывать витамин К-зависимые факторы свертывания крови и ингибировать тромбоз, что было продемонстрировано в экспериментальной работе Kuwaba K. и соавторов на собачьей модели острой окклюзии коронарной артерии [13].

На основе способности IP-10, MCP-1, взаимодействовать как с тромбоцитическим, так и с воспалительным каскадами, а также возможности фосфатидилсерина и кальретикулина принимать участие в апоптозе клеток крови и активации тромбоцитов, в нашем исследовании мы провели анализ данных показателей при использовании различных антикоагулянтных препаратов у пациентов с COVID-19.

Цель исследования: провести анализ маркеров воспаления MCP1, IP 10 и маркеров апоптоза тромбоцитов фосфатидилсерина и кальретикулина при проведении антикоагулянтной терапии у пациентов с COVID-19.

Материал и методы

Проведено проспективное наблюдательное клиническое исследование, включившее 370 пациентов, среди которых 235 женщин и 135 мужчин в возрасте от 54 до 71 года с подтвержденным COVID-19. Клиническая часть исследования выполнена на базе ковидных госпиталей ГБУ Рязанской области «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» и ГБУ Рязанской области «Областная клиническая больница».

Больные разделены на 3 группы в зависимости от назначенного антикоагулянта: 1 группа — назначен низкомолекулярный гепарин (НМГ) — 190 человек; 2 группа — назначен нефракционированный гепарин (НФГ) — 123 человека; 3 группа — пациенты, постоянно принимавшие прямые оральные антикоагулянты (ПОАК) амбулаторно по поводу сопутствующих заболеваний сердечно-сосудистой системы (фибрилляция предсердий) — 57 человек.

Критерии включения:

- пациенты старше 18 лет с подтвержденной коронавирусной инфекцией;
- письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии не включения в исследование:

- возраст менее 18 лет;
- беременные женщины;
- крайне тяжелые, агонирующие пациенты;
- невозможность назначения АКТ.

У всех больных оценивали клинико-анамнестические данные (пол, возраст, степень тяжести COVID 19), проводили ультразвуковое дуплексное сканирование (УЗДС) вен нижних конечностей и лабораторные показатели при поступлении и при выписке из стационара.

Среди общих лабораторных анализов оценивались С-реактивный белок (СРБ), ферритин и прокальцитонин (ПКТ), уровень активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), международного нормализованного отношения (МНО), протромбинового времени (ПВ), фибриногена и Д-димера. Лабораторные исследования специфических маркеров воспаления и апоптоза выполнялись в Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ. Содержание MCP-1, IP-10, фосфатидилсерина и кальретикулина измеряли в сыворотке крови, которую получали центрифугированием 5 мл образца цельной крови и хранили при -80 °С до дальнейшего использования.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26. Для анализа качественных показателей применялись критерии Хи-квадрат Пирсона и Фишера. Оценка распределения количественных показателей проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка ($p > 0,05$).

Проведение исследования одобрено решением локального этического комитета в ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, протокол №3 от 11 октября 2021 г., и зарегистрировано на платформе ClinicalTrials.gov (идентификатор NCT05143567).

Результаты

Анализ возрастных категорий показал, что группы были сопоставимы по возрасту, объему вирусного поражения легких и степени тяжести COVID 19, но по гендерному признаку женщин было больше, чем мужчин (Табл. 1).

Сопутствующая патология в исследуемых группах представлена на рисунке 1, из которого следует что наибольшая частота заболеваний приходится на гипертоническую болезнь, ожирение и сахарный диабет.

Пациентов с ожирением, которые принимали ПОАК было мало (16% случаев), и в основном это были больные с ожирением 1 степени. В то же время при фибрилляции предсердий наблюдается обратная тенденция: данные пациенты (67% случаев) продолжали принимать ПОАК по поводу сопутствующей кардиологической патологии. Также обращает внимание, что у пациентов, получавших НМГ и НФГ (1 и 2 группы) были больные с ХЗВ (1 группа — 8,0% случаев, 2 группа — 16,0% случаев, $p = 0,03$), которые являются факторами риска ВТЭО.

При проведении АКТ у особо тяжелых пациентов, на фоне коронавирусной инфекции, наблюдалось ухудше-

ние состояния и данных больных переводили в отделение реанимации (Рис. 2). В реанимации пациентов переводили сначала на неинвазивную вентиляцию легких (НИВЛ), а при еще большем ухудшении состояния на ИВЛ. Перевод больного на ИВЛ сопровождался неблагоприятным прогнозом (100% летальность), и высокая частота смертности наблюдалась у пациентов получавших НФГ.

Табл. 1. Клинико-anamnestическая характеристика сравниваемых групп (Me(Q₁-Q₃))

Показатель	Группа НМГ (n = 190)	Группа НФГ (n = 123)	Группа ПОАК (n = 57)	p
Возраст	63 (56-70)	61 (50,5-68)	63 (52,5-71)	0,213
Пол n (%)				
- мужской	85 (4,7)	35 (28,2)	15 (26,8)	0,003
- женский	105 (55,3)	89 (71,8)	41 (73,2)	
Компьютерная томография, n (%)				
- 0	11 (5,8)	0 (0)	2 (3,6)	0,025
- 1	43 (22,6)	23 (18,5)	11 (19,6)	
- 2	81 (42,6)	53 (42,7)	17 (30,4)	
- 3	45 (23,7)	37 (29,8)	24 (42,9)	
- 4	10 (5,3)	11 (8,9)	2 (3,6)	
Степень тяжести COVID 19, n (%)				
- Легкая	21 (11,1)	6 (4,8)	7 (12,5)	0,021
- Средняя	94 (49,5)	50 (40,3)	19 (33,9)	
- Тяжелая	58 (30,5)	48 (38,7)	26 (46,4)	
- Крайне тяжелая	17 (8,9)	20 (16,1)	4 (7,1)	

Примечание: НМГ — низкомолекулярный гепарин, НФГ — нефракционированный гепарин, ПОАК — прямые оральные антикоагулянты.



Рис. 1. Сопутствующая патология в исследуемых группах. Примечание: различия по ожирению: * — $p < 0,001$, НМГ-НФГ $p = 0,764$, НМГ-ПОАК $p = 0,024$ *, НФГ-ПОАК $p < 0,001$. Различия по фибрилляции предсердий: * — $p < 0,001$ НФГ-НМГ $p = 0,924$, НМГ-ПОАК $p < 0,013$, НФГ-ПОАК $p = 0,017$. Различия по хроническим заболеваниям вен: * — $p < 0,001$, НМГ-НФГ $p = 0,671$, НМГ-ПОАК $p = 0,003$, НФГ-ПОАК $p = 0,002$ *.

Агапов А.Б., Калинин Р.Е., Мжаванадзе Н.Д. и др.
АНАЛИЗ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И МАРКЕРОВ АПОПТОЗА ТРОМБОЦИТОВ
ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

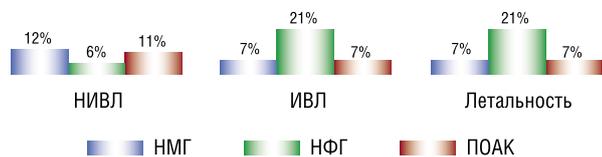


Рис. 2. Частота применения НИВЛ и ИВЛ в отделении реанимации и летальность в группах исследования. Примечание: НМГ — низкомолекулярный гепарин, НФГ — нефракционированный гепарин, ПОАК — прямые оральные антикоагулянты, НИВЛ — неинвазивная вентиляция легких, ИВЛ — инвазивная вентиляция легких.

Табл. 2. Динамика исследуемых показателей у пациентов группы НМГ

Показатель	VO (исх.)	V1	p
IP-10, пг/мл	344.45 (163.17–648.23)	36.07 (9.03–101.88)	<0.001*
МСР-1, пг/мл	95.9 (65.75–144.8)	61.3 (44.45–108.3)	<0.001*
Кальретикулин, пг/мл	5.33 (2.7–12.6)	5.26 (2.89–12.95)	0.698
Фосфатидилсерин, пг/мл	64.25 (44.63–86.5)	76.15 (56.25–110.55)	0.012*
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,77 (4,41–5,08)	4,52 (4,1–4,93)	0,065
Гемоглобин, г/л	135 (122–145)	127 (115–137)	0,091
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	6,7 (4,7–9,2)	5,18 (4,3–8,69)	<0,001*
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	189 (144–260)	219 (176–302,5)	0,009*
СОЭ, мм/ч	23 (11–33)	14 (6–20)	<0,001*
Глюкоза, ммоль/л	6,51 (5,7–7,96)	5,07 (4,86–8,5)	0,068
СРБ, мг/л	57,8 (24–101,3)	6,8 (1,7–15)	<0,001*
Ферритин, мкг/л	738 (210–967)	364 (324–497)	<0,001*
ПКТ, нг/мл	0,357 (0,348–0,469)	0,124 (0,054–0,364)	0,014*
АЧТВ, с	34,25 (25,9–36,8)	34,5 (26,3–36,95)	0,954
ПВ, с	13,2 (12,2–14,2)	12 (11,05–12,95)	0,076
Фибриноген, г/л	6,2 (5,4–6,8)	3,37 (2,8–4,92)	<0,001*
МНО	1,11 (1,03–1,2)	1,01 (0,95–1,09)	0,079
D-димер, нг/мл	0,68 (0,4–0,75)	0,42 (0,36–0,465)	0,016*

Примечание: НМГ — низкомолекулярный гепарин; НФГ — нефракционированный гепарин; IP-10 — интерферон-гамма-индуцированный белок-10; МСР-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; СРБ — С-реактивный белок; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; ПВ — протромбиновое время; МНО — международное нормализованное отношение; p — уровень значимости при сравнении средних значений исследуемых показателей в начале и конце терапии, полужирным шрифтом выделены значимые отличия.

Проведенный анализ динамики лабораторных показателей у пациентов, принимавших НМГ (1 группа), показал достоверное уменьшение концентрации общих и специфических провоспалительных маркеров: СРБ, ферритина, лейкоцитов, СОЭ, прокальцитонина, IP 10 и МСР1 (Табл. 2). Концентрация фосфатидилсерина увеличивается в конце АКТ, а уровень кальретикулина без достоверных отличий. В коагулограмме наблюдается снижение уровня фибриногена и D-димера.

Пациенты принимавшие НФГ (2 группа) характеризуются тем, что среди общих лабораторных показателей снижается только уровень СРБ и СОЭ, но уровень фер-

Табл. 3. Динамика исследуемых показателей у пациентов группы НФГ

Показатель	VO (исх.)	V1	p
IP-10, пг/мл	225.94 (86.93–490.45)	50.2 (22.99–112.28)	<0.001*
МСР-1, пг/мл	79.95 (50.7–125)	71.45 (47.2–112.9)	0.387
Кальретикулин, пг/мл	2.92 (1.78–4.46)	2.81 (1.01–4.51)	0.102
Фосфатидилсерин, пг/мл	66.7 (47.1–92.1)	55.75 (43.2–91.6)	0.346
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,7 (4,3–5,03)	4,5 (4,1–4,78)	0,073
Гемоглобин, г/л	138 (129–147)	130 (120–142)	0,127
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	6,8 (4,9–8,95)	10,5 (8,1–13,55)	<0,001*
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	195 (166,5–256,5)	258 (184–322,5)	0,013*
СОЭ, мм/ч	19 (8–33,5)	10 (2–22)	0,003*
Глюкоза, ммоль/л	7,32 (6,1–9,5)	9,3 (6,6–13,7)	0,003*
СРБ, мг/л	66,3 (38–126,9)	7,6 (4,05–13,35)	<0,001*
Ферритин, мкг/л	848 (596–953)	578,2 (367–986)	0,233
ПКТ, нг/мл	0,097 (0,07–0,173)	0,066 (0,05–0,174)	0,244
АЧТВ, с	33,75 (27,8–40,5)	29,6 (25,9–36,9)	0,635
ПВ, с	12,4 (11,2–13,4)	11,6 (10,85–12,7)	0,037*
Фибриноген, г/л	5,5 (3,28–5,55)	2,43 (1,9–3,52)	<0,001*
МНО	1,06 (0,98–1,14)	1 (0,93–1,08)	0,065
D-димер, нг/мл	0,62 (0,37–1,01)	0,48 (0,27–0,83)	0,429

Примечание: НМГ — низкомолекулярный гепарин; НФГ — нефракционированный гепарин; IP-10 — интерферон-гамма-индуцированный белок-10; МСР-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; СРБ — С-реактивный белок; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; ПВ — протромбиновое время; МНО — международное нормализованное отношение; p — уровень значимости при сравнении средних значений исследуемых показателей в начале и конце терапии, полужирным шрифтом выделены значимые отличия.

ритина и лейкоцитов без достоверных отличий (Табл. 3). Среди специфических маркеров снижается только IP 10, а МСР-1, фосфатидилсерин и кальретикулин без динамики. В коагулограмме наблюдается уменьшение протромбинового времени и фибриногена, но уровень D-димера достоверно не снижается.

У больных, продолжавших получать ПОАК (3 группа), отмечено снижение концентрации IP 10, СОЭ, СРБ и нарастание концентрации ферритина, D-димера (Табл. 4). Уровень МСР-1, фосфатидилсерина и кальретикулина у данных пациентов без достоверных отличий от начала АКТ. В коагулограмме наблюдается только нарастание концентрации D-димера к концу стационарного лечения.

Также проведен статистический анализ специфических маркеров воспаления и апоптоза между группами в конце стационарного лечения. Отмечено, что концентрация IP-10 меньше у пациентов, принимавших НМГ. По уровню МСР-1 в конце проведения АКТ достоверных отличий не получено. Значения кальретикулина и фосфатидилсерина высокие только у пациентов получавших НМГ.

Табл. 4. Динамика исследуемых показателей у пациентов группы ПОАК

Показатель	V0 (исх.)	V1	p
IP-10, пг/мл	228.35 (80.8–534.16)	39.24 (10.73–87.9)	<0.001*
МСП-1, пг/мл	76.15 (41–112.1)	58.25 (44.6–87.7)	0.124
Кальретикулин, пг/мл	3.61 (2.18–6.38)	3.38 (1.79–6.78)	0.783
Фосфатидилсерин, пг/мл	57.7 (42.8–80.02)	52.75 (42.6–86.4)	0.805
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,45 (4,2–4,83)	4,25 (4–4,64)	0,088
Гемоглобин, г/л	132 (125–139,5)	127 (120–135)	0,132
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	7,6 (5,35–11,65)	9,9 (7,59–11,8)	0,072
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	235,5 (174–322)	205 (177,5–307,5)	0,727
СОЭ, мм/ч	27 (15–43)	12,5 (2,5–23,5)	0,002*
Глюкоза, ммоль/л	7,55 (5,4–9,85)	9,45 (6,65–13,25)	0,036*
СРБ, мг/л	47,7 (17,2–104,4)	9,1 (4,55–19,65)	<0,001*
Ферритин, мкг/л	432,5 (278–884)	579 (402–952)	0,176
ПКТ, нг/мл	0,055 (0,04–0,145)	0,062 (0,045–0,085)	0,877
АЧТВ, с	30,9 (27,8–36,8)	27,3 (24,8–32,8)	0,104
ПВ, с	11,85 (10,9–13)	11,7 (10,9–12,6)	0,153
Фибриноген, г/л	4,4 (3–5,66)	4,1 (2,8–5,25)	0,075
МНО	1,06 (0,98–1,14)	1,05 (0,98–1,14)	0,143
D-димер, нг/мл	0,54 (0,39–0,84)	0,7 (0,415–0,9)	0,008*

Примечание: НМГ — низкомолекулярный гепарин; НФГ — нефракционированный гепарин; IP-10 — интерферон-гамма-индуцированный белок-10; МСП-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; СРБ — С-реактивный белок; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; ПВ — протромбиновое время; МНО — международное нормализованное отношение; p — уровень значимости при сравнении средних значений исследуемых показателей в начале и конце терапии, полужирным шрифтом выделены значимые отличия.

Анализ частоты развития ВТЭО показал, что во 2 группе имеет место высокая частота тромбоза легочных артерий de novo без источника в нижних конечностях — 11,40% случаев, которая была выявлена у умерших больных по данным аутопсии (Рис. 2). Также у пациентов, принимавших НФГ, имеет место высокая частота развития ТГВ и ТЭЛА с источником в нижних конечностях, по сравнению с пациентами, принимавших НМГ и ПОАК.

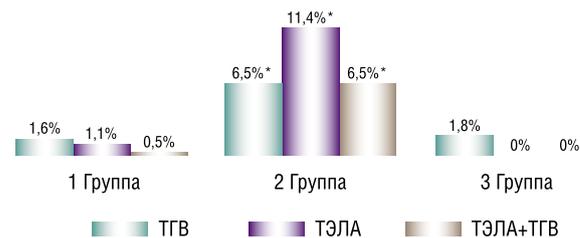
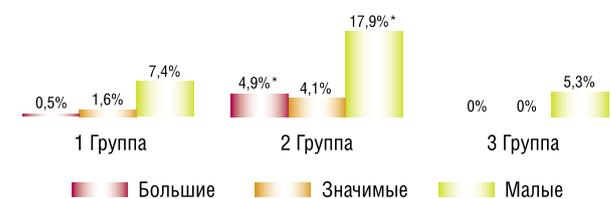
При анализе кровотечений наблюдается высокая частота возникновения фатальных больших кровотечений у пациентов, принимавших НФГ (2 группа) и представлены большими желудочно-кишечными, бронхиальными кровотечениями (Рис. 4).

Для оценки прогностической эффективности исследуемых параметров, мы связали полученные результаты тромботических осложнений, варианты АКТ, клинико-анамнестические данные и специфические маркеры. Методом логистической регрессии и ROC анализом установлено, что значение исходного уровня МСП-1 больше 90 пг/л повышает шансы развития ТЭЛА в 10,742 (1,135–101,647) раз ($p = 0,038$). Наличие ТГВ у пациента повышает шансы развития ТЭЛА в 15,757 (2,614–94,984)

Табл. 5. Межгрупповое сравнение лабораторных показателей в конце стационарного лечения (Ме(Q₁–Q₃))

Показатель	Группа НМГ (n = 190)	Группа НФГ (n = 123)	Группа ПОАК (n = 56)	p
IP-10, пг/мл	36.07 (9.03–101.88)	50.2 (22.99–112.28)	39.24 (10.73–87.9)	p = 0.048* НМГ–НФГ p = 0.005* НМГ–ПОАК p = 0.176 НФГ–ПОАК p = 1
МСП-1, пг/мл	61.3 (44.45–108.3)	71.45 (47.2–112.9)	58.25 (44.6–87.7)	p = 0.348
Кальретикулин, пг/мл	5.26 (2.89–12.95)	2.81 (1.01–4.51)	3.38 (1.79–6.78)	p < 0.001* НМГ–НФГ p < 0.001* НМГ–ПОАК p = 0.024* НФГ–ПОАК p = 0.764
Фосфатидилсерин, пг/мл	76.15 (56.25–110.55)	55.75 (43.2–91.6)	52.75 (42.6–86.4)	p = 0.001* НМГ–НФГ p = 0.021* НМГ–ПОАК p = 0.005 НФГ–ПОАК p = 0.913

Примечание: НМГ — низкомолекулярный гепарин, НФГ — нефракционированный гепарин, ПОАК — прямые оральные антикоагулянты, IP-10 — интерферон-гамма-индуцированный белок-10; МСП-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок-1.

Рис. 3. Частота ВТЭО в исследуемых группах (* — $p < 0,05$).Рис. 4. Частота различных вариантов кровотечений в исследуемых группах (* — $p < 0,05$).

раз ($p = 0,003$). Применение НФГ вместо НМГ или ПОАК повышает шансы развития ТЭЛА в 9,741 (1,088–87,213) раз ($p = 0,042$). Наличие ожирения повышает шансы развития ТЭЛА в 1,948 (1,001–3,791) раз ($p = 0,0495$). Площадь под ROC-кривой составила $0,895 \pm 0,06$ с 95% ДИ: 0,777–1. При пороге классификации 0,07388 чувствительность 75%, специфичность — 95% (Рис. 5).

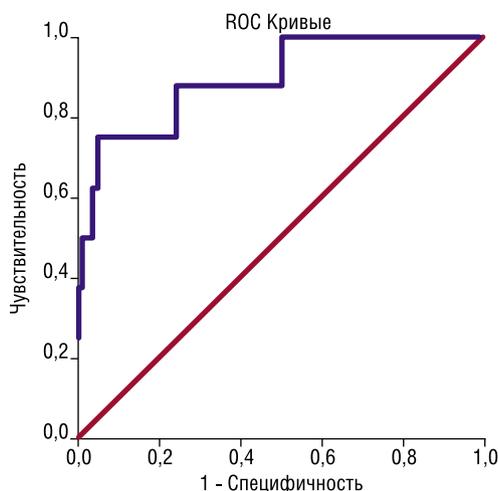


Рис. 5. Проверка прогностической модели прогнозирования ТЭЛА основанная на исходном уровне МСР1, наличии ТГВ, варианта антикоагулянтной терапии, наличия ожирения методом ROC-анализа.

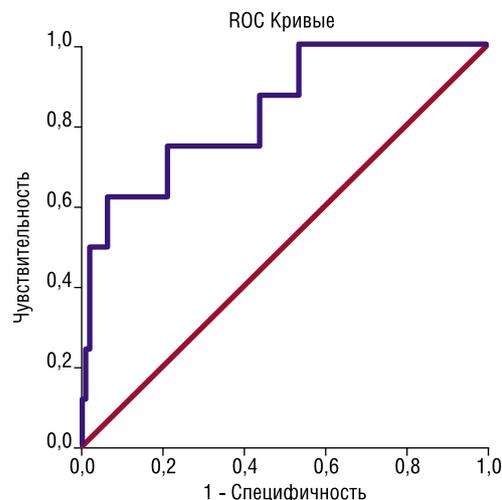


Рис. 6. Проверка прогностической модели прогнозирования ТЭЛА основанная на исходном уровне IP 10, наличии ТГВ, ожирения методом ROC-анализа.

Другая модель прогнозирования ТЭЛА основана на исходном уровне IP-10, наличии ТГВ у пациента, наличии ожирения у пациента с НКИ. Повышение исходного уровня интерферона на 700 пг/мл повышает шансы развития ТЭЛА в 7,936 (2,066-30,3) раз ($p = 0,003$). Наличие ТГВ у пациента повышает шансы развития ТЭЛА в 15,757 (2,614-94,984) раз ($p = 0,003$). Применение НФГ вместо НМГ или ПОАК повышает шансы развития ТЭЛА в 9,741 (1,088-87,213) раз ($p = 0,042$). Площадь под ROC-кривой составила $0,843 \pm 0,072$ с 95% ДИ: 0,702-0,983. При пороге классификации 0,1142 чувствительность 62,5%, специфичность — 93,9% (Рис. 6).

Другая модель основана на маркере апоптоза тромбоцитов, наличии факторов риска ВТЭО и применение ИВЛ. Методом логистической регрессии и ROC анализом установлено, что повышение исходного уровня фосфатидилсерина выше 62,75 пг/мл снижает шансы развития ВТЭО в 1,033 (1,005-1,062) раз ($p = 0,02$). Наличие ХЗВ у пациента повышает шансы развития ВТЭО в 9,015 (2,784-29,191) раз ($p < 0,001$). Применение ИВЛ у пациента повышает шансы развития ВТЭО в 7,925 (2,397-24,377) раз ($p = 0,02$). Площадь под ROC-кривой составила $0,858 \pm 0,056$ с 95% ДИ: 0,748-0,968. Значимость модели — $< 0,001$ (Рис. 7). При пороге классификации 0,072 чувствительность 75%, специфичность — 89,2%.

Обсуждение

Данные литературы указывают на высокую частоту развития ВТЭО при коронавирусной инфекции. Поэтому COVID-19-ассоциированный тромбоз можно назвать «сателлитом» инфекции SARS-CoV-2, который может сопровождать ее и после выписки из стационара. При этом особенностью данного инфекционного заболевания, является то, что ТЭЛА не всегда является осложнением ТГВ, а может встречаться первично в легочных артериях и быть тромбозом de novo [15]. По данным нашего ис-

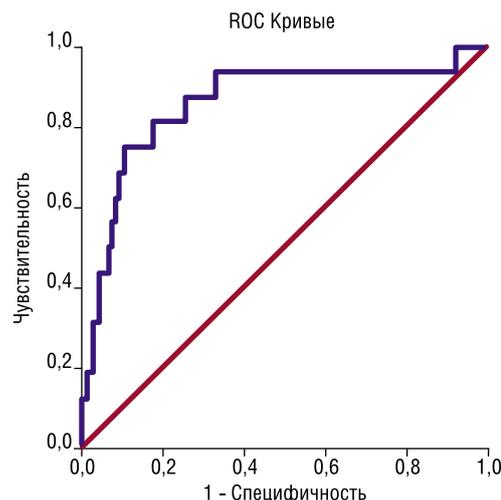


Рис. 7. Проверка прогностической модели прогнозирования ВТЭО основанная на исходном уровне фосфатидилсерина, наличии хронических заболеваний вен и применения искусственной вентиляции легких методом ROC-анализа.

следования, высокая частота ТЭЛА de novo отмечена у пациентов, получавших НФГ — 11,40% случаев, по сравнению с пациентами, принимавших НМГ — 1,1% и ПОАК — 0% ($p < 0,05$).

Данные систематического обзора показывают, что частота развития ВТЭО больше в отделении реанимации, чем в стационаре. Так, например, в стационаре частота ТГВ составляет 20% случаев, ТЭЛА — 13% случаев, а в отделении реанимации частота данных осложнений растет до 28% случаев ТГВ и 19% случаев ТЭЛА [16]. По результатам нашего исследования перевод больного в реанимацию на ИВЛ из-за прогрессирования вирусного поражения легких, сопровождался 100% летальностью. Таким образом, тромботические события, возникающие при коронавирусной инфекции опосредованы COVID-

19-ассоциированным гипервоспалительным синдромом, поэтому мы оценили взаимосвязь между воспалением и тромбозом, проанализировав динамику маркеров воспаления и апоптоза при использовании различных вариантов АКТ.

По данным нашего исследования в начале АКТ имеет место высокая концентрация провоспалительных показателей (СРБ, МСР-1, IP-10, ферритин, прокальцитонина, лейкоцитов) и коагуляционных маркеров (Д-димер, фибриноген). В конце АКТ наблюдается статистически достоверное увеличение концентрации фосфатидилсерина у пациентов, получавших НМГ, который является проапоптотическим белком, обладающим мощным прокоагулянтным потенциалом. Также следует отметить, что при высоких концентрациях данного показателя у пациентов получавших НМГ имеет место низкая частота ТГВ в сравнении с пациентами на НФГ (1,6% случаев против 6,5% случаев соответственно, $p < 0,05$) и аналогично низкая частота ТЭЛА (1,1% случаев против 11,45% случаев соответственно, $p < 0,05$). Также в конце АКТ у пациентов, получавших НМГ (1 группа) повышается концентрация кальретикулина, который является кальций-зависимым белком с антикоагулянтной активностью. Таким образом, у пациентов с низкой частотой ВТЭО (1 группа) имеет место увеличение концентрации как антиапоптотического белка, так и проапоптотического. Данный феномен можно объяснить тем, что наличие инициаторов апоптоза, необходимых для поддержания активности данного процесса, сопряжено с существованием факторов, препятствующих его развитию. К их числу относится влияние антиапоптотических белков (Bcl-2) и кальретикулина.

Полученный результат вводит в диссонанс касаясь взаимосвязи апоптоза тромбоцитов и тромбоза, однако если рассмотреть лабораторные показатели в совокупности, которые отражают воспаление и коагуляцию, то становится очевидным, что при COVID-19 возникает целая серия взаимосвязанных процессов, которые могут повлиять на развитие ВТЭО.

Динамика маркеров воспаления МСР-1 и IP-10 показывает то, что они снижаются совместно с общими показателями воспаления и коагуляции у пациентов, получавших терапию НМГ, эффективностью которой является низкая частота ВТЭО за весь период стационарного лечения. Диагностическая и прогностическая значимость данных маркеров отображена в литературных данных. МСР-1 экспрессируется макрофагами в ответ на действие широкого спектра цитокинов, но может также продуцироваться и фибробластами, эндотелиальными клетками [17]. IP-10 представляет собой белок, секретлируемый моноцитами, эндотелиальными клетками, также в ответ на воспаление. IP-10 угнетает восстановление эндотелия при наличии любого воспалительного фактора, что объясняет распространенный эндотелиит, который наблюдается у пациентов с тяжелой и критической стадией COVID-19 [18]. По данным Yu Chen и соавторов уровень IP-10 и МСР-1 в сыворотке крови пациентов с крайне тяжелой

степенью коронавирусной инфекции был выше, чем у пациентов с тяжелой степенью COVID-19, что доказывает, что IP-10 и МСР-1 являются биомаркерами, связанными с тяжестью заболевания. Кроме того, авторами установлено, что уровень IP-10 и МСР-1 был высоким у пациентов с повышенным уровнем Д-димера по сравнению с пациентами с низким уровнем Д-димера, следовательно, IP-10 и МСР-1 могут быть связаны с риском возникновения тромбоза у пациентов с COVID-19 [19].

Возвращаясь к АКТ следует отметить то, что НМГ имеют способность связываться с Р- и L-селектином и различными цитокинами: интерлейкином 8 — IL-8, NAP-2, MIP-1a, и в том числе МСР-1 [20–21]. Это подтверждено в нашем исследовании, когда у пациентов, принимавших НМГ, наблюдается статистически достоверное снижение концентрации МСР-1, а у пациентов принимавших НФГ и ПОАК уровень показателя был без тенденции к снижению. При этом данная динамика происходила при снижении уровня СРБ и ферритина у всех пациентов, но наиболее низкие концентрации общих воспалительных маркеров наблюдались у пациентов, получавших НМГ.

Таким образом, динамика специфических маркеров воспаления и апоптоза отражают сложный механизм нового патологического процесса — COVID-19-ассоциированного тромбоза и указывают на то, что этот процесс требует многостороннего подхода к пониманию возникновения тромботических осложнений. Однако, все эти сложные механизмы происходят с пациентами имеющие ранее известные факторы риска ВТЭО и сопутствующие заболевания, которые в совокупности с лабораторными показателями и вариантами АКТ нашли отражение в наших прогностических моделях возникновения ВТЭО. К таким факторам относятся ожирение, наличие ХЗВ, применение ИВЛ, которые в свое время также были выделены учеными как причина ВТЭО.

Заключение

Исходный уровень маркеров воспаления и апоптоза тромбоцитов у пациентов с COVID-19 имеет высокие значения, что обусловлено несколькими патофизиологическими процессами происходящими при гипервоспалительном ответе организма на вирус. Снижению уровня провоспалительных маркеров СРБ, ферритина, IP-10, МСР 1 и коагуляционных маркеров (Д-димера и фибриногена) наиболее выражено у пациентов получавших НМГ. Повышение исходного уровня МСР-1 больше 90 пг/л повышает шансы развития ТЭЛА в 10,742 (1,135-101,647) раз ($p = 0,038$), а увеличение концентрации IP 10 на 700 пг/мл повышает шансы развития ТЭЛА в 7,936 (2,066-30,3) раз ($p = 0,003$). Статистически значимое повышение маркеров апоптоза (фосфатидилсерина и кальретикулина) отмечены у пациентов, получавших профилактику ВТЭО низкомолекулярным гепарином. Повышение исходного уровня фосфатидилсерина выше 62,75 пг/мл снижает шансы развития ВТЭО в 1,033 (1,005-1,062) раз ($p = 0,02$).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов (The authors declare no conflict of interest).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Агапов А.Б. и др. Анализ факторов риска венозных тромбозмобилических осложнений и различных вариантов антикоагулянтной терапии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. — 2023. — №31(2). — С.243-50. [Kalinin R.E., Suchkov I.A., Agapov A.B. et al. Analysis of risk factors for venous thromboembolic complications and different variants of anticoagulant therapy in patients with novel coronavirus infection. *Rossiiskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2023; 31(2): 243-50. (In Russ.)] doi: 10.17816/PAVLOVJ110956.
2. Селиверстов Е.И., Лобастов К.В., Илюхин Е.А. и др. Профилактика, диагностика и лечение тромбоза глубоких вен. Рекомендации российских экспертов // Флебология. — 2023. — №17(3). — С.152-296. [Seliverstov EI, Lobastov KV, Ilyukhin EA, et al. Prevention, Diagnostics and Treatment of Deep Vein Thrombosis. *Russian Experts Consensus. Flebologiya*. 2023; 17(3): 152-296. (In Russ.)] doi: 10.17116/flebo202317031152.
3. Бородин И.А., Селезнева И.А., Борисова О.В. и др. Группы крови и секреторное состояние при COVID-19 // Наука молодых (Eruditio Juvenium). — 2021. — №9(4). — С.589-96. [Borodina IA, Selezneva IA, Borisova OV, et al. Blood groups and secretory state in COVID-19. *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium)*. 2021; 9(4): 589-596. (In Russ.)] doi: 10.23888/HMJ202194589-596.
4. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020; 8(4): 420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
5. Wang T, Chen R, Liu C, Liang W, Guan W, Tang R, et al. Attention should be paid to venous thromboembolism prophylaxis in the management of COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020; 7: e362-3. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30109-5.
6. 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): 1135-1140. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5.
7. Mercier O, Arthur Ataam J, Langer NB, Dorfmueller P, Lamrani L, Lecerf F, et al. Abnormal pulmonary endothelial cells may underlie the enigmatic pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2017; 36(3): 305-14.
8. Lupieri A, Smirnova NF, Solinac R, Malet N, Benamar M, Saoudi A, et al. Smooth muscle cells-derived CXCL10 prevents endothelial healing through PI3K γ -dependent T cells response. *Cardiovasc Res*. 2020; 116: 438-49. doi: 10.1093/CVR/CVZ122.
9. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, Mehra MR, Schuepbach RA, Ruschitzka F, Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020; 395(10234): 1417-1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
10. Dai E, Stewart M, Ritchie B, Mesaali N, et al. Calreticulin, a potential vascular regulatory protein, reduces intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(11): 2359-68. doi: 10.1161/01.atv.17.11.2359.
11. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex. *Blood*. 2004; 103(4): 1192-201. doi: 10.1182/blood-2003-05-1551.
12. Zimmerman KA, Xing D, Pallero MA, Lu A, et al. Calreticulin Regulates Neointima Formation and Collagen Deposition following Carotid Artery Ligation. *J Vasc Res*. 2015; 52(5): 306-20. doi: 10.1159/000443884.
13. Kuwabara K, Pinsky DJ, Schmidt AM, et al. Calreticulin, an antithrombotic agent which binds to vitamin K-dependent coagulation factors, stimulates endothelial nitric oxide production, and limits thrombosis in canine coronary arteries. *J Biol Chem*. 1995; 270(14): 8179-87. doi: 10.1074/jbc.270.14.8179.
14. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 14 (27.12.2021). М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2021. — 233с. Доступно по: https://static.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/041/original/BMP_COVID-19_V14_27-12-2021.pdf. Ссылка действительна на 20.06.2023. [Interim guidelines. Prevention, diagnosis and treatment of novel coronavirus infection (COVID-19). Version 14 (27.12.2021). Moscow: Ministerstvo zdravooohraneniya Rossijskoj Federacii, 2021. 233 pp. Available at: https://static.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/041/original/BMP_COVID-19_V14_27-12-2021.pdf. Accessed: 20.06.2023. (In Russ.)]
15. Morici N, Podda G, Bircocchi S, et al. Enoxaparin for thromboprophylaxis in hospitalized COVID-19 patients: The X-COVID-19 Randomized Trial. *Eur J Clin Invest*. 2022; 52(5): e13735. doi: 10.1111/eci.13735.
16. Cui S, Chen S, Li X, et al. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(6): 1421-4. doi: 10.1111/jth.14830.
17. Van Den Borne P, Quax PHA, Hoefer IE, Pasterkamp G. The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *BioMed Res Int*. 2014; 893106. doi: 10.1155/2014/893106.
18. Mir Seyed Nazari P, Marosi C, Moik F, et al. Low systemic levels of chemokine C-C motif ligand 3 (CCL3) are associated with a high risk of venous thromboembolism in patients with glioma. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(12): 2020. doi: 10.3390/cancers11122020.
19. Chen Y, Wang J, Liu C, et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Molecular Medicine*. 2020; 26(1). doi: 10.1186/s10020-020-00230-x.
20. Walenga JM, Jackson CM, Kessler CM. Low molecular weight heparins differ substantially: impact on developing biosimilar drugs. *Semin Thromb Hemost*. 2011; 37(3): 322-327. doi: 10.1055/s-0031-1274515.
21. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Агапов А.Б., Мжаванадзе Н.Д., Максаев Д.А., Чобанян А.А. Коагулопатия и факторы риска у пациентов с тяжёлой степенью COVID-19 // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2022. — №4. — С.64-74. [Kalinin RE, Suchkov IA, Agapov AB, Mzhavanadze ND, Maksaev DA, Chobanyan AA. Coagulopathy and risk factors in patients with severe COVID-19. *Thrombosis, hemostasis and rheology*. 2022; 4: 64-74. (In Russ.)] doi: 10.25555/THR.2022.4.1042.