



© CC Коллектив авторов, 2022
УДК [578.834.1:616-005.1-08] : 530.145.6
DOI: 10.24884/1607-4181-2022-29-1-28-36

О. В. Сироткина¹⁻³, А. С. Улитина^{1*}, Д. Г. Кулабухова^{1,2}, М. А. Николаев^{1,2},
А. Д. Изюмченко², Л. А. Гараева², И. В. Шлык¹, Е. Г. Гаврилова¹, Ю. С. Полушин¹,
С. Н. Пчелина^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

КОРРЕЛЯЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ И РАЗМЕРОМ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

Поступила в редакцию 13.04.2022 г.; принята к печати 27.04.2022 г.

Резюме

Введение. В последние годы большое внимание уделяется изучению внеклеточных микрочастиц — микровезикул и экзосом — и их роли в патогенезе заболеваний человека.

Цель — проанализировать количество и размеры внеклеточных микрочастиц плазмы крови (ВМЧПК) у пациентов с COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения и сопоставить эти параметры с лабораторными маркерами активации гемостаза, воспаления и повреждения тканей.

Методы и материалы. В исследование были включены 29 пациентов с COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения. Концентрацию и размеры ВМЧПК определяли методом анализа траекторий наночастиц (nanoparticle trajectory analysis, NTA). Пациентам выполняли общий клинический анализ крови и тромбоэластометрию (ТЭМ), а также оценивали в крови коагулологические, биохимические и иммунологические показатели, включая фибриноген, протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, D-димер, С-реактивный белок, лактатдегидрогеназу, прокальцитонин, антиген фактора Виллебранда, интерлейкины-6 и -18.

Результаты. Были выписаны из отделения реанимации и интенсивной терапии с улучшением 14 (48,3%) пациентов (группа 1 — выжившие), а 15 (51,7%) пациентов умерли (группа 2 — летальный исход); концентрация ВМЧПК между этими группами не различалась. В группе 2 была выявлена гетерогенность размера ВМЧПК, а также тенденция к увеличению размера ВМЧПК ($p = 0,074$). Среди всех обследованных пациентов концентрация ВМЧПК обратно коррелировала с протромбиновым временем и числом крупных тромбоцитов, а размер ВМЧПК обратно коррелировал с уровнем антигена фактора Виллебранда и имел прямую корреляцию с фибриногеном. В группе 1 концентрация ВМЧПК имела прямую корреляцию с интерлейкином-18 и максимальным лизисом тромба при ТЭМ, а размер ВМЧПК прямо коррелировал с максимальным лизисом тромба при ТЭМ и обратно коррелировал с прокальцитонином и максимальной плотностью сгустка при ТЭМ.

Заключение. Проведенное исследование подтверждает важность процесса образования внеклеточных микрочастиц в патогенезе новой коронавирусной инфекции (COVID-19) и согласуется с гипотезой о том, что параметры пула ВМЧПК могут являться прогностическими биомаркерами степени тяжести COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, новая коронавирусная инфекция, внеклеточные микрочастицы, экзосомы, система свертывания крови, система гемостаза

Для цитирования: Сироткина О. В., Улитина А. С., Кулабухова Д. Г., Николаев М. А., Изюмченко А. Д., Гараева Л. А., Шлык И. В., Гаврилова Е. Г., Полушин Ю. С., Пчелина С. Н. Корреляция лабораторных маркеров активации системы гемостаза с концентрацией и размером внеклеточных микрочастиц плазмы крови у пациентов с COVID-19. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2022;29(1):28–36. DOI: 10.24884/1607-4181-2022-29-1-28-36.

* Автор для связи: Анна Сергеевна Улитина, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8. E-mail: anna.s.ulitina@yandex.ru.

Olga V. Sirotkina¹⁻³, Anna S. Ulitina^{1*}, Darya G. Kulabukhova^{1,2}, Mikhail A. Nikolaev^{1,2}, Artem D. Izumchenko², Luiza A. Garaeva², Irina V. Shlyk¹, Elena G. Gavrilo¹, Yury S. Polushin¹, Sofya N. Pchelina^{1,2}

¹ Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

² Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia

³ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

CORRELATION OF LABORATORY MARKERS OF HEMOSTATIC SYSTEM ACTIVATION WITH CONCENTRATION AND SIZE OF PLASMA EXTRACELLULAR MICROPARTICLES IN PATIENTS WITH COVID-19

Received 13.04.2022; accepted 27.04.2022

Summary

Introduction. In recent years, much attention has been paid to the study of extracellular microparticles (microvesicles and exosomes) and their role in the pathogenesis of human diseases.

The objective of this study was to determine the number and size of plasma extracellular microparticles (PEMP) in patients with severe and extremely severe COVID-19 and correlate these data with the markers of hemostasis activation, inflammation, and tissue damage.

Methods and Materials. The study included 29 patients with severe and extremely severe COVID-19. Concentration and size of PEMP were determined by nanoparticle trajectory analysis (NTA). All patients underwent the complete blood count and the thromboelastometry (TEM). Hemostatic, biochemical, and immunological parameters were assessed including fibrinogen, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, D-dimer, C-reactive protein, lactate dehydrogenase, procalcitonin, von Willebrand factor antigen, interleukin 6, and interleukin 18.

Results. There were 14 patients (48.3 %) discharged from the ICU with improvement (group 1 – survived patients), and 15 patients (51.7 %) with lethal outcomes (group 2 – lethal outcome); the PEMP concentration did not differ between these groups. In group 2, there were heterogeneity of PEMP population, and a tendency to the larger PEMP size ($p=0.074$). In all patients, the PEMP concentration correlated negatively with both prothrombin time and the number of large platelets; the size of PEMP correlated negatively with the level of von Willebrand factor antigen, and positively with the fibrinogen. In group 1, the PEMP concentration had a direct correlation with both the level of interleukin 18 and maximum clot lysis in TEM; the PEMP size had a direct correlation with the maximum clot lysis in TEM and an inverse correlation with both the level of procalcitonin and maximum clot density in TEM.

Conclusion. Our study confirms the importance of the process of extracellular microparticles formation in the COVID-19 pathogenesis. Our findings are consistent with the hypothesis that the parameters of PEMP population can be predictive biomarkers of the COVID-19 severity.

Keywords: COVID-19, novel coronavirus infection, extracellular microparticles, exosomes, blood coagulation system, hemostatic system

For citation: Sirotkina O. V., Ulitina A. S., Kulabukhova D. G., Nikolaev M. A., Izumchenko A. D., Garaeva L. A., Shlyk I. V., Gavrilo¹ E. G., Polushin Yu. S., Pchelina S. N. Correlation of laboratory markers of hemostatic system activation with concentration and size of plasma extracellular microparticles in patients with COVID-19. *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2022;29(1):28–36. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2022-29-1-28-36.

* **Corresponding author:** Anna S. Ulitina, Pavlov University, 6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022, Russia. E-mail: anna.s.ulitina@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большое внимание уделяется изучению внеклеточных микрочастиц — микровезикул и экзосом — и их роли в патогенезе различных заболеваний человека, таких как сердечно-сосудистая патология, нейродегенеративные процессы, онкопатология, гематологические синдромы, воспалительные заболевания [1]. Многие исследования посвящены анализу внеклеточных микрочастиц у пациентов с инфекционными заболеваниями, в том числе вызываемыми вирусом иммунодефицита человека (HIV-1), герпесвирусами (EBV, HSV-1, CMV), вирусом гепатита С (HCV), коронавирусами (MERS-CoV, SARC-CoV, SARS-CoV-2) [2, 3]. С начала пандемии новой коронавирусной инфекции внеклеточные микрочастицы плазмы крови (ВМЧПК) у пациентов с COVID-19 обсуждаются как с точки зрения

их инфекционной опасности, промотирования заражения и распространения коронавирусной инфекции [2], так и как потенциальные терапевтические агенты [4–6]. Ранее мы показали увеличение количества ВМЧПК тромбоцитарного и лейкоцитарного происхождения у пациентов с COVID-19, госпитализированных в состоянии средней тяжести [7, 8]. Одним из патогенетических механизмов развития осложнений при COVID-19 выступает активация системы свертывания крови. Коагулопатия при коронавирусной инфекции включает в себя активацию клеток крови вследствие цитокинового шторма, образование экстрацеллюлярных нейтрофильных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs), высвобождение тканевого фактора и активацию гемостаза [9]. В настоящее время доказано, что активированные лейкоциты, тромбоциты, эритроциты и эндотелиоциты могут

Таблица 1

Общая характеристика обследованных пациентов с COVID-19

Table 1

General characteristic of the examined patients with COVID-19

Параметр	Группа 1, выжившие (n = 14)	Группа 2, летальный исход (n = 15)	p
Мужчины/женщины	10/4	12/3	0,682
Возраст, лет	(59,6±8,8)	(59,5±11,4)	0,977
Шкала SOFA при поступлении, баллы	3 [2; 3]	3 [2; 4]	0,482
Степень поражения легких на момент начала госпитализации, по данным компьютерной томографии	3 [3; 4]	3 [2; 4]	0,983
Искусственная вентиляция легких, ч	0 [0; 30]	145 [107; 289]	<0,001
Длительность госпитализации, дни	20 [14; 25]	15 [11; 29]	0,533
Концентрация ВМЧПК, ·10 ¹³ /мл	6,1 [4,9; 9,1]	6,4 [1,6; 9,0]	0,683
Размер ВМЧПК, нм	94,0 [85,0; 99,7]	100,0 [96,0; 104,3]	0,074

Примечание: SOFA – sequential organ failure assessment.

формировать пул ВМЧПК, участвующих в передаче сигнальных молекул от клетки к клетке [10, 11]; при этом обсуждается, что маркерами тяжести течения COVID-19 могут выступать показатели гемостаза (протромбиновое время (ПВ), международное нормализованное отношение (МНО), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), D-димер, фибриноген, количество тромбоцитов) и провоспалительные белки (С-реактивный белок, интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-18 (ИЛ-18), прокальцитонин, лактатдегидрогеназа) [12].

Принимая во внимание все вышеизложенное, мы выполнили данную работу с целью анализа количества и размеров ВМЧПК у пациентов с COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения и сопоставления этих параметров с лабораторными маркерами активации гемостаза, воспаления и повреждения тканей.

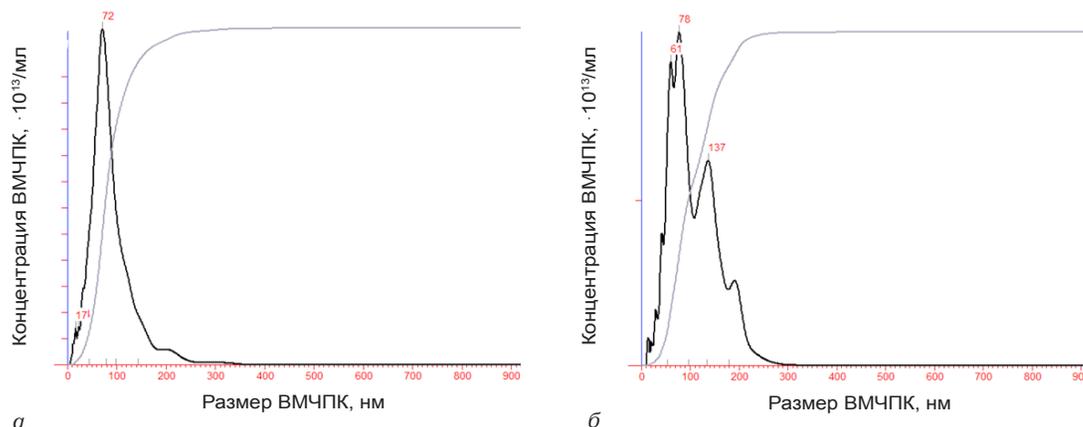
МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

В исследование были включены 29 пациентов с COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) ПСПбГМУ им. И. П. Павлова в период с ноября по декабрь 2020 г., из них 22 (75,9%) мужчины и 7 (24,1%) женщин в возрасте от 38 до 75 лет (средний возраст – (59,6±10,0) года). Участникам исследования при поступлении в ОРИТ выполняли общий клинический анализ крови и тромбоэластометрию (ТЭМ), а также оценивали в крови коагулологические, биохимические и иммунологические показатели, включая фибриноген, С-реактивный белок, лактатдегидрогеназу, прокальцитонин, ПВ, АЧТВ, D-димер, антиген фактора Виллебранда, ИЛ-6, ИЛ-18.

Концентрацию и размеры ВМЧПК определяли при поступлении пациента в ОРИТ методом

анализа траекторий наночастиц (nanoparticle trajectory analysis, NTA). Для этого плазму периферической крови, полученную путем центрифугирования 4 мл цельной венозной крови в течение 20 мин при 2000 g при комнатной температуре, подвергали последовательному ультрацентрифугированию по протоколу, описанному ранее [13]: центрифугировали 1 ч при 4 °C при 16 000 g для удаления клеточного дебриса, далее супернатант смешивали с фосфатным буферным солевым раствором (PBS) в соотношении 1:1 и центрифугировали 2 ч при 4 °C при 100 000 g. Параметры ВМЧПК в полученных препаратах оценивали на приборе для NTA NanoSight® LM10 (Malvern Instruments, Великобритания), оснащенном синим лазером (45 мВт при 488 нм) и камерой C11440-5B (Hamamatsu Photonics, Япония). Результаты записывали и анализировали с помощью программного обеспечения «NTA 2.3». При анализе записей длительностью 60 с оценивали следующие параметры ВМЧПК: средний гидродинамический диаметр (нм) и концентрация ВМЧПК в суспензии (частиц/мл).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программного пакета «Statistica 10 for Windows» (StatSoft, США). Количественные переменные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. Нормально распределенные переменные представляли в виде (M±m), где M – среднее арифметическое, m – стандартное отклонение; прочие количественные переменные представляли в виде «Me [Q25; Q75]», где Me – медиана, Q – квартили. Использовали непараметрические методы статистики: критерий Манна – Уитни для сравнения двух независимых выборок, коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при p<0,05.



Примеры типичных гистограмм распределения внеклеточных микрочастиц плазмы крови по размеру у пациентов с COVID-19: *a* – выживший пациент; *б* – пациент с летальным исходом
Examples of typical size distribution histograms of plasma extracellular microparticles in COVID-19 patients: *a* – survived patient; *б* – patient with lethal outcome

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Длительность госпитализации пациентов в ОРИТ составила от 2 до 75 дней, в среднем – 18 [14; 25] дней. Были выписаны из отделения реанимации и интенсивной терапии с улучшением 14 (48,3 %) пациентов (группа 1 – выжившие), а 15 (51,7 %) пациентов умерли (группа 2 – летальный исход). Общая характеристика обследованных пациентов с COVID-19 приведена в табл. 1.

Концентрация ВМЧПК в группах 1 и 2 не различалась. Была отмечена тенденция к увеличению размера ВМЧПК в группе 2, однако различия не достигли уровня статистической значимости ($p=0,074$). При анализе первичных данных НТА была выявлена гетерогенность пула ВМЧПК в группе 2 по сравнению с группой 1: на гистограмме распределения ВМЧПК по размеру у выживших пациентов, как правило, наблюдался один пик, тогда как у пациентов с летальным исходом – несколько пиков, свидетельствовавших о наличии ВМЧПК разного размера (рисунок).

Параметры общего клинического анализа крови и состояния системы гемостаза, а также молекулярные маркеры воспаления и повреждения тканей у обследованных пациентов, оцененные на момент поступления в ОРИТ, приведены в табл. 2.

Уровни фибриногена, D-димера, антигена фактора Виллебранда, лактатдегидрогеназы, С-реактивного белка, прокальцитонина, ИЛ-6 и ИЛ-18 существенно превышали верхнюю границу референтного интервала у всех обследованных пациентов с COVID-19 независимо от исхода заболевания; при этом только уровни лактатдегидрогеназы и прокальцитонина были статистически значимо выше в группе 2 по сравнению с группой 1 ($p=0,018$ и $p=0,026$ соответственно).

В общем клиническом анализе крови среди всех обследованных лиц наблюдались изменения, характерные для коронавирусной инфекции: повышение уровней лейкоцитов и нейтрофилов при

одновременном снижении уровня лимфоцитов; при этом в группе 2 уровни лейкоцитов и лимфоцитов были статистически значимо ниже, чем в группе 1 ($p=0,033$ и $p=0,010$ соответственно).

Параметры ТЭМ в группах 1 и 2 не различались.

Среди всех обследованных пациентов концентрация ВМЧПК имела обратную корреляцию с ПВ и числом крупных тромбоцитов, %: $R=-0,378$ ($p=0,043$) и $R=-0,373$ ($p=0,047$) соответственно; размер ВМЧПК обратно коррелировал с уровнем антигена фактора Виллебранда – $R=-0,505$ ($p=0,020$) и имел прямую корреляцию с уровнем фибриногена – $R=0,534$ ($p=0,003$). При этом положительная корреляция размера ВМЧПК с уровнем фибриногена сохранялась в группе 2 – $R=0,551$ ($p=0,033$), но не наблюдалась в группе 1.

У выживших пациентов концентрация ВМЧПК имела прямую корреляцию с уровнем ИЛ-18 и максимальным лизисом тромба при ТЭМ: $R=0,714$ ($p=0,004$) и $R=0,748$ ($p=0,020$) соответственно; размер ВМЧПК также имел прямую корреляцию с максимальным лизисом тромба при ТЭМ – $R=0,706$ ($p=0,034$) и обратную корреляцию с уровнем прокальцитонина и максимальной плотностью сгустка при ТЭМ: $R=-0,653$ ($p=0,011$) и $R=-0,689$ ($p=0,040$) соответственно.

Выявленные нами изменения в общем клиническом анализе крови, а также высокие уровни маркеров воспаления и активации системы гемостаза у пациентов с COVID-19 согласуются с данными зарубежных авторов [12, 14 – 16], которые отмечали такие нарушения со стороны крови на фоне коронавирусной инфекции. Более того, есть основания рассматривать ряд показателей биохимического анализа крови, оцененных нами в рамках данной работы, как прогностические биомаркеры степени тяжести течения COVID-19. А именно: в нашем исследовании у пациентов группы 2, по сравнению с выжившими пациентами, был детектирован более высокий уровень лактатдегидрогеназы – фермента, повышенный уровень которого, по данным

Таблица 2

Лабораторные показатели у обследованных пациентов с COVID-19: параметры общего клинического анализа крови и системы гемостаза, маркеры воспаления и повреждения тканей

Table 2

Laboratory parameters in the examined patients with COVID-19: parameters of complete blood count and hemostatic system, markers of inflammation and tissue damage

Параметр	Группа 1, выжившие (n = 14)	Группа 2, летальный исход (n = 15)	Референтный интервал
Лейкоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	12,77 [7,28; 16,83]*	7,03 [5,78; 11,75]*	4,00 – 8,80
Нейтрофилы, %	88,1 [83,3; 91,0]	89,0 [85,7; 92,7]	46,0 – 72,0
Лимфоциты, %	7,3 [5,1; 10,3]*	5,9 [4,9; 10,6]*	18,0 – 40,0
Моноциты, %	4,4 [2,3; 6,1]	4,1 [2,0; 5,3]	0,0 – 9,0
Эозинофилы, %	0	0	0,0 – 5,0
Базофилы, %	0,2 [0,1; 0,4]	0,3 [0,2; 0,3]	0,0 – 1,0
Нейтрофилы, $\cdot 10^9/\text{л}$	11,05 [6,62; 15,36]	6,16 [5,31; 10,33]	2,20 – 4,80
Лимфоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	0,95 [0,60; 1,20]*	0,60 [0,30; 0,80]*	1,2 – 2,5
Моноциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	0,55 [0,28; 0,64]	0,29 [0,12; 0,44]	0,09 – 0,60
Эозинофилы, $\cdot 10^9/\text{л}$	0	0	0,000 – 0,300
Базофилы, $\cdot 10^9/\text{л}$	0,03 [0,02; 0,04]	0,02 [0,01; 0,03]	0,000 – 0,065
Эритроциты, $\cdot 10^{12}/\text{л}$	4,5 [4,30; 5,10]	4,7 [4,3; 5,1]	4,1 – 5,1
Гемоглобин, г/л	143 [135; 157]	139 [126; 159]	132 – 164
Средний объем эритроцита, фл.	94,4 [87,4; 99,0]	92,6 [90,3; 95,5]	85,0 – 105,0
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	30,3 [28,5; 32,0]	30,5 [29,2; 31,2]	24,0 – 33,0
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л	322 [317; 329]	325 [317; 328]	300 – 380
Индекс распределения эритроцитов по объему, фл.	46,3 [42,4; 47,1]	44,3 [41,4; 47,9]	33,4 – 49,2
Тромбоциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	273 [214; 316]	217 [147; 271]	150 – 400
Средний объем тромбоцита, фл.	10,0 [9,5; 10,7]	10,3 [9,3; 11,0]	7,4 – 10,4
Фибриноген, г/л	5,79 [5,05; 6,95]	5,75 [5,22; 7,31]	1,80 – 3,50
Активированное частичное тромбопластиновое время, с	34,1 [29,8; 42,7]	33,5 [29,5; 40,2]	27,0 – 37,0
Протромбиновое время, с	10,9 [10,4; 11,5]	11,4 [10,9; 12,2]	11,5 – 14,5
Д-димер, мкг/л	695 [357; 1178]	1141 [448; 2510]	<500
Антиген фактора Виллебранда, ед./мл	2,65 [2,30; 3,12]	2,44 [2,25; 2,58]	0,50 – 1,50
Лактатдегидрогеназа, ед./л	350 [304; 536]*	573 [500; 751]*	0,0 – 248,0
С-реактивный белок, мг/л	142,6 [103,4; 191,5]	138,5 [79,5; 202,4]	0,01 – 5,00
Прокальцитонин, мкг/л	0,108 [0,097; 0,169]*	0,287 [0,125; 0,307]*	<0,000
Интерлейкин-6, пг/мл	20,69 [9,53; 100,26]	27,80 [17,50; 55,64]	<10,00
Интерлейкин-18, пг/мл	587,94 [496,65; 803,58]	663,87 [587,00; 1195,25]	<270,00

* – $p < 0,05$.

метаанализа В. Henry et al. [17], в 6 раз увеличивает вероятность тяжелого течения коронавирусной инфекции и в 16 раз увеличивает вероятность смерти от нее. Оценка уровня лактатдегидрогеназы предложена как экспресс-тест для широкого применения в клинической практике, позволяющий выделить категорию пациентов с COVID-19, нуждающихся в повышенном внимании медицинского персонала, и в итоге повысить эффективность и безопасность терапии, минимизировать риск летального исхода [18]. Также мы выявили у лиц с неблагоприятным исходом COVID-19 более

высокий уровень прокальцитонина – пептида, повышенный уровень которого, по данным метаанализа G. Lippi и M. Plebani [19], ассоциирован с тяжелым течением коронавирусной инфекции.

Размер большинства проанализированных нами ВМЧПК не превышал 100 нм, что может указывать на их принадлежность к экзосомам, биогенез которых активно обсуждается при инфекционных заболеваниях, в том числе при COVID-19 [20]. В. Krishnamachary et al. (2020) [21] наблюдали у пациентов с тяжелым течением COVID-19, по сравнению с бессимптомным протеканием болезни

или течением средней тяжести, преимущественно микрочастицы малого размера, т. е. экзосомы; указанные авторы также показали, что крупные частицы у пациентов с тяжелым течением COVID-19 несут на своей поверхности молекулы тканевого фактора и содержат такие провоспалительные цитокины, как TNF- α , IL-6, MCP-1, MCP-3, CXCL10, CXCL16. В нашей работе у пациентов группы 2 размер ВМЧПК имел тенденцию к увеличению, а гетерогенный по размеру пул ВМЧПК в этой группе и прямая корреляция размера ВМЧПК с уровнем фибриногена, который не только является одним из ключевых факторов свертывания, но и выступает как «белок стресса», повышающийся при воспалении, подтверждают результаты зарубежных коллег и позволяют сделать предположение о различных путях активации клеток и формировании разных пулов ВМЧПК в зависимости от особенностей течения COVID-19. Следует отметить, что гетерогенность пула ВМЧПК по размеру может быть отличительным признаком пациентов с COVID-19 [22].

Выявленные нами корреляции концентрации и размера ВМЧПК с параметрами, характеризующими состояние системы гемостаза, полностью согласуются с данными E. Barberis et al. (2021) [23], которые провели протеомный анализ экзосом пациентов с COVID-19 разной степени тяжести и здоровых добровольцев и показали высокое содержание биоактивных молекул, вовлеченных в регуляцию гемостаза при COVID-19; при этом и внешний, и внутренний пути коагуляционного каскада, и система свертывания крови в целом в большей степени были активированы у пациентов в критическом состоянии.

В настоящее время поиск ранних предикторов тяжелого течения COVID-19 с использованием анализа ВМЧПК является одним из ключевых направлений исследований; в данном контексте анализируют и белки, ассоциированные с микрочастицами, и различные регуляторные РНК, которые могут участвовать в микровезикулярном транспорте [24]. Активно изучается целый ряд биомаркеров, которые могут выступать предикторами тяжелого течения COVID-19, в том числе γ -фибриноген, С-реактивный белок, ассоциированные с экзосомами белки (СОРВ2, KRAS, PRKCM, RHOС, CD147, CAPN2, ECM1, MFAP4), микроРНК (miR-122-5p, miR-21-5p, miR-140-3p) [24].

ВЫВОДЫ

1. Процесс микровезикуляции клеток играет важную роль в патогенезе новой коронавирусной инфекции.

2. Характеристики внеклеточных микрочастиц, а именно — увеличение их среднего гидродинамического диаметра и гетерогенность пула по диаметру, могут являться неблагоприятными прогности-

ческими биомаркерами степени тяжести течения COVID-19.

3. Целесообразно проведение дальнейших исследований внеклеточных микрочастиц плазмы крови для анализа их концентрации и размеров, а также сопоставления этих параметров с лабораторными маркерами активации гемостаза, воспаления и повреждения тканей в увеличенных выборках пациентов с COVID-19, стратифицированных по полу и возрасту.

4. Повышенные уровни лактатдегидрогеназы или (и) прокальцитонина в плазме крови могут являться прогностическими биомаркерами повышенного риска летального исхода COVID-19.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке РФФИ № 20-04-00257.

Financing

The study is supported by RFBR № 20-04-00257.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. – 2020. – Vol. 367, № 6478. – P. E6977. Doi: 10.1126/science.aau6977.
2. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection / M. Hassanpour, J. Rezaie, M. Nouri, Y. Panahi // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2020. – Vol. 85. – P. 104422. Doi: 10.1016/j.meegid.2020.104422.
3. Nomura S., Taniura T., Ito T. Extracellular Vesicle-Related Thrombosis in Viral Infection // *Int. J. Gen. Med.* – 2020. – Vol. 13. – P. 559–568. Doi: 10.2147/IJGM.S265865.
4. Bari E., Ferrarotti I., Saracino L. et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretome for Severe COVID-19 Infections: Premises for the Therapeutic Use // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 924. Doi: 10.3390/cells9040924.
5. Bulut Ö., Gürsel İ. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles: promising immunomodulators against autoimmune, autoinflammatory disorders and SARS-CoV-2 infection // *Turk. J. Biol.* – 2020. – Vol. 44, № 3. – P. 273–282. Doi: 10.3906/biy-2002-79.
6. Sengupta V., Sengupta S., Lazo A. et al. Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as

Treatment for Severe COVID-19 // *Stem. Cells Dev.* – 2020. – Vol. 29, № 12. – P. 747–754. Doi: 10.1089/scd.2020.0080.

7. Сироткина О. В., Ермаков А. И., Гайковская Л. Б. и др. Микрочастицы клеток крови у больных COVID-19 как маркер активации системы гемостаза // *Тромбоз, гемостаз и реология.* – 2020. – Т. 4. – С. 35–40. Doi: 10.25555/THR.2020.4.0943.

8. Сироткина О. В., Ермаков А. И., Жиленкова Ю. И. и др. Динамика образования микровезикул клеток крови у больных COVID-19 на разных стадиях заболевания // *Профилактическая и клиническая медицина.* – 2021. – Т. 4, № 81. – С. 68–74. Doi: 10.47843/2074-9120_2021_4_68.

9. Colling M. E., Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vascular Medicine.* – 2020. – Vol. 25, № 5. – С. 471–478. Doi: 10.1177/1358863X20932640.

10. Budaj M., Poljak Z., Đuriš I. et al. Microparticles: a component of various diseases. *Pol. Arch. Med. Wewn.* – 2012. – Vol. 122, № 1. – P. 24–29. Doi: 10.20452/pamw.1489

11. Stahl P. D., Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis // *Physiology (Bethesda).* – 2019. – Vol. 34, № 3. – P. 169–177. Doi: 10.1152/physiol.00045.2018.

12. Jin X., Duan Y., Bao T. et al. The values of coagulation function in COVID-19 patients. *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, № 10. – P. E0241329. Doi: 10.1371/journal.pone.0241329

13. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids / C. Théry, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton // *Current protocols in cell biology.* – 2006. – Vol. 3, № 3. – P. 22. Doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30

14. Karimi S. M., Niazkar H. R., Rad F. COVID-19 and hematology findings based on the current evidences: A puzzle with many missing pieces // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2021. – Vol. 43, № 2. – P. 160–168. Doi: 10.1111/ijlh.13412.

15. Gong J., Ou J., Qiu X. et al. A Tool to Early Predict Severe Corona Virus Disease 2019 (COVID-19): A Multicenter Study using the Risk Nomogram in Wuhan and Guangdong, China. *Clin Infect Dis.* – 2020. – Vol. 443. Doi: 10.1093/cid/ciaa443.

16. Mo P., Xing Y., Xiao Y. et al. Clinical Characteristics of Refractory Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China // *Clinical Infectious Diseases.* – 2021. – Vol. 73, № 11. – P. E4208–E4213. Doi: 10.1093/cid/ciaa270.

17. Henry B. M., Aggarwal G., Wong J. et al. Lactate dehydrogenase levels predict coronavirus disease 2019 (COVID-19) severity and mortality: A pooled analysis // *Am J Emerg Med.* – 2020. – Vol. 38, № 9. – P. 1722–1726. Doi: 10.1016/j.ajem.2020.05.073

18. Bartziokas K., Kostikas K. Lactate dehydrogenase, COVID-19 and mortality. *Med Clin (Engl Ed).* – 2021. – Vol. 156, № 1. – P. 37. Doi: 10.1016/j.medcle.2020.07.017.

19. Lippi G., Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis // *Clin Chim Acta.* – 2020. – Vol. 505. – P. 190–191. Doi: 10.1016/j.cca.2020.03.004.

20. Exosomes and COVID-19: challenges and opportunities / G. Babaei, N. Zare, A. Mihanfar, M. H. K. Ansari // *Comp. Clin. Path.* – 2022. – P. 1–8. Doi: 10.1007/s00580-021-03311-3.

21. Krishnamachary B., Cook C., Spikes L. et al. The Potential Role of Extracellular Vesicles in COVID-19 Associated Endothelial injury and Pro-inflammation // *medRxiv.* – 2020. – Vol. 08, № 27. – P. 20182808. Doi: 10.1101/2020.08.27.20182808.

22. Sun B., Tang N., Peluso M. J. et al. Characterization and Biomarker Analyses of Post-COVID-19 Complications and Neurological Manifestations // *Cells.* – 2021. – Vol. 10, № 2. – P. 386. Doi: 10.3390/cells10020386.

23. Barberis E., Vanella V. V., Falasca M. et al. Circulating Exosomes Are Strongly Involved in SARS-CoV-2 Infection // *Front. Mol. Biosci.* – 2021. – Vol. 8. – P. 632290. Doi: 10.3389/fmolb.2021.632290. eCollection 2021.

24. Fujita Y., Hoshina T., Matsuzaki J. et al. Early prediction of COVID-19 severity using extracellular vesicle COPB2 // *J. Extracell. Vesicles.* – 2021. – Vol. 10, № 8. – P. E12092. Doi: 10.1002/jev2.12092.

REFERENCES

1. Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes // *Science* 2020; 367(6478):E6977. Doi: 10.1126/science.aau6977.

2. Hassanpour M., Rezaie J., Nouri M., Panahi Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection // *Infection, Genetics and Evolution.* 2020;(85):104422. Doi: 10.1016/j.meegid.2020.104422.

3. Nomura S., Taniura T., Ito T. Extracellular Vesicle-Related Thrombosis in Viral Infection // *Int. J. Gen. Med.* 2020;(13):559–568. Doi: 10.2147/IJGM.S265865.

4. Bari E., Ferrarotti I., Saracino L., Perteghella S., Torre M. L., Corsico A. G. Mesenchymal Stromal Cell Secretome for Severe COVID-19 Infections: Premises for The Therapeutic Use // *Cells.* 2020;9(4):924. Doi: 10.3390/cells9040924.

5. Bulut Ö., Gürsel İ. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles: promising immunomodulators against autoimmune, autoinflammatory disorders and SARS-CoV-2 infection // *Turk. J. Biol.* 2020;44(3):273–282. Doi: 10.3906/biy-2002-79.

6. Sengupta V., Sengupta S., Lazo A., Woods P., Nolan A., Bremer N. Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells as Treatment for Severe COVID-19 // *Stem Cells Dev.* 2020;29(12):747–754. Doi: 10.1089/scd.2020.0080.

7. Sirotkina O. V., Ermakov A. I., Gaykovaya L. B., Kudlay D. A., Vavilova T. V. Microparticles of blood cells in patients with COVID-19 as a marker of activation of the hemostasis system // *Thrombosis, hemostasis and rheology Trombos, hemostas i reologiya.* 2020;(4):35–40. (In Russ.).

8. Sirotkina O. V., Ermakov A. I., Zhilenkova Yu. I., Zolotova E. A., Kudlay D. A., Vavilova T. V., Gaykovaya L. B. Dynamics of microvesicle formation in blood in patients with COVID-19 at different stages of the disease // *Preventive and clinical medicine.* 2021;4(81):68–74. (In Russ.). Doi: 10.47843/2074-9120_2021_4_68.eng.

9. Colling M. E., Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms // *Vascular Medicine.* 2020;25(5):471–478. Doi: 10.1177/1358863X20932640

10. Budaj M., Poljak Z., Đuriš I., Kaško M., Imrich R., Kopáni M., Marušćáková L., Hulín I. Microparticles: a component of various diseases // *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2012; 122(1):24–29. Doi: 10.20452/pamw.1489.

11. Stahl P. D., Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis // *Physiology (Bethesda).* 2019;34(3):169–177. Doi: 10.1152/physiol.00045.2018.

12. Jin X., Duan Y., Bao T., Gu J., Chen Y., Li Y., Mao S., Chen Y., Xie W. The values of coagulation function in COVID-19 patients // *PLoS One.* 2020;15(10):E0241329. Doi: 10.1371/journal.pone.0241329.

13. Théry C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids // *Current protocols in cell biology.* 2006;3(3):22. Doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30

14. Karimi S. M., Niazkar H. R., Rad F. COVID-19 and hematology findings based on the current evidences: A puzzle with many missing pieces // *Int. J. Lab. Hematol.* 2021; 43(2):160–168. Doi: 10.1111/ijlh.13412.

Genetic, and Nanobiological Technologies, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-3011-1812; **Kulabukhova Daria G.**, Research Assistant of the Laboratory of Human Molecular Genetics, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute» (Gatchina, Russia); Junior Research Fellow of the Department of Molecular, Genetic, and Nanobiological Technologies, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-9700-0095; **Nikolaev Mikhail A.**, Junior Research Fellow of the Laboratory of Human Molecular Genetics, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute» (Gatchina, Russia); Junior Research Fellow of the Department of Molecular, Genetic, and Nanobiological Technologies, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-1952-4678; **Izumchenko Artem D.**, Senior Laboratory Assistant of the Laboratory of Human Molecular Genetics, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute» (Gatchina, Russia), ORCID: 0000-0003-2919-1878; **Garaeva Luiza A.**, Junior Research Fellow of the Laboratory of Protein Biosynthesis, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute» (Gatchina, Russia), ORCID: 0000-0003-1219-073X; **Shlyk Irina V.**, Dr. of Sci. (Med.), Professor of Anesthesiology and Intensive Care Department, Deputy Head of Research Clinical Center of Anesthesiology and Intensive Care, Deputy Head Physician of University Clinic in Anesthesiology and Intensive Care, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-0977-8081; **Gavrilova Elena G.**, Cand. of Sci. (Med.), Associate Professor of Anesthesiology and Intensive Care Department, Head of Anesthesiology and Intensive Care Department № 2 of Research Clinical Center of Anesthesiology and Intensive Care, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-9126-3206; **Polushin Yury S.**, Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Dr. of Sci. (Med.), Vice-Rector for Research, Head of Anesthesiology and Intensive Care Department, Head of Research Clinical Center of Anesthesiology and Intensive Care, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-6313-5856; **Pchelina Sofya N.**, Dr. of Sci (Biol.), Head of the Department of Molecular, Genetic, and Nanobiological Technologies, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia); Head of the Laboratory of Human Molecular Genetics, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute» (Gatchina, Russia), ORCID: 0000-0001-7431-6014.