

Калинская А. И.¹, Елизарова А. К.¹, Анисимова А. С.¹, Воробьева Д. А.², Русакович Г. И.¹, Марюхнич Е. В.², Духин О. А.¹, Иванова О. И.², Бугрова А. Е.³, Бржозовский А. Г.⁴, Индейкина М. И.⁴, Кононихин А. С.⁴, Николаев Е. Н.⁴, Васильева Е. Ю.¹

¹ ГБУЗ «Городская клиническая больница им. И. В. Давыдовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава РФ, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля» Российской академии наук, Москва, Россия

⁴ АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий», Москва, Россия

ОСОБЕННОСТИ ГЕМОСТАЗА И ПРОТЕОМНОГО СОСТАВА ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА И ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2

Цель	Выявить особенности плазменного, тромбоцитарного гемостаза и протеомного состава плазмы крови у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и здоровых добровольцев после COVID-19.
Материал и методы	Включены пациенты с ОИМ, недавно переболевшие COVID-19 (ОИМ-постковид, n=56), и пациенты с ОИМ, не болевшие недавно COVID-19 (ОИМ-контроль, n=141). Здоровые добровольцы составили контрольные группы, и также были разделены на группы контроль-постковид (n=32) и контроль-контроль (n=71). Перенесенная инфекция SARS-CoV-2 определялась по anti-N IgG в сыворотке крови, уровень которых сохраняется в течение 6–10 мес после заболевания. Пациентам были проведены оценка гемостаза методами тромбоэластометрии (на цельной крови), тромбодинамики (на бедной тромбоцитами плазме), фибринолиза, импедансной агрегометрии, а также протеомный анализ.
Результаты	В группах ОИМ-постковид и ОИМ-контроль были более высокие значения скорости роста, размера и плотности тромба при измерении методами тромбоэластометрии и тромбодинамики, а также повышенные уровни компонентов системы комплемента, белков, регулирующих состояние эндотелия, ряда острофазных и прокоагулянтных белков по сравнению с контрольными группами. При этом в группе ОИМ-постковид по сравнению с ОИМ-контроль плотность тромба была ниже, а показатели его лизиса более высокие при измерении методом тромбодинамики на бедной тромбоцитами плазме, в то время как агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ и тромбином, была выше. Также в группе контроль-постковид по сравнению с группой контроль-контроль были меньшие скорости формирования тромба и его размеры при измерении методом тромбодинамики, а агрегация тромбоцитов, индуцированная арахидоновой кислотой и тромбином, наоборот, была выше. Кроме того, в группе ОИМ-постковид по сравнению с группой ОИМ-контроль была более низкая концентрация белков, участвующих в воспалении и гемостазе.
Заключение	Для пациентов с ОИМ, недавно переболевших COVID-19, характерна менее выраженная активация иммунного ответа по сравнению с пациентами с ОИМ, не болевшими COVID-19, что может быть обусловлено длительно сохраняющимся хроническим воспалением и истощением компонентов системы иммуноактивации после SARS-CoV-2 инфекции. Длительная активация системы гемостаза как у пациентов с ОИМ, так и у здоровых добровольцев после COVID-19, обусловлена преимущественно тромбоцитарным звеном гемостаза.
Ключевые слова	COVID-19; коронавирусная инфекция; постковид; инфаркт миокарда; гемостаз; протеомный анализ; тромбоэластометрия; тромбодинамика; агрегометрия.
Для цитирования	Kalinskaya A.I., Elizarova A.K., Anisimova A.S., Vorobyeva D.A., Rusakovich G.I., Maryukhnich E.V. et al. Peculiarities of Hemostasis and Proteomics in Patients With Acute Myocardial Infarction and Healthy Volunteers After SARS-CoV-2 Infection. Kardiologiya. 2024;64(9):58–69. [Russian: Калинская А.И., Елизарова А.К., Анисимова А.С., Воробьева Д.А., Русакович Г.И., Марюхнич Е.В. и др. Особенности гемостаза и протеомного состава плазмы крови у пациентов с острым инфарктом миокарда и здоровых добровольцев после перенесенной инфекции SARS-CoV-2. Кардиология. 2024;64(9):58–69].
Автор для переписки	Калинская Анна Ильинична. E-mail: minutka86@mail.ru

Введение

В начале пандемии COVID-19 было выявлено, что острый период заболевания сопровождается формированием гиперкоагуляции и ростом числа тромботических событий [1]. С течением времени также было показано увеличение частоты сердечно-сосудистых и неврологических осложнений в отдаленном периоде после перенесенной SARS-CoV-2 инфекции [2, 3]. В частности, среди пациентов, перенесших COVID-19, выявлено увеличение частоты развития острого инфаркта миокарда (ОИМ) [4]. Эндотелиальная дисфункция, активация системы гемостаза, дисфункция иммунной системы могут играть роль в развитии ОИМ у пациентов, перенесших COVID-19 [5]. Однако точные механизмы в настоящее время неизвестны и требуют изучения.

Протеомный анализ плазмы является перспективной методикой для изучения ключевых механизмов патогенеза постковидных осложнений [6]. Нами была использована протеомная панель ВАК270, включающая белки – маркеры системы гемостаза, состояния эндотелия и воспалительного ответа [7]. Возможность использования данной методики для измерения белкового состава плазмы крови уже была продемонстрирована ранее [8].

Данное исследование посвящено изучению особенностей гемостаза и протеомного состава плазмы крови, включая уровень острофазных белков, компонентов системы комплемента, про- и антикоагулянтных белков и белков, модифицирующих состояние эндотелия, у пациентов с ОИМ и здоровых добровольцев, перенесших COVID-19.

Материал и методы

Исследование проведено на базе ГКБ им. И. В. Давыдовского с сентября 2014 г. по сентябрь 2023 г. в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено локальным этическим комитетом. Все участники исследования подписали информированное добровольное согласие.

Были включены 197 пациентов с ОИМ и 103 здоровых добровольца с дальнейшим разделением на группы в зависимости от перенесенной в недавнее время SARS-CoV-2 инфекции: ОИМ-постковид (n=56); ОИМ-контроль (n=141); контроль-постковид (n=32); контроль-контроль (n=71).

Критерии включения для пациентов с ОИМ: подтвержденный диагноз ОИМ с подъемом или без подъема сегмента ST.

Критерии исключения для пациентов с ОИМ: возраст >90 лет; активное онкологическое, аутоиммунное, острое воспалительное заболевание; прием антикоагулянтов; инфекция SARS-CoV-2 при поступлении и в течение 1 мес до поступления в стационар.

Критерии включения для здоровых добровольцев: возраст от 40 до 90 лет.

Критерии исключения для здоровых добровольцев: активное онкологическое, аутоиммунное, острое воспалительное заболевание; хроническое сердечно-сосудистое, пульмонологическое заболевание; сахарный диабет; тромбоэмболия в анамнезе; прием антикоагулянтов/антиагрегантов; инфекция SARS-CoV-2 при включении и в течение 1 мес до включения в исследование; наличие симптомов, соответствующих постковидному синдрому, определяемых по валидированному опроснику (более 5 баллов) [11].

Перенесенная инфекция SARS-CoV-2 выявлялась по титру IgG к N-белку SARS-CoV-2, уровень которых сохраняется повышенным в течение 6–10 мес после COVID-19 [9]. Титр антител измерялся при помощи иммунохимического анализатора ARCHITECT i1000SR (Abbott, США) в соответствии с протоколом производителя [10]. При титре anti-N IgG выше 1,4 пациент с ОИМ или здоровый доброволец относился к соответствующей постковидной группе, с титром ниже 1,4 – к соответствующей контрольной группе. Пациенты с ОИМ и здоровые добровольцы, включенные в исследование до начала пандемии, входили в группы ОИМ-контроль и контроль-контроль соответственно.

Участникам были проведены физикальный осмотр, стандартный набор лабораторных исследований (общий анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма). У пациентов с ОИМ забор крови проводился перед чрескожным коронарным вмешательством.

Оценка гемостаза

Участникам исследования было проведено исследование гемостаза методами тромбоэластографии на плазме крови, бедной тромбоцитами, в режимах тромбообразования и фибринолиза, ротационной тромбоэластографии и импедансной агрегометрии на цельной крови. Время между забором крови и анализом не превышало 15 мин.

Ротационная тромбоэластография проводилась на приборе ROTEM (Германия) в режиме NATEM по стандартной методике [12]. Оценивались время свертывания и образования сгустка (CT, CFT, с), амплитуда сгустка на 5–30 мин (A5 – A30, мм), максимальная плотность сгустка (MCF, мм), угол α (α , °), индекс лизиса сгустка на 60 мин (LI 60, %), максимальный лизис (ML, %).

Оценка тромбоэластографии проводилась по стандартной методике на приборе Thrombodynamics Analyzer System T-2 (HemaCore LLC, Россия) [13]. Оценивались общая, начальная, стационарная скорости роста сгустка (V , V_i , V_{st} , мкм/мин), среднее время задержки роста сгустка (T_{lag} , мин), размер и плотность сгустка (CS , мкм, D , у.е.), время образования спонтанных сгустков (T_{sp} , мин). Фибринолиз активировался урокиназой, оценивались вре-

Центральная иллюстрация. Особенности гемостаза и протеомного состава плазмы крови у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) и здоровых добровольцев после перенесенной инфекции SARS-CoV-2



мя начала, общее и прогнозируемое время лизиса сгустка (LOT, CLT, LTE, мин), скорость лизиса сгустка (LP, %/мин), процент остаточной плотности сгустка (LI, %).

Импедансную агрегометрию проводили по стандартной методике на агрегометре Multiplate (Roche, Швейцария) с использованием активаторов: арахидоновая кислота (ASPI), аденозиндифосфат (ADP – АДФ) и пептид-активатор рецептора тромбина 6 (TRAP-6). Время теста 6 мин. Активность агрегации оценивалась по площади под кривой в единицах (AUC) [14].

Таргетный протеомный анализ плазмы крови

Некоторым участникам был проведен таргетный протеомный анализ с использованием тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) и метода мониторинга множественных реакций (MRM). Для MRM-анализа были использованы МС параметры и синтетические пептидные стандарты, которые ранее были валидированы для количественного анализа соответствующих 227 белков плазмы крови. Все образцы были проанализированы в двух повторах с использованием ВЭЖХ-МС системы ExionLC™ UNPLC, сопряженной онлайн с тройным квадрупольным масс-спектрометром SCIEX QTRAP 6500+. Разделение ВЭЖХ проводили на C18 колонке Zorbax Eclipse Plus (150×2,1 мм, 1,8 мкм; Agilent) с градиентным элюированием [7]. Для анализа ВЭЖХ-МС данных использовали программное обеспечение Skyline (версия 20.2.0.343).

Статистический анализ проводился в программе R версии 4.3.2. Количественные показатели представлены в виде медианы и межквартильного размаха – Me [Q1; Q3], для сравнения групп использовался критерий Манна-Уитни. Категориальные показатели оценивались с помощью точного критерия Фишера. Для анализа корреляций использовали коэффициент Спирмена.

Логистическая регрессия применялась для изучения влияния предикторов на бинарные переменные. Надежность модели проверялась методом k-кратной кросс-валидации (k=5, 5 повторений) и кросс-валидацией с исключением одного наблюдения. Различия по возрасту учитывались с помощью регрессионного анализа, где возраст и группа были независимыми переменными. Прогностическая эффективность оценивалась с использованием ROC-анализа, площади под кривой (AUC), чувствительности, специфичности и точности.

Результаты

Клинико-anamnestические характеристики

Пациенты группы ОИМ-постковид (по сравнению с группой контроль-постковид) и ОИМ-контроль (по сравнению с группой контроль-контроль) были старше, поэтому была введена поправка на возраст, и все сравнения с данными группами проводились с использованием регрессионного анализа.

Пациенты групп ОИМ-постковид (по сравнению с группой контроль-постковид) и ОИМ-контроль

(по сравнению с группой контроль-контроль) чаще были мужского пола, чаще курили, имели артериальную гипертензию и сахарный диабет. Кроме того, пациенты группы ОИМ-постковид (по сравнению с группой контроль-постковид) чаще имели дислипидемию в анамнезе.

Пациенты групп ОИМ-постковид (по сравнению с группой ОИМ-контроль) и контроль-постковид (по сравнению с группой контроль-контроль) достоверно не отличались, за исключением дислипидемии, которая чаще встречалась среди пациентов постковидных групп.

Важно отметить, что пациенты в группах ОИМ не отличались по амбулаторной антиагрегантной терапии, а здоровые добровольцы не принимали антиагреганты. (Данные представлены в Приложении-онлайн табл. 1).

Лабораторные параметры

Пациенты групп ОИМ-постковид (по сравнению с группами контроль-постковид и контроль-контроль) и ОИМ-контроль (по сравнению с группой контроль-контроль) имели более высокий уровень гемоглобина, лейкоцитов, триглицеридов, креатинина, международного нормализованного отношения (МНО), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ), глюкозы крови и более низкие значения калия, холестерина (ХС) липопротеинов высокой плотности (ЛВП), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Кроме того, у пациентов группы ОИМ-контроль (по сравнению с группой контроль-контроль) были выше значения общего ХС, а в группе ОИМ-постковид (по сравнению с группами контроль-постковид и контроль-контроль) были выше значения ХС липопротеинов низкой плотности (ЛНП).

Значимых различий по лабораторным параметрам между группами ОИМ-контроль и ОИМ-постковид не обнаружено. (Данные представлены в Приложении-онлайн табл. 2).

Ротационная тромбоэластометрия

Пациенты с ОИМ (с перенесенной SARS-CoV-2 инфекцией и без таковой) отличались от пациентов группы контроль-контроль более интенсивным тромбообразованием. В группе ОИМ-контроль по сравнению с группой контроль-контроль были больше размеры сгустка на 15, 20, 25, 30-й минутах (A20, мм, 53 [48; 59] vs 50 [46; 55], $p=0,02$ и др.) и максимальная плотность сгустка (MCF, мм, 56 [52; 62] vs 54 [50; 58], $p=0,01$), меньше время свертывания (СТ, с, 694 [549; 794] vs 773 [634; 926], $p<0,01$) и процент максимального лизиса сгустка (ML, %, 22 [18; 26] vs 24 [21; 27], $p=0,04$). В группе ОИМ-постковид по сравнению с группой контроль-контроль были больше размеры

сгустка на 10, 20, 25-й минутах (A20, мм, 53 [48; 58] vs 50 [46; 55], $p=0,02$ и др.), меньше время образования тромба и время свертывания (СТ, с, 711 [566; 842] vs 773 [634; 926], $p=0,02$ и др.). Значимых различий между группами ОИМ-постковид и контроль-постковид не было.

При сравнении групп пациентов с ОИМ было выявлено, что группа ОИМ-постковид по сравнению с группой ОИМ-контроль отличалась меньшим процентом максимального лизиса сгустка (ML, %, 22 [18; 26] vs 23 [21; 28], $p=0,02$).

При сравнении контрольных групп было выявлено, что группа контроль-постковид по сравнению с группой контроль-контроль отличалась меньшим временем образования тромба (CFT, с, 221 [171; 274] vs 279 [193; 326], $p=0,03$) и большим размером сгустка на 10-й минуте (A10, мм, 42 [37; 48] vs 39 [34; 45], $p=0,04$). (Данные представлены в Приложении-онлайн табл. 3).

Тромбодинамика

Пациенты с ОИМ (с перенесенной SARS-CoV-2 инфекцией и без таковой) отличались от пациентов группы контроль-контроль более интенсивным тромбообразованием. В группе ОИМ-контроль по сравнению с группой контроль-контроль были больше скорости роста сгустка (V, мкм/мин, 35 [30; 42] vs 33 [30; 36], $p=0,04$ и др.) и его плотность (D, отн. ед., 27 991 [24 950; 31 590] vs 24 672 [22 241; 28 869], $p<0,01$). В группе ОИМ-постковид по сравнению с группой контроль-контроль были больше скорости роста сгустка (V, мкм/мин, 36 [31; 39] vs 33 [30; 36], $p=0,04$ и др.), размер сгустка (CS, мкм, 1387 [1245; 1455] vs 1266 [1187; 1353], $p=0,02$) и ускоренное время лизиса сгустка (LTE, мин, 25 [17; 33] vs 32 [22; 59] $p=0,02$ и др.). В группе ОИМ-постковид по сравнению с группой контроль-постковид были больше скорости роста сгустка (V, мкм/мин, 36 [31; 39] vs 30 [26; 33], $p<0,01$ и др.) и его размеры (CS, мкм, 1387 [1245; 1455] vs 1173 [1049; 1257], $p<0,01$).

При сравнении групп пациентов с ОИМ, группа ОИМ-постковид по сравнению с группой ОИМ-контроль отличалась меньшей плотностью сгустка (D, отн. ед., 25 700 [23 705; 28 760] vs 27 991 [24 950; 31 590], $p<0,01$) и ускоренным временем лизиса сгустка (CLT, мин, 22 [16; 31] vs 30 [22; 40], $p<0,01$ и др.).

При сравнении контрольных групп было выявлено, что группа контроль-постковид по сравнению с группой контроль-контроль отличалась более низкими значениями скорости роста сгустка (V, мкм/мин, 30 [26; 33] vs 33 [30; 36], $p<0,01$ и др.), меньшими размерами сгустка (CS, мкм, 1173 [1049; 1257] vs 1266 [1187; 1353], $p=0,01$) и более быстрым временем начала его лизиса (LOT, мин,

24 [21; 29] vs 41 [21; 64], $p=0,02$). (Данные представлены в Приложении онлайн табл. 3).

Импедансная агрегометрия

Сравнение агрегации тромбоцитов между пациентами с ОИМ и здоровыми добровольцами не проводилось ввиду возможного влияния приема антиагрегантных препаратов амбулаторно пациентами с ОИМ.

При сравнении групп пациентов с ОИМ, в группе ОИМ-постковид были более высокие значения агрегации тромбоцитов, АДФ и тромбином, по сравнению с группой ОИМ-контроль (AUC, ADP, 55 [43; 65] vs 42 [31; 59], $p < 0,01$ и др.).

При сравнении контрольных групп, в группе контроль-постковид были более высокие значения агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой и тромбином, по сравнению с группой контроль-контроль (AUC, ASPI, 59 [48; 68] vs 48 [36; 63], $p=0,04$ и др.). (Данные представлены в Приложении-онлайн табл. 3).

Протеомный анализ

Были измерены концентрации для 81 белка, которые могут принимать участие в гемостазе, регуляции воспаления, поддержании структуры и функции эндотелия, метаболизме липидов, процессах кальцификации, формировании внеклеточного матрикса, ангиогенезе, транспорте стероидных гормонов, а также компоненты системы комплемента (Перечень белков представлен в Приложении онлайн табл. 4).

Данные группы белков были выделены, так как они напрямую вовлечены в развитие сердечно-сосудистых заболеваний.

Группа ОИМ-контроль (по сравнению с группой контроль-контроль) и группа ОИМ-постковид (по сравнению с обеими контрольными группами) отличались повышенным уровнем острофазных белков (липополисахарид-связывающий белок, СРБ, гаптоглобин), компонентов системы комплемента (C5, C9, факторы В, I), прокоагулянтных белков (бета-цепь фибриногена, фактор свертывания IX), белка с про- и антикоагулянтными свойствами (бета-2-гликопротеин 1) и белков, модифицирующих состояние эндотелия (фактор пигментного эпителия (PEDF) и ангиогенин). Также группа ОИМ-контроль по сравнению с группой контроль-контроль отличалась повышением острофазного белка богатого лейцином альфа-2-гликопротеина, компонентов системы комплемента (C3, ингибитор протеазы C1 плазмы), регулятора гемостаза и системы комплемента – витронектина, и антикоагулянтного белка – витамин К-зависимого белка S. Кроме того, пациенты группы ОИМ-постковид по сравнению с пациентами обеих контрольных групп отличались боль-

шими концентрациями белков, регулирующих воспаление (аттрактин, фосфатидилинозитол-гликан-специфическая фосфолипаза D), компонентов системы комплемента (C4, C6, субъединица A субкомпонента C1q, маннан-связывающая лектин-сериновая протеаза 2A) и белков с прокоагулянтными свойствами (фактор свертывания XII, В-цепь фактора свертывания XIII, фибронектин). Напротив, уровни альфа-цепи C4b-связывающего белка и L-селектина были ниже в группе ОИМ-постковид.

При этом группа ОИМ-постковид при сравнении с группой ОИМ-контроль имела более низкий уровень острофазного липополисахарид-связывающего белка, ингибиторов системы комплемента (альфа-цепь C4b-связывающего белка, ингибитор протеазы C1 плазмы), прокоагулянтного белка – бета-цепь фибриногена, антикоагулянтного белка – витамин К-зависимого белка S, а также PEDF.

Группа контроль-постковид по сравнению с группой контроль-контроль отличалась повышенным уровнем аполипопротеина A-IV, а также повышенным уровнем белка внеклеточного матрикса – люмикана.

Основные результаты протеомного анализа представлены на рисунке 1. Показаны белки, участвующие в регуляции гемостаза, воспаления, ангиогенеза, и компоненты системы комплемента, отличающиеся минимум в одном из сравнений: ОИМ-постковид vs ОИМ-контроль, ОИМ-контроль vs контроль-контроль, ОИМ-постковид vs контроль-контроль, ОИМ-постковид vs контроль-постковид (Полные данные представлены в Приложении онлайн табл. 5).

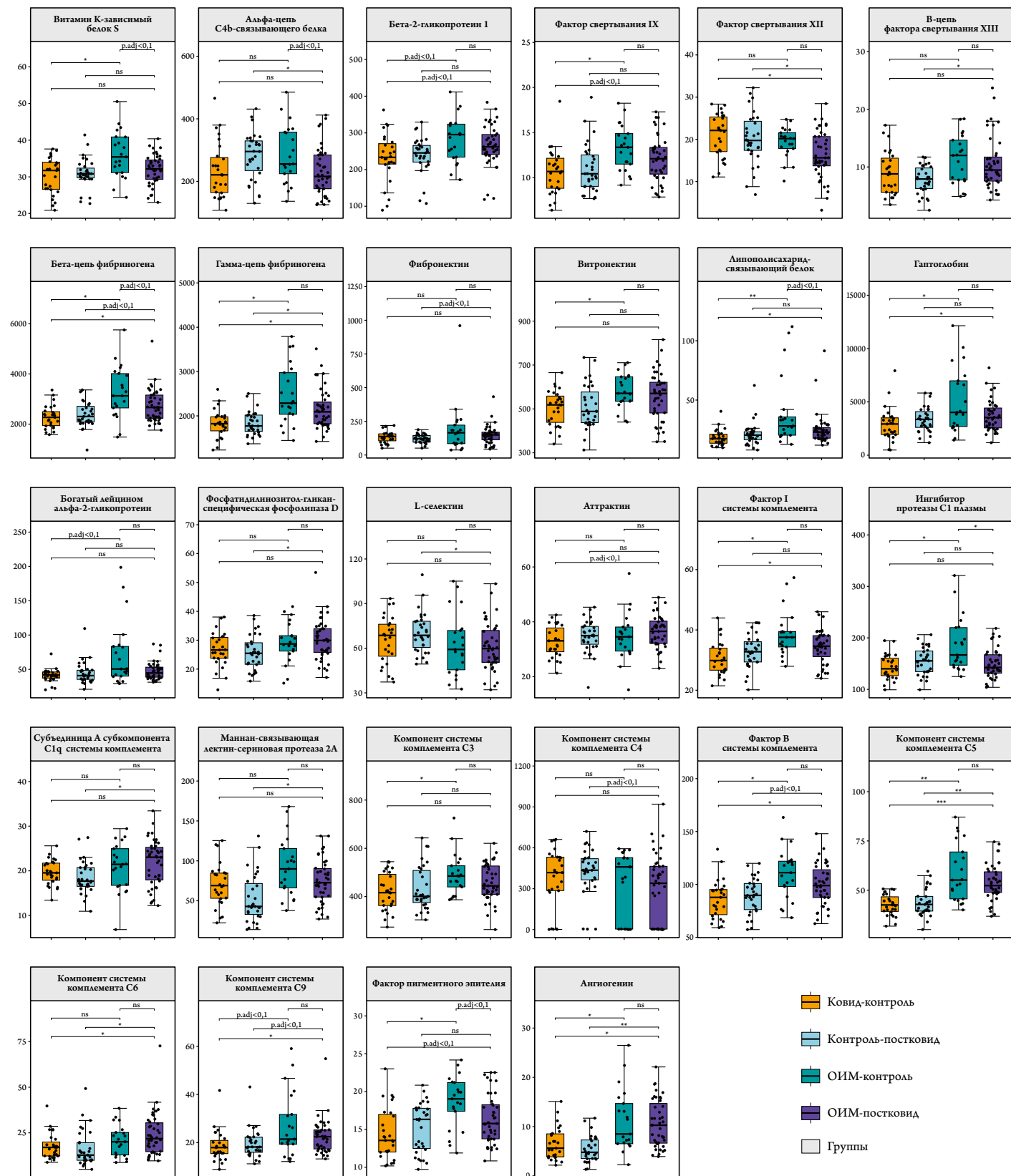
Нами также выполнена кластеризация параметров тромбодинамики и ротационной тромбоэластометрии, коагулограммы и белков, вовлеченных в воспаление и гемостаз, компонентов системы комплемента и белков, влияющих на состояние эндотелия (рис. 2 А, Б, В, Г).

В группе контроль-контроль мы выявили, что кластер 1 состоит в основном из компонентов системы комплемента и острофазных белков. Близко расположенные кластеры 4 и 6 в группе контроль-постковид и кластеры 1 и 5 в группе ОИМ-контроль содержат схожий с кластером 1 в группе контроль-контроль перечень белков.

Эти кластеры соотносятся с кластерами 1 и 2 в группе ОИМ-постковид, наиболее далекими друг от друга. Белки, схожие в перечисленных кластерах соответствующих групп, включают в себя острофазные белки, компоненты системы комплемента и прокоагулянтные белки. Кроме того, указанные кластеры в группе ОИМ-постковид включают в себя также параметры гемостаза, чего не наблюдается при кластеризации групп контроля.

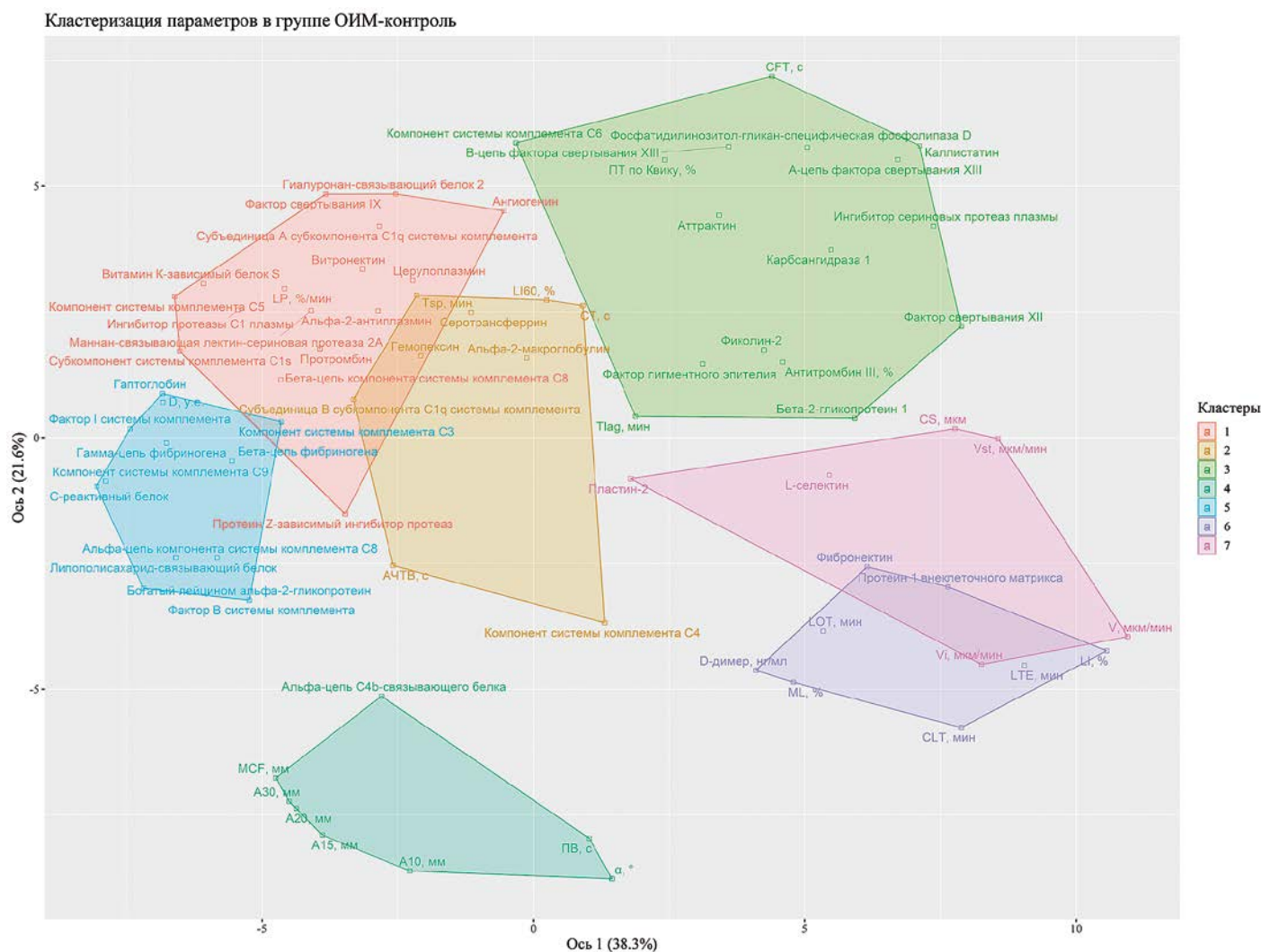
При этом параметры, отражающие активность фибринолиза, кластеризуются в общие с воспалительными

Рисунок 1. Диаграммы размаха для белков плазмы крови, концентрация которых значимо отличается минимум в одном из следующих сравнений: ОИМ-постковид vs ОИМ-контроль, ОИМ-контроль vs контроль-контроль, ОИМ-постковид vs контроль-контроль, ОИМ-постковид vs контроль-постковид



* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; ns – не значимо.

Рисунок 2А. Кластеризация параметров в группе пациентов ОИМ-контроль



Кластеризация параметров тромбодинамики и ротационной тромбоэластометрии, коагулограммы и белков, вовлеченных в воспаление и гемостаз, компонентов системы комплемента и белков, влияющих на состояние эндотелия, в соответствующих группах.

и прокоагулянтными белками группы лишь в группе контроль-контроль, а в остальных группах данные показатели формируют сепарированные кластеры.

По сравнению с кластерами 1 и 5 группы ОИМ-контроль, кластеры 1 и 2 группы ОИМ-постковид отличаются сниженным содержанием некоторых компонентов системы комплемента. При этом в группе ОИМ-постковид компоненты системы комплемента формируют отдельный кластер 3 с лектином, белками классического пути и конечной стадии активации системы комплемента.

Параметры гемостаза и эндогенного лизиса при кластеризации в группах с ОИМ распределяются схожим с контрольными группами образом: в группе ОИМ-контроль скорости роста сгустка и временные параметры лизиса располагаются в пересекающихся кластерах 6 и 7, а в группе ОИМ-постковид данные показатели входят в сепарированные кластеры 6–8.

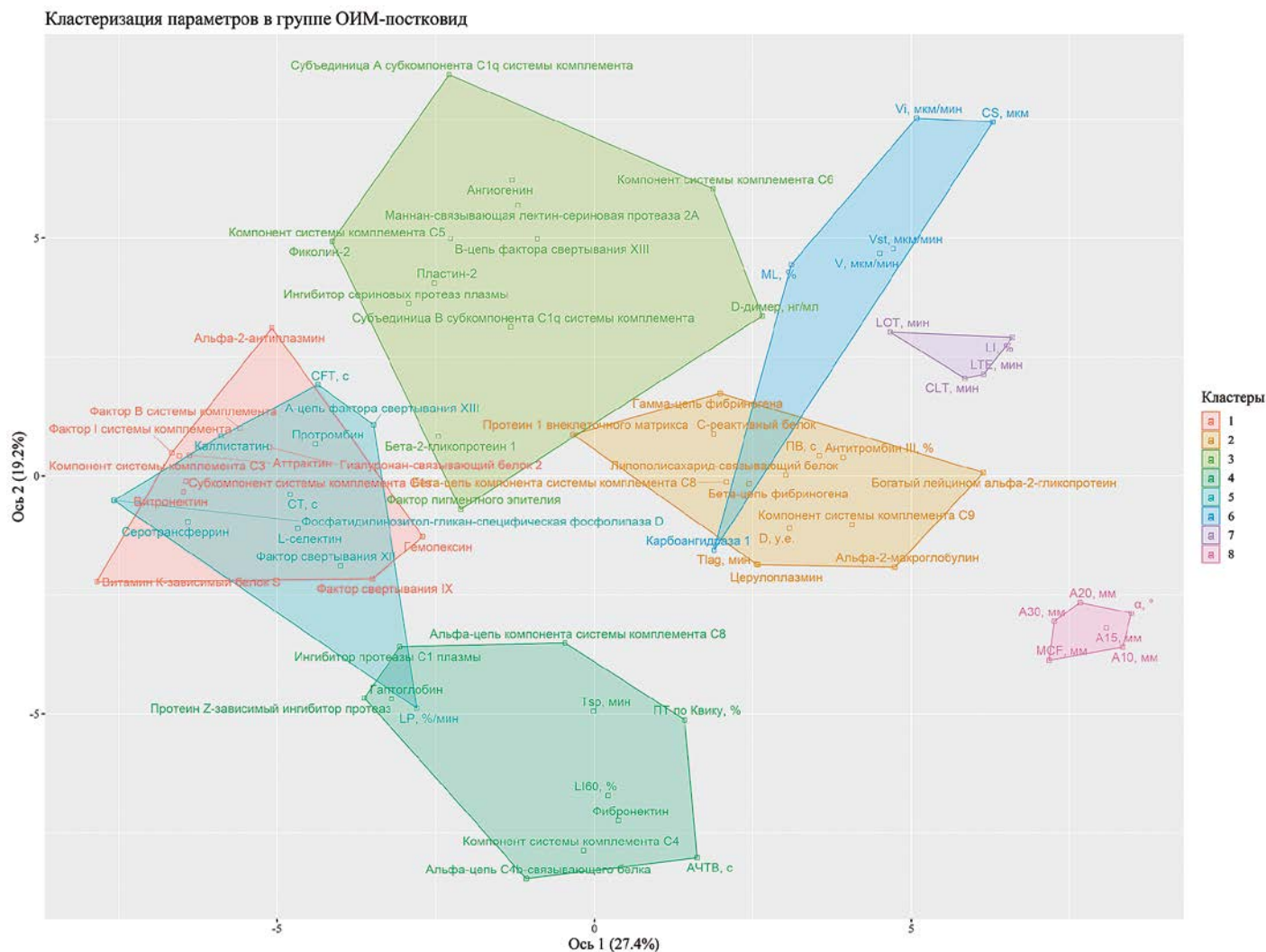
Белки, повышенный уровень которых зафиксирован одновременно в группе ОИМ-контроль (по сравнению

с контрольной) и ОИМ-постковид (по сравнению с обеими контрольными), формируют три отдельных кластера в группе ОИМ-контроль, и 85% из них включено в кластеры 1 и 5. В группе ОИМ-постковид данные белки включены в 4 отдельных кластера, преимущественно распределяются между кластерами 1 и 2 и формируют кластер 3. Белки, уровень которых повышен только в группе ОИМ-контроль по сравнению с группой контроль-контроль, формируют кластеры 1 и 5. Белки, повышенные только в группе ОИМ-постковид, распределены в основном между кластерами 3, 4 и 5.

Обсуждение

Известно, что коронавирусная инфекция часто сопровождается развитием сердечно-сосудистых осложнений, среди которых лидирующую по частоте позицию занимают венозные тромбозы и тромбоэмболии [1, 2]. Кроме того, по данным литературы, перенесенная инфекция SARS-CoV-2 ассоциирована с увеличением числа ОИМ

Рисунок 2 Б. Кластеризация параметров в группе пациентов ОИМ-постковид



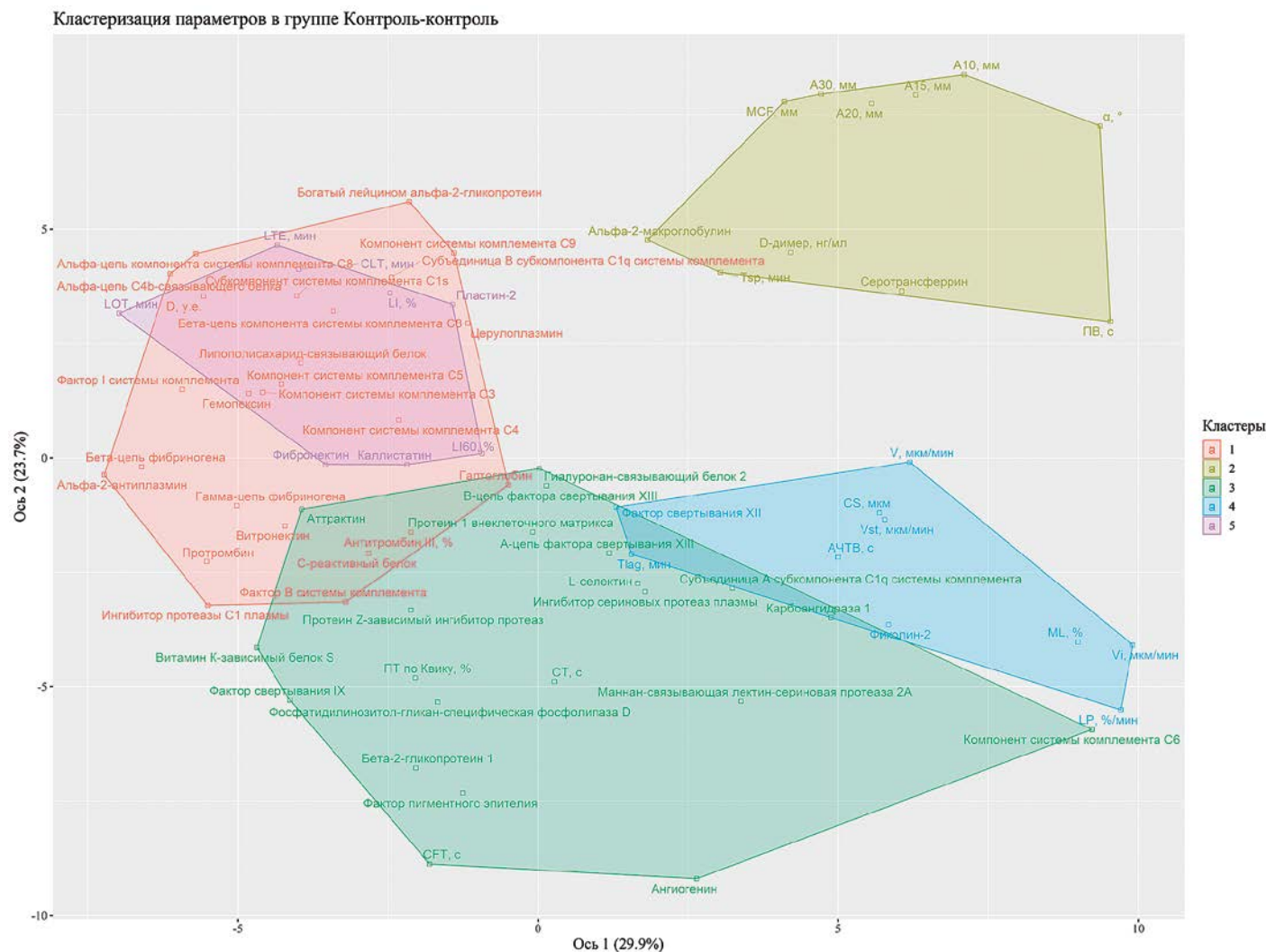
Кластеризация параметров тромбодинамики и ротационной тромбоэластометрии, коагулограммы и белков, вовлеченных в воспаление и гемостаз, компонентов системы комплемента и белков, влияющих на состояние эндотелия, в соответствующих группах.

среди населения [3, 4]. Точные механизмы, обуславливающие повышенную тромботическую активность в данной группе пациентов, еще не выяснены, в связи с чем их изучение стало целью нашей работы.

Задачей первого этапа анализа было выявить изменения протеома плазмы крови и системы гемостаза, обусловленные непосредственно развитием ОИМ. Для этого был проведен сравнительный анализ пациентов группы ОИМ-контроль со здоровыми добровольцами. Было обнаружено, что развитие ОИМ ассоциировано с повышением уровня ряда белков, участвующих в процессах воспаления (белки острой фазы и системы комплемента), гемостаза (как с про-, так и с антикоагулянтными свойствами) и регуляции функционального состояния эндотелия (PEDF, ангиогенин), а также у пациентов с ОИМ были более высокие значения скорости роста, размера и плотности тромба при измерении методами тромбоэластометрии и тромбодинамики. Ранее в литературе уже было описано наличие гиперкоагуляции при ОИМ, а также то, что повышение

концентрации некоторых прокоагулянтных белков (фибриноген, фактор свертывания IX) ассоциировано с высоким риском развития ОИМ [15]. При этом нами было выявлено, что для пациентов с ОИМ характерно наличие положительной корреляции острофазовых белков с параметрами гемостаза и протромбогенными белками, что указывает на наличие прямой функциональной взаимосвязи между процессами воспаления и свертывания у данных пациентов. Подобные взаимодействия между тромбообразованием и воспалением, в частности, работой системы комплемента, ранее уже были описаны [16]. Известно, что как система комплемента, так и гемостаз активируются посредством каскада протеолитических реакций и имеют ряд общих регуляторных белков, что обуславливает широкий диапазон возможных взаимодействий между ними [17]. Например, в различных стадиях каскада тромбообразования может принимать участие система комплемента [18], которая, в свою очередь, может быть активирована факторами плазменного звена гемостаза [17]. Кроме того,

Рисунок 2 В. Кластеризация параметров в группе пациентов контроль-контроль



Кластеризация параметров тромбодинамики и ротационной тромбоэластометрии, коагулограммы и белков, вовлеченных в воспаление и гемостаз, компонентов системы комплемента и белков, влияющих на состояние эндотелия, в соответствующих группах.

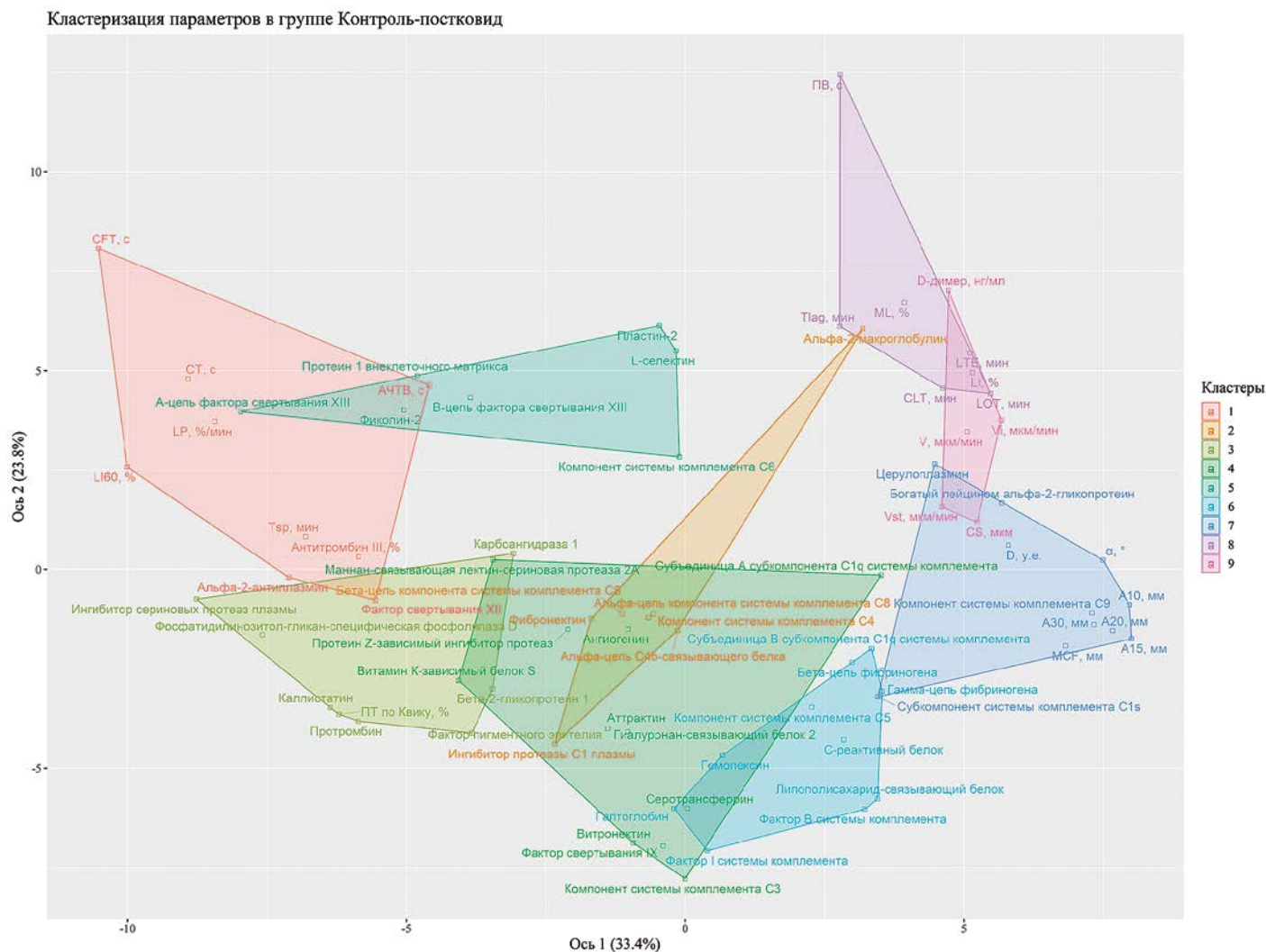
нами было показано, что для пациентов с ОИМ и здоровых добровольцев без инфекции SARS-CoV-2 в анамнезе, характерна положительная корреляция параметров фибринолиза с компонентами системы комплемента и острофазовым белком гаптоглобином. Ранее в литературе взаимосвязь данных систем уже была описана. Например, известно, что плазмин активирует C3- и C5-компоненты системы комплемента. При этом существуют данные, что плазмин способен отрицательно влиять на активацию системы комплемента, участвуя в расщеплении ее факторов [19]. Система комплемента, в свою очередь, регулирует активность фибринолиза посредством нескольких механизмов. Маннан-связывающая лектин-сериновая протеаза 2A повышает активность фибринолиза, а некоторые другие факторы системы комплемента ассоциированы с ростом скорости лизиса сгустка [20]. Другие воспалительные медиаторы также вовлечены в регуляцию фибринолиза [21].

Как было указано выше, пациенты с ОИМ имели более высокий уровень проангиогенного белка ангиогени-

на и антиангиогенного белка PEDF по сравнению со здоровыми добровольцами. Ангиогенин является одним из белков острой фазы [22], и его повышение может быть обусловлено гипоксией ткани при ОИМ [23]. PEDF обладает противовоспалительной и антитромботической активностью [24, 25], а также разнонаправленно регулирует проницаемость сосудистой стенки. Существуют данные, демонстрирующие его участие как в поддержании стабильности плотных контактов эндотелия после ОИМ [26], так и в повышении проницаемости эндотелиального слоя на лабораторной модели (HUVEC) [27]. Известно, что при ОИМ PEDF обладает кардиопротективным эффектом [28].

Задачей второго этапа анализа было определить влияние перенесенной SARS-CoV-2 инфекции на протеомный состав плазмы и функциональное состояние гемостаза у пациентов с ОИМ и здоровых добровольцев, для чего нами был проведен сравнительный анализ между группами ОИМ-постковид и ОИМ-контроль и группами кон-

Рисунок 2 Г. Кластеризация параметров в группе пациентов контроль-постковид



Кластеризация параметров тромбодинамики и ротационной тромбоэластометрии, коагулограммы и белков, вовлеченных в воспаление и гемостаз, компонентов системы комплемента и белков, влияющих на состояние эндотелия, в соответствующих группах.

троль-постковид и контроль-контроль. При сравнении групп пациентов с ОИМ были выявлены значимые различия в уровне воспалительных маркеров: пациенты группы ОИМ-постковид отличались меньшим уровнем острофазного липополисахарида-связывающего белка и ингибиторов системы комплемента (альфа-цепь С4b-связывающего белка, ингибитор протеазы С1 плазмы). Подобные различия могут быть обусловлены наличием ранее описанного в литературе остаточного хронического воспаления после COVID-19 [29]. Можно предположить, что в связи с сохраняющимся воспалением после SARS-CoV-2 инфекции, факторы иммунного ответа истощаются, и при наступлении острого сердечно-сосудистого события иммунная система не способна функционировать с той же степенью активности, что у пациентов без SARS-CoV-2 инфекции в анамнезе. В группе ОИМ-постковид по сравнению с группой ОИМ-контроль было также обнаружено более низкое содержание бета-цепи фибриногена, что соответствовало меньшей плотности

сгустка, измеренной методом тромбодинамики. Уровни антикоагулянтного витамин К-зависимого белка S и ингибитора его активности, альфа-цепи С4b-связывающего белка, были также ниже в группе ОИМ-постковид, что, предположительно, может быть обусловлено возникновением отрицательной обратной связи или снижением активности воспалительного ответа. В пользу данного вывода свидетельствует наличие положительной корреляции между витамин К-зависимым белком S и белками свертывания и воспаления, в особенности, системы комплемента. Кроме того, в группе ОИМ-постковид отсутствовали корреляции острофазовых белков с параметрами гемостаза и протромбогенными белками, которые мы наблюдали у пациентов с ОИМ без SARS-CoV-2 инфекции в анамнезе. Это может говорить о нарушенных взаимосвязях между процессами воспаления и свертывания у пациентов с ОИМ после COVID-19.

Как было описано выше, у пациентов с ОИМ отмечается повышенный уровень в крови кардиопротективно-

го белка PEDF. Интересным фактом оказалось, что у пациентов с ОИМ после COVID-19 уровень этого белка существенно ниже, чем у пациентов с ОИМ, не перенесших COVID-19. С одной стороны, изменения в концентрации PEDF могут быть следствием возникшего ранее нарушения активации иммунной системы и системы гемостаза и могут выполнять функцию маркера данного нарушения. С другой стороны, снижение уровня PEDF может повышать активность системы гемостаза, что связано с недостатком его антитромботической, противовоспалительной и эндотелий-защитной функций. Таким образом, кардиопротективный эффект PEDF может быть менее выраженным у пациентов с ОИМ после COVID-19, обуславливая более тяжелое течение ОИМ у данной группы пациентов.

Кроме того, в группе ОИМ-постковид по сравнению с группой ОИМ-контроль были быстрее лизис тромба и меньше его плотность при измерении методом тромбодинамики на бедной тромбоцитами плазме крови. Однако при измерении параметров гемостаза методом тромбоэластометрии на цельной крови подобных отличий не было. При этом, при измерении агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и тромбином, она была выше в группе ОИМ-постковид по сравнению с группой ОИМ-контроль, что может говорить о повышенной активации именно тромбоцитарного звена гемостаза у данной группы.

Подобные изменения в системе гемостаза были также выявлены при сравнении между собой контрольных групп. В группе контроль-постковид по сравнению с группой контроль-контроль были больше размеры и скорость образования тромба при измерении методом тромбоэластометрии на цельной крови, в то время как при измерении методом тромбодинамики на бедной тромбоцитами плазме отмечались меньшие размеры тромба, более низкие скорости его образования и более высокие скорости лизиса. При измерении агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой и тромбином, она была больше у пациентов группы контроль-постковид, что говорит о большей функциональной активности тромбоцитов в данной группе по сравнению с группой контроль-кон-

троль и объясняет полученные различия при измерении параметров тромбообразования различными методами в зависимости от наличия тромбоцитов в плазме крови. Учитывая схожие данные по функционированию системы гемостаза при сравнении между собой как пациентов с ОИМ, так и здоровых добровольцев, можно предположить, что данная особенность обусловлена именно недавно перенесенной инфекцией SARS-CoV-2.

Ограничения исследования

Концентрации белков протеомного состава плазмы, измеренные методом LC-MS/MS с MRM, только косвенно говорят об уровне их активности. Диагноз перенесенной SARS-CoV-2 инфекции устанавливался ретроспективно на основании данных о количестве anti-N IgG в крови, что не позволяет точно установить давность заболевания.

Заключение

Для пациентов с острым инфарктом миокарда, переболевших недавно COVID-19, характерна менее выраженная активация иммунного ответа по сравнению с пациентами с инфарктом миокарда, не переболевшими недавно COVID-19, что может быть обусловлено длительно сохраняющимся хроническим воспалением и истощением компонентов системы иммуноактивации после SARS-CoV-2 инфекции. Длительная активация системы гемостаза как у пациентов с инфарктом миокарда, так и у здоровых добровольцев после COVID-19, обусловлена преимущественно тромбоцитарным звеном гемостаза.

Финансирование

Исследование поддержано грантом Правительства Москвы на реализацию научно-практического проекта в медицине № 0803-5/23.

Конфликт интересов не заявлен.

Статья поступила 10.08.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Middeldorp S, Coppens M, Haaps TF, Foppen M, Vlaar AP, Müller MCA et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18(8):1995–2002. DOI: 10.1111/jth.14888
2. Raisi-Estabragh Z, Cooper J, Salih A, Raman B, Lee AM, Neubauer S et al. Cardiovascular disease and mortality sequelae of COVID-19 in the UK Biobank. *Heart*. 2023;109(2):119–26. DOI: 10.1136/heartjnl-2022-321492
3. Vasilyeva E.Yu., Elizarova A.K. The Impact of Previous Coronavirus Infection on the Risk of Developing Cardiovascular Diseases. *Creative Cardiology*. 2022;16(3):273–7. [Russian: Васильева Е.Ю., Елизарова А.К. Влияние перенесенной коронавирусной инфекции на риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. *Креативная кардиология*. 2022;16(3):273–7]. DOI: 10.24022/1997-3187-2022-16-3-273-277
4. Zuin M, Rigatelli G, Battisti V, Costola G, Roncon L, Bilato C. Increased risk of acute myocardial infarction after COVID-19 recovery: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cardiology*. 2023;372:138–43. DOI: 10.1016/j.ijcard.2022.12.032
5. Castanares-Zapatero D, Chalon P, Kohn L, Dauvrin M, Detolenaere J, Maertens De Noordhout C et al. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. *Annals of Medicine*. 2022;54(1):1473–87. DOI: 10.1080/07853890.2022.2076901
6. Kalinskaya A, Vorobyeva D, Rusakov G, Maryukhnich E, Anisimova A, Dukhin O et al. Targeted Blood Plasma Proteomics and Hemostasis Assessment of Post COVID-19 Patients with Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(7):6523. DOI: 10.3390/ijms24076523

7. Gaither C, Popp R, Mohammed Y, Borchers CH. Determination of the concentration range for 267 proteins from 21 lots of commercial human plasma using highly multiplexed multiple reaction monitoring mass spectrometry. *The Analyst*. 2020;145(10):3634–44. DOI: 10.1039/c9an01893j
8. Gaither C, Popp R, Zahedi RP, Borchers CH. Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry Enables Robust Quantitation of Plasma Proteins Regardless of Whole Blood Processing Delays That May Occur in the Clinic. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2022;21(5):100212. DOI: 10.1016/j.mcpro.2022.100212
9. Kayaaslan B, Eser F, Kalem AK, Kaya G, Kaplan B, Kacar D et al. Post-COVID syndrome: A single-center questionnaire study on 1007 participants recovered from COVID-19. *Journal of Medical Virology*. 2021;93(12):6566–74. DOI: 10.1002/jmv.27198
10. Chansaenroj J, Yorsaeng R, Posuwan N, Puenpa J, Wanlapakorn N, Sudhinaraset N et al. Long-term specific IgG response to SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in recovered COVID-19 patients. *Scientific Reports*. 2021;11(1):23216. DOI: 10.1038/s41598-021-02659-4
11. Meschi S, Colavita F, Bordi L, Matusali G, Lapa D, Amendola A et al. Performance evaluation of Abbott ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG immunoassay in comparison with indirect immunofluorescence and virus microneutralization test. *Journal of Clinical Virology*. 2020;129:104539. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104539
12. Korpálová B, Samoš M, Bolek T, Škorňová I, Kovář F, Kubisz P et al. Role of Thromboelastography and Rotational Thromboelastometry in the Management of Cardiovascular Diseases. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2018;24(8):1199–207. DOI: 10.1177/1076029618790092
13. Balandina AN, Serebriyskiy II, Poletaev AV, Polokhov DM, Gracheva MA, Koltsova EM 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
14. Halimeh S, Angelis GD, Sander A, Edelbusch C, Rott H, Thedieck S et al. Multiplate Whole Blood Impedance Point of Care Aggregometry: Preliminary Reference Values in Healthy Infants, Children and Adolescents. *Klinische Pädiatrie*. 2010;222(3):158–63. DOI: 10.1055/s-0030-1249081
15. Doggen CJM, Rosendaal FR, Meijers JCM. Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood*. 2006;108(13):4045–51. DOI: 10.1182/blood-2005-12-023697
16. Prydzial ELG, Leatherdale A, Conway EM. Coagulation and complement: Key innate defense participants in a seamless web. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:918775. DOI: 10.3389/fimmu.2022.918775
17. Luo S, Hu D, Wang M, Zipfel PF, Hu Y. Complement in Hemolysis- and Thrombosis- Related Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1212. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01212
18. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nature Medicine*. 2006;12(6):682–7. DOI: 10.1038/nm1419
19. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2008;632:71–9. DOI: 10.1007/978-0-387-78952-1_6
20. Jenny L, Noser D, Larsen JB, Dobó J, Gál P, Pál G et al. MASP-1 of the complement system alters fibrinolytic behaviour of blood clots. *Molecular Immunology*. 2019;114:1–9. DOI: 10.1016/j.molimm.2019.07.005
21. Bester J, Matshailwe C, Pretorius E. Simultaneous presence of hypercoagulation and increased clot lysis time due to IL-1 β , IL-6 and IL-8. *Cytokine*. 2018;110:237–42. DOI: 10.1016/j.cyt.2018.01.007
22. Olson KA, Verselis SJ, Fett JW. Angiogenin Is Regulated in Vivo as an Acute Phase Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;242(3):480–3. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7990
23. Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, Chong SS, Wong YC. Hypoxia Up-regulated Angiogenin and Down-regulated Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Secretion in Human Placental Trophoblasts. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2005;12(5):310–9. DOI: 10.1016/j.jsig.2005.02.010
24. Zamiri P, Masli S, Streilein JW, Taylor AW. Pigment Epithelial Growth Factor Suppresses Inflammation by Modulating Macrophage Activation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47(9):3912–8. DOI: 10.1167/iovs.05-1267
25. Takenaka K, Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Jinnouchi Y, Yoshida Y et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) administration inhibits occlusive thrombus formation in rats: A possible participation of reduced intraplatelet PEDF in thrombosis of acute coronary syndromes. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):25–33. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.07.041
26. Liang J, Luo Q, Shen N, Qin X, Jia C, Chao Z et al. PEDF Protects Endothelial Barrier Integrity during Acute Myocardial Infarction via 67LR. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2787. DOI: 10.3390/ijms24032787
27. He T, Zhao L, Zhang D, Zhang Q, Jia J, Hu J et al. Pigment Epithelium-Derived Factor Induces Endothelial Barrier Dysfunction via p38/MAPK Phosphorylation. *BioMed Research International*. 2015;2015:791825. DOI: 10.1155/2015/791825
28. Kato K, Yin H, Agata J, Yoshida H, Chao L, Chao J. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;285(4):H1506–14. DOI: 10.1152/ajp-heart.00270.2003
29. Holms R. Long COVID (PASC) Is Maintained by a Self-Sustaining Pro-Inflammatory TLR4/RAGE-Loop of S100A8/A9 > TLR4/RAGE Signalling, Inducing Chronic Expression of IL-1 β , IL-6 and TNF α : Anti-Inflammatory Ezrin Peptides as Potential Therapy. *Immunology*. 2022;2(3):512–33. DOI: 10.3390/immunology2030033