

Повреждение сосудистого эндотелия и эритроцитов у больных COVID-19

Л.И. Бурячковская^{✉1}, А.М. Мелькумянц¹, Н.В. Ломакин², О.А. Антонова¹, В.В. Ермишкин¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, Москва, Россия

Аннотация

Цель. Коронавирусная инфекция (COVID-19), вызванная РНК-вирусом SARS-CoV-2, характеризуется не только поражением дыхательного тракта, но и серьезными повреждениями эндотелия и нарушениями в системе гемостаза. Мы исследовали изменение картины клеточных элементов крови при поступлении больных в стационар и при выписке из него.

Материалы и методы. У 31 больного с подтвержденным диагнозом COVID-19 средней тяжести и тяжелого течения – 28 и 3 человек соответственно, проходивших лечение в специализированной клинике, брали кровь из кубитальной вены при поступлении и перед выпиской из стационара и исследовали ее с помощью сканирующей электронной микроскопии и поточной цитофлуометрии.

Результаты. Электронная микроскопия крови больных показала, что при поступлении в стационар у всех пациентов в крови присутствует значительное число (в 40–100 раз превышающее величину, характерную для здоровых лиц) циркулирующих, поврежденных вирусом эндотелиальных клеток. Эти клетки больных отличает присутствие на мембране многочисленных отверстий, сопоставимых по диаметру с размером суперкапсида вируса SARS-CoV-2, что доказывает факт проникновения вируса в эндотелиальную клетку, где он реплицируется, после чего выходит в кровоток. Результатом такого повреждения эндотелия является денудация сосудов, приводящая к увеличению их проницаемости, развитию отека тканей и воспаления, активации тромбоцитов и выраженному усилению тромбообразования. Такие нарушения сохраняются у части больных и при их выписке из стационара. Показано, что при COVID-19 происходит образование эритроцитарных монетных столбиков (сладжей), способных закупоривать микрососудистое русло, нарушая снабжение тканей кислородом. В крови 80,6% больных как при поступлении, так и при выписке наблюдалась выраженная трансформация части эритроцитов в эхиноциты.

Заключение. Несмотря на нормализацию основных лабораторных параметров, характерных для воспаления, негативные эффекты, вызванные вирусом, не элиминируются. Это может служить причиной возникновения так называемого постковидного синдрома, который поражает людей, переболевших COVID-19.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, электронная микроскопия, цитофлуометрия, десквамация эндотелия, циркулирующие эндотелиоциты, эритроцитарные сладжи, эхиноциты

Для цитирования: Бурячковская Л.И., Мелькумянц А.М., Ломакин Н.В., Антонова О.А., Ермишкин В.В. Повреждение сосудистого эндотелия и эритроцитов у больных COVID-19. Consilium Medicum. 2021; 23 (6): 469–476. DOI: 10.26442/20751753.2021.6.200939

ORIGINAL ARTICLE

Injury of vascular endothelium and erythrocytes in COVID-19 patients

Liudmila I. Buryachkovskaya^{✉1}, Arthur M. Melkumyants¹, Nikita V. Lomakin², Olga A. Antonova¹, Vladimir V. Ermiskin¹

¹National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia;

²Central Clinical Hospital with a Polyclinic, Moscow, Russia

Abstract

Aim. Caused by SARS-CoV2 virus coronavirus disease (COVID-19) is characterized not only by the lung deterioration but by serious injury of vascular endothelium and system of hemostasis. We investigated changes in blood cellular elements in patients at admission and discharge from the hospital. **Materials and methods.** Samples of venous blood of 31 patients of the hospital with a confirmed diagnosis of COVID-19 (28 with average and 3 with severe degree) were analyzed using electron microscopy and citofluometry. The blood was taken from cubital vein at admission and on discharge the patients.

Results. Electron microscopy showed that at admission to the hospital the number of circulating endothelial cells in all patients was significantly (40–100 times) greater compared to healthy persons. Numerous fenestrae are revealed in EC membrane. Their diameter comparable to the size of supercapsid in SARS-CoV-2 virus which attests the penetration of the virus into EC where it replicated and returned to circulation. As a result, the blood vessels denuded, their permeability increased resulting in tissue edema, inflammation, activation of the platelets, and pronouncedly augmented thrombosis. Infection with COVID-19 provoked formation of stacked (aggregated) red blood cells capable to clog microvascular bed and to diminish oxygen supply to the tissues. In some patients, such abnormalities persisted even on discharge from the hospital

Информация об авторах / Information about the authors

[✉]Бурячковская Людмила Ивановна – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ кардиологии». E-mail: livbur@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6186-4190

Мелькумянц Артур Маркович – д-р биол. наук, проф., вед. науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ кардиологии». ORCID: 0000-0003-2948-5382

Ломакин Никита Валерьевич – д-р мед наук, гл. внештат. специалист-кардиолог УД Президента РФ, рук. отд-ния неотложной кардиологии и кардиореанимации ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой». E-mail: lomakinnikita@gmail.com

Антонова Ольга Александровна – науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ кардиологии». ORCID: 0000-0001-5740-0409

Ермишкин Владимир Вячеславович – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБУ «НМИЦ кардиологии». ORCID: 0000-0002-3965-0233

[✉]Liudmila I. Buryachkovskaya – D. Sci. (Biol.), National Medical Research Center of Cardiology. E-mail: livbur@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6186-4190

Arthur M. Melkumyants – D. Sci. (Biol.), Prof., National Medical Research Center of Cardiology. ORCID: 0000-0003-2948-5382

Nikita V. Lomakin – D. Sci. (Med.), Central Clinical Hospital with a Polyclinic. E-mail: lomakinnikita@gmail.com

Olga A. Antonova – Res. Officer, National Medical Research Center of Cardiology. ORCID: 0000-0001-5740-0409

Vladimir V. Ermiskin – Cond. Sci. (Biol.), National Medical Research Center of Cardiology. ORCID: 0000-0002-3965-0233

Conclusion. Analysis of the blood on discharge from the hospital showed that despite normalization of basic hematological parameters characteristic of inflammation, the virus-induced negative effects were not entirely eliminated. These sequelae can provoke the post-COVID syndrome in patients who endured COVID-19.

Keywords: coronavirus disease, endothelium, circulating endotheliocytes, erythrocyte slages, electron microscopy, flow cytometry

For citation: Buryachkovskaya LI, Melkumyants AM, Lomakin NV, Antonova OA, Ermiskin VV. Injury of vascular endothelium and erythrocytes in COVID-19 patients. *Consilium Medicum*. 2021; 23 (6): 469–476. DOI: 10.26442/20751753.2021.6.200939

Введение

В конце 2019 г. в китайской провинции Хубей вспыхнула коронавирусная инфекция (COVID-19), охватившая в течение 2 мес весь мир (пандемия объявлена Всемирной организацией здравоохранения 11 марта 2020 г.). Вызывающий это заболевание одноцепочечный РНК-вирус SARS-CoV-2 приводит в 15–20% случаев к тяжелому поражению легких – двухсторонней вирусной пневмонии, сопровождающейся высокой лихорадкой, сильным сухим кашлем и высокой летальностью, поскольку пневмония часто осложняется острым респираторным дистресс-синдромом или полиорганной недостаточностью [1–5].

Однако по мере накопления клинического опыта стало понятно, что болезнь характеризуется не только поражением дыхательного тракта, но и серьезными нарушениями в работе сердечно-сосудистой системы (ССС), проявляющимися в виде острых инфарктов миокарда, инсультов, миокардитов, перикардитов и жизнеугрожающих нарушений сердечного ритма [5, 6]. Также инфекция сопровождается серьезными нарушениями в системе гемостаза, приводящими к развитию артериальных и венозных тромбозов [7]. Помимо поражения ССС болезнь часто характеризовалась острым поражением почек [8], печени, симптомами со стороны других органов желудочно-кишечного тракта [9], тяжелой неврологической симптоматикой [10]. Постепенно на основе клинического опыта и данных патологоанатомических исследований сложилось четкое представление о том, что тяжелые формы этой вирусной инфекции отличаются выраженной коагулопатией, гипоксией и дисфункцией эндотелия [11, 12]. И если первоначально все внимание клиницистов и исследователей было сосредоточено на нарушениях функции дыхания, состояния легких и сосудов малого круга, то уже к апрелю 2020 г. стало понятно, что особое внимание при попытках лечения этой патологии следует уделить нарушениям системы крови и кровообращения. Многие авторы стали рассматривать возникшее заболевание не только как пневмонию, но главным образом как коагулопатию и васкулит или более конкретно – эндотелиит [2]. Некоторые отечественные исследователи полагают, что для тяжелых случаев COVID-19 характерна клиническая картина диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови [13].

Представления об особой роли эндотелия в развитии патологических процессов при инфицировании вирусом SARS-CoV-2 имеют совершенно ясное основание. Еще в первых исследованиях нового коронавируса было установлено, что так же, как и его предшественник, вирус SARS-CoV, вызвавший в 2002 г. эпидемию атипичной пневмонии, в легких он связывается с локализуемым на бронхиальном и альвеолярном эпителии рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2-го типа (АПФ-2) [14]. Проходя через альвеолярно-капиллярную мембрану, вирус попадает в сосудистое русло и далее, перемещаясь с током крови, может достигнуть других органов, на эндотелии сосудов которых в достаточной мере представлен рецептор АПФ-2.

О справедливости такого предположения до настоящего времени свидетельствуют исключительно данные клинических наблюдений, биохимических анализов крови и патологоанатомических исследований [15]. В исследовании, результаты которого излагаются в этой статье, мы выяснили, как изменяются картина крови и состояние эндотелио-

цитов, включая их количество в венозной крови больных COVID-19, находящихся на лечении в специализированной клинике.

Материалы и методы

В одностороннее проспективное наблюдательное исследование включили больных (31 человек) с подтвержденным диагнозом COVID-19, проходивших лечение с 25.05.2020 по 22.07.2020 в ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой».

Перед добавлением в исследование, которое проводили в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией, пациенты подписывали информированное согласие своего участия. Протокол исследования одобрил локальный этический комитет ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой».

Состояние 28 пациентов, принявших участие в исследовании, при поступлении по данным компьютерной томографии легких и оксиметрии было средним, у 3 – тяжелым. Сведения о больных, включенных в исследование, приведены в табл. 1.

У всех участников исследования при поступлении определяли основные антропометрические параметры, температуру тела, состояние гемодинамики: частоту сердечных сокращений (ЧСС), артериальное давление и дыхательную функцию (частоту дыханий, насыщение артериальной крови кислородом – SpO₂). Регистровали ЭКГ и брали венозную кровь для клинического анализа, определения основных биохимических показателей (печеночные ферменты, креатинин, водородный показатель – рН, лактат), факторов воспаления (С-реактивный белок – СРБ, скорость оседания эритроцитов – СОЭ, фибриноген, интерлейкин-6, ферритин, прокальцитонин), а также для установления коагулологических параметров (D-димер, активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, активность анти-Ха).

Далее в ходе лечения у пациентов ежедневно фиксировали показатели, характеризующие функцию ССС и дыхательной системы, и не реже 1 раза в 3 дня повторяли забор крови для проведения анализов.

Таблица 1. Характеристика больных, включенных в исследование

Характеристика	Исходные данные (n=31)
Пол, абс. (%)	Мужчины – 19 (61,3), женщины – 12 (38,7)
Возраст, лет	59,3 (27–83)
ИМТ, кг/м ²	29,4 (19,2–42,0)
<i>Сопутствующие заболевания, абс. (%)</i>	
Онкология	7 (22,6)
Артериальная гипертензия	14 (45,2)
Сахарный диабет 2-го типа	2 (7,2)
Ишемическая болезнь сердца	4 (22,9)
Хроническая болезнь почек	1 (12,9)
Хроническая сердечная недостаточность	2 (7,2)
Хроническая обструктивная болезнь легких	2 (7,2)
Ожирение	6 (19,4)
Курение	1 (3,6)

Таблица 2. Основные регистрируемые параметры и данные анализов крови больных

	При поступлении (n=31)	Перед выпиской (n=31)	p
ЧСС, мин ⁻¹	85,2±2,7	76,2±1,9	<0,05
Частота дыхания, мин ⁻¹	17,8±0,9	17,0±0,7	n.s.
Температура, °C	37,6±0,3	36,5±0,4	<0,01
SpO ₂ , %	96,4±0,8	97,2±0,5	n.s.
Гемоглобин, г/л	135,2±3,9	128,4±2,7	n.s.
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,1±1,9	6,1±1,6	n.s.
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	189,5±9,6	236,1±10,8	<0,01
Лимфоциты, %	23,6±3,1	30,7±3,7	<0,05
Нейтрофилы, %	66,4±4,7	57,6±5,2	n.s.
СОЭ, мм/ч	28,2±1,9	23,5±1,7	<0,05
СРБ, мг/л	21,1±4,2	3,2±1,1	<0,01
Креатинин	91,9±2,9	90,0±2,6	n.s.
pH крови	7,34±0,02	7,38±0,02	n.s.
Лактат	2,7±0,5	3,1±0,4	n.s.
D-димер, нг/л	472,1±14,3	231,3±10,7	<0,01
Фибриноген, г/л	4,7±0,7	3,8±0,4	<0,05
Ферритин, мкг/л	247,4±18,2	363,1±22,3	<0,01

Примечание: n.s. – нет значимого различия.

Для лечения больных использовали противовирусные препараты (фавипиравир, гидроксихлорохин), ингибиторы активности провоспалительных цитокинов (тоцилизумаб, левилимаб, олокизумаб), кислород. Всем пациентам для предотвращения тромбообразования вводили подкожно низкомолекулярный гепарин (эноксапарин) в дозе 0,4–0,8 мл/сут, а 16 больным внутривенно – сулодексид (600 ЛЕ/сут).

Взятие крови для электронной микроскопии

Кровь больных при поступлении и перед выпиской из стационара брали из кубитальной вены в пробирки VACUETTE (Greiner Bio-One, Австрия) с 3,2% раствором цитрата натрия так, чтобы соотношение антикоагулянта к количеству крови было 1:9. Непосредственно после взятия 0,5 мл цельной крови предварительно фиксировали в 4,5 мл 0,1% глутарового альдегида (Sigma). После частичного оседания эритроцитов в течение 20 мин при комнатной температуре 20 мкл крови из верхнего слоя с клетками помещали в 300 мкл 2,5% глутарового альдегида для полного закрепления и дальнейшего исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии. В качестве подложек для рассмотрения использовали поликарбонатные фильтры (Isopore Membrane Filters) с диаметром 0,22–0,45 мкм. Такой подход позволил максимально сохранить все клетки крови и проводить подсчет их количества в заданном объеме. Для этого вырезали сегмент 1/4 фильтра, на котором осели клетки из объема 5 мкл крови, и среди них считали общее число эндотелиальных клеток (ЭК). Исследование проводили на сканирующем электронном микроскопе Inspect F50 FEI с энергодисперсионным спектрометром-анализатором Oxford X-Max 80.

Оценка количества циркулирующих ЭК в крови методом поточной цитофлуометрии

Для более точного определения количества циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в 1 мл венозной крови образцы крови исследовали на поточном цитометре FACS

Canto II (Becton Dickinson, США). Количество ЦЭК определяли методом последовательного гейтирования, который мы модифицировали так, что он позволял определять не только целостные, но и поврежденные ЭК*. При подсчете ЦЭК использовали флуоресцентные моноклональные антитела против антигенов CD45 (панлейкоцитарный маркер), CD42b (маркер для идентификации тромбоцитов) и CD31 (маркер ЭК). Модифицированный нами метод позволяет учитывать не только зрелые целостные ЭК, циркулирующие в крови, но и в том числе безъядерные клеточные «каркасы».

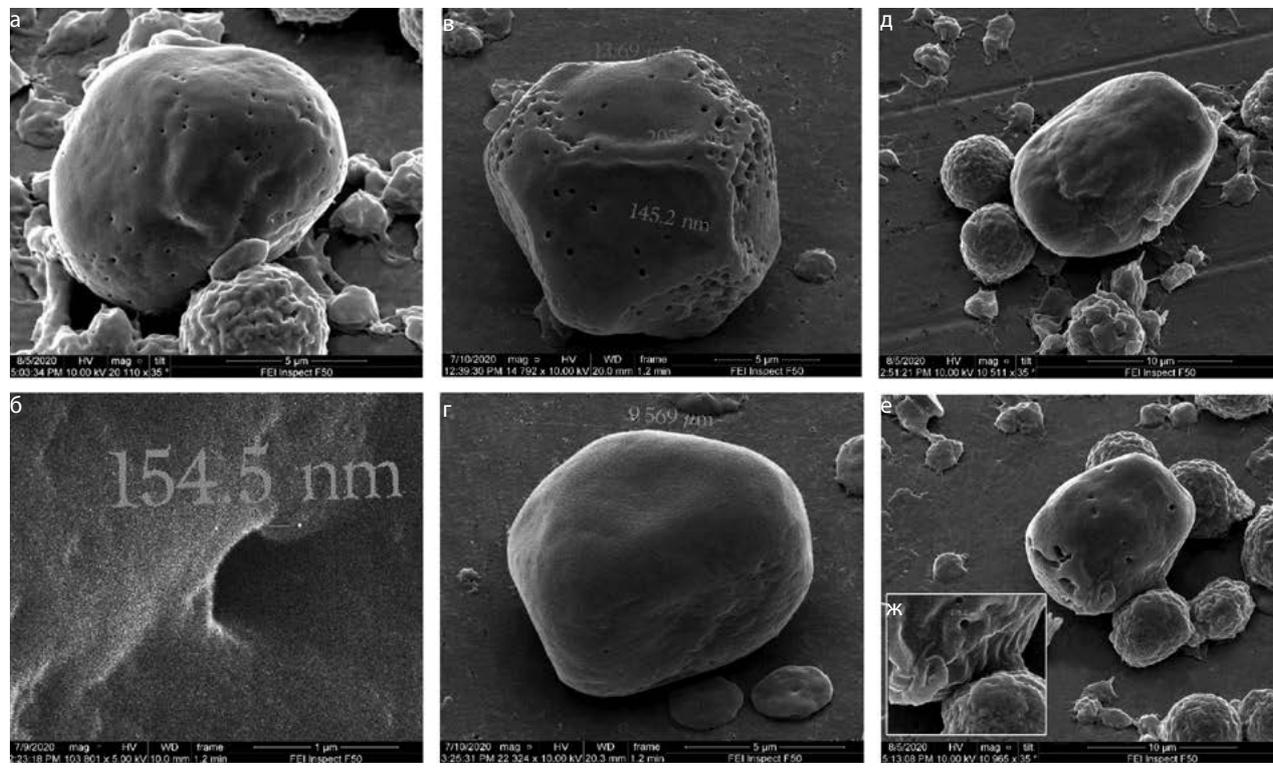
В 50 мкл образца цельной крови вносили антитела с флуоресцентной меткой, инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре, после чего для лизиса эритроцитов в пробу вносили 900 мкл холодной (4°C) бидистиллированной воды и пипетировали 20–30 с. Изотоничность клеточной суспензии восстанавливали внесением 300 мкл 0,6 М раствора хлорида натрия. Объем доводили до 2 мл раствором 2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma) в фосфатном буфере при pH 7.4. Далее клетки осаждали центрифугированием (300 г, 5 мин) при комнатной температуре и ресуспендировали для анализа в конечном объеме 300 мкл 1% раствора параформальдегида в 2% растворе бычьего сывороточного альбумина. Непосредственно перед анализом в пробу вносили 50 мкл частиц для счета размером 10 мкм с известной концентрацией (флуоросферы Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter, США). Сбор и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения CELLQuest (Becton Dickinson).

Статистическая обработка результатов

Все данные представлены в виде среднего значения (\pm) и средней ошибки среднего ($\pm m$). Поскольку особый интерес для нас представляли различия в значениях параметров при поступлении и при выписке больных, значения до начала и после окончания терапии сравнивали, используя непараметрический тест Манна–Уитни. Достоверным считали различие при $p < 0,05$.

*Способ определения количества циркулирующих эндотелиальных клеток и активированных тромбоцитов. Патентная заявка 2021105482, 03.03.2021.

Рис. 1. Эндотелиоциты в крови, взятой из кубитальной вены: а – ЭК больного COVID-19 с характерными отверстиями на мембране; б – отверстие в мембране той же клетки, соответствующее размеру суперкапсида вируса SARS-CoV-2 (ув. 103 тыс.); ЦЭК 2 клинически сходных больных (I – в и г; II – д, е и ж). Фотографии б и д сделаны при поступлении, г, е и ж – при выписке. У обоих больных при поступлении SpO₂ 97%, снижение СРБ в ходе лечения происходило в 3 раза, D-димера – в 2. Больной I прибыл в клинику на 9-й день от появления симптомов заболевания. ЦЭК при поступлении сильно повреждены вирусом (б), срок пребывания в больнице – 10 дней, ЦЭК перед выпиской с единичными повреждениями вирусом на мембране (г). Больной II поступил через 1 сут от появления симптомов заболевания. ЦЭК при попадании в клинику без повреждения мембраны вирусом (д), срок пребывания в стационаре 19 дней, мембраны ЦЭК перед выпиской повреждены вирусом (е). На вставке показано при большом увеличении: фагоцитоз ЦЭК нейтрофилами (ж) – ув. 130 тыс.; а, б, г, д, е – ув. 10 тыс.



Результаты

За время госпитализации ни один больной не был переведен в реанимацию и никому не потребовалась респираторная поддержка.

Основные данные измерений и лабораторных анализов крови, регистрируемых при поступлении больных в клинику и перед их выпиской после окончания терапии, представлены в табл. 2.

При поступлении лишь у 1 больного, состояние которого оценивалось по данным компьютерной томографии как тяжелое, SpO₂ было значительно ниже нормы (85%), а к моменту выписки этот показатель увеличился (до 97%). У всех остальных больных SpO₂ при поступлении фиксировалось от 94 до 98% и к моменту выписки либо увеличилось на 1%, либо осталось неизменным. Печеночные трансаминазы аланинаминотрансфераза и аспаратаминотрансфераза у всех больных были в пределах нормальных значений как при поступлении, так и при выписке.

На момент госпитализации у 3 больных температура тела была нормальной (от 36,0 до 36,6°C), а у 28 – значительно выше нормальных значений (37,1–39°C). При выписке ни у одного больного температура не превышала 37°C. Поскольку при повышении температуры происходит и повышение ЧСС, неудивительно, что нормализация температуры к моменту выписки привела к достоверному уменьшению ЧСС (в среднем на 9 уд/мин).

За время пребывания в стационаре, которое составляло 13,3±3,2 дня, наблюдалась нормализация маркеров воспаления, главным образом уровень СРБ уменьшился почти на порядок, приблизившись к нормальным значениям. Исключение составил 1 пациент, у которого СРБ как при поступлении, так и при выписке оставался значительно выше

нормы (5 мг/л). Это был тяжелый онкологический больной с циррозом печени, артериальной гипертензией, сахарным диабетом и ишемической болезнью сердца.

Достоверно уменьшились СОЭ, содержание фибриногена и D-димера, которые практически у всех больных достигли нормальных значений. Хотя за время пребывания в стационаре у 17 (55%) больных произошло увеличение уровня ферритина, что свидетельствовало о продолжении воспалительного процесса, к моменту выписки ни у кого он не превышал верхней границы нормы.

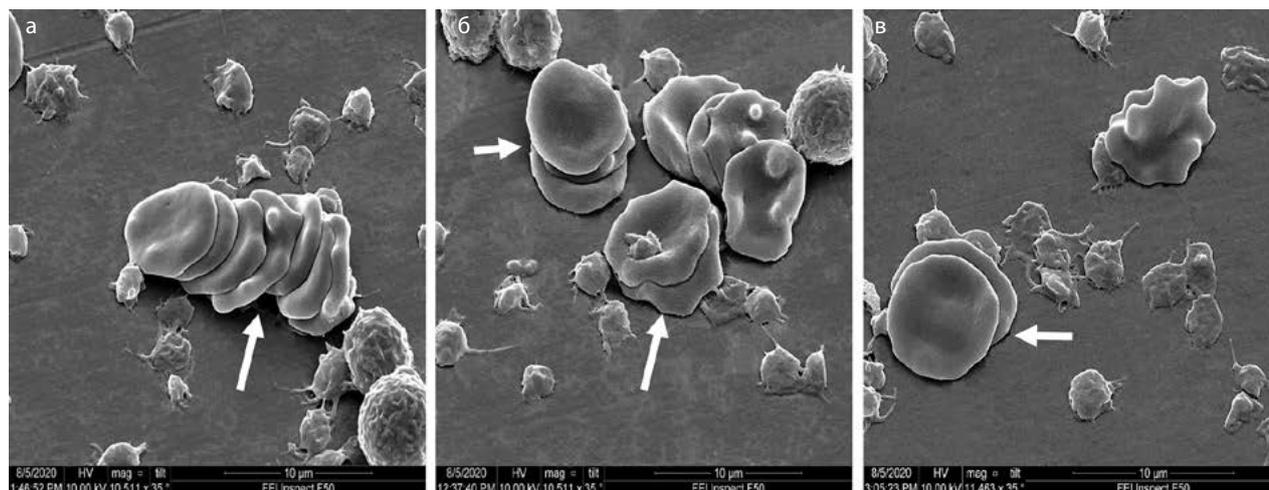
К характерным изменениям при тяжелом течении COVID-19 относятся незначительная тромбоцитопения и лимфопения [16]. Хотя в наше исследование были включены в основном больные со среднетяжелым течением заболевания, тем не менее при поступлении и у них отмечалось некоторое снижение числа тромбоцитов и лимфоцитов в периферической крови. За время пребывания в больнице наблюдалось небольшое, но достоверное увеличение содержания в крови как тромбоцитов, так и лимфоцитов.

Представленные данные в табл. 2 свидетельствуют о нормализации стандартных лабораторных показателей к моменту выписки больных из клиники. Выясним, соответствует ли этот вывод результатам анализа состояния клеток крови, проведенного методом электронной микроскопии.

Данные электронной микроскопии и цитофлуометрии при изучении ЦЭК

Во-первых, на что следует обратить внимание при визуализации крови больных, – большое количество ЦЭК. Электронограммы ЭК, обнаруженных в крови у пациентов до и после лечения, представлены на рис. 1. Во-вторых, нужно отметить многочисленные отверстия на мембране эндотелио-

Рис. 2. Сладжи, образованные эритроцитами: а – циркулирующий в венозной крови больного сладж из 8 эритроцитов в период поступления в клинику; б, в – более короткие сладжи у больных перед выпиской. Стрелками показаны сладжи разного размера. Ув. 10 тыс.



цитов (см. рис. 1, а, в, е). Эти отверстия имеют диаметр от 100 до 200 нм, что примерно соответствует диаметру суперкапсида вируса SARS-CoV-2 [17]. Это обстоятельство позволяет предполагать, что такие отверстия произведены многократно реплицировавшимся в ЭК вирусом, выходящим из поврежденной или убитой им клетки. Важно отметить, что эти отверстия характерны для ЦЭК как только что поступивших в клинику больных, так и для пациентов перед выпиской после проведенного лечения.

Физиологически ЭК постоянно обновляются, и в крови здорового человека в любой момент времени можно обнаружить некоторое количество ЦЭК [18]. Поскольку эндотелий реагирует практически на любые внешние воздействия и изменения состава крови, концентрация ЭК в крови непостоянна и у здоровых людей обычно составляет от 1–2 до 3–5 клеток/мл [19].

В нашем исследовании при электронном микрокопировании в образцах крови (объемом 5 мкл) больных при поступлении в клинику обнаруживалось от 0 до 8 ЭК. По результатам этих наблюдений, мы определили, что среднее число ЦЭК составляет $404,6 \pm 43,8$ клеток/мл. Понимая, что на основании подсчетов такое количество ЭК в малом объеме крови может быть отягчено значительной ошибкой, мы сравнили точность вычисления с данными, полученными с помощью модифицированного нами методом подсчета на проточном цитометре. Анализ количества ЭК в крови 10 здоровых добровольцев и 10 больных COVID-19 показал, что у здоровых доноров, соответствующих по возрасту, полу и индексу массы тела больным, число ЭК в крови составляло $4,69 \pm 1,48$ клеток/мл, а у больных – $376,43 \pm 22,84$ клеток/мл ($p < 0,001$).

Это сравнение не только выявило, что у больных COVID-19 происходит выраженное повреждение эндотелия, приводящее к денудации сосудов, но и стало доказательством того, что количественная оценка, основанная на данных электронной микроскопии, не отягчена значительной ошибкой, на что указывает сравнение результатов, полученных при электронной микроскопии и с помощью цитофлуориметрии ($404,6 \pm 43,8$ vs $376,43 \pm 42,4$, $p > 0,1$).

Оценка концентрации ЦЭК при выписке больных выявила отчетливое деление пациентов на 2 группы. У 24 пациентов число ЦЭК за время пребывания в больнице уменьшилось вдвое и более: с $368,42 \pm 18,58$ клеток/мл до $144,75 \pm 12,18$ ($p < 0,001$). В то же время у 7 больных число ЦЭК за время нахождения в клинике не только не уменьшилось, но и достоверно увеличилось – от $308,16 \pm 21,60$ до $392,07 \pm 23,17$ клеток/мл ($p < 0,05$).

Эритроциты больных COVID-19

Изменения, происходящие с эритроцитами у больных COVID-19, проявлялись прежде всего в образовании длинных эритроцитарных монетных столбиков (сладжей) и трансформацией формы эритроцитов, часть из которых превращалась из двояковогнутых дискоцитов в эхиноциты.

На рис. 2 представлены характерные для крови всех больных, включенных в исследование, сладжи, образованные эритроцитами.

Число эритроцитов в агрегатах, образующих сладж, у больных при поступлении в клинику находилось в диапазоне от 3 до 12 клеток (рис. 2, а). При выписке у 7 больных число клеток в сладже было от 3 до 5 клеток (см. рис. 2, б), а у 24 больных не превосходило 3 (см. рис. 2, в). Важно отметить, что длинные столбики сохранялись только у больных, показатель рН крови которых был ниже 7,35 (от 7,28 до 7,34). Таких пациентов было 17 (54,8%), а короткие столбики наблюдались у 14 (45,2%) больных, имевших рН от 7,36 до 7,54. При этом величина рН отрицательно коррелировала с концентрацией лактата в периферической крови ($r = -0,82$), что дает основание искать связь между числом и длиной сладжей и уровнем тканевой гипоксии.

Эхиноциты

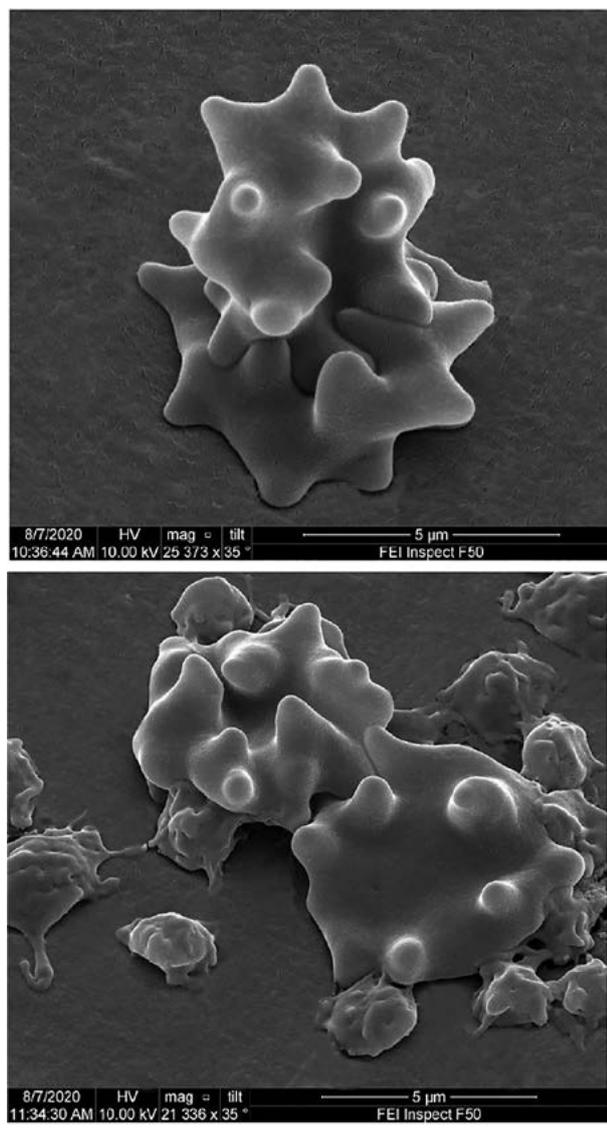
В крови 25 (80,6%) больных как при поступлении, так и при выписке наблюдалась выраженная трансформация части эритроцитов в эхиноциты (рис. 3). Доля эхиноцитов у этих больных составляла при поступлении в клинику $17,9 \pm 3,6\%$ от общего числа наблюдавшихся эритроцитов. При выписке эта доля достоверно уменьшалась до $12,1 \pm 2,1\%$, оставаясь тем не менее достаточно высокой ($p < 0,05$).

Обсуждение

В этом исследовании мы впервые в мире провели оценку состояния сосудистого эндотелия в крови при COVID-19 не после смерти человека и не на основе стандартных лабораторных анализов и клинических наблюдений, а опираясь на электронно-микроскопическое исследование крови больных, проходящих курс стационарного лечения. На наш взгляд, такой метод позволил выявить ранее неизвестные факты, характеризующие поражение эндотелия и нарушения в системе крови при COVID-19.

Следует обратить внимание в полученных нами результатах на необычайно высокое содержание ЦЭК в периферической крови. Начаты после классической работы R. Furchgott и соавт. [20] интенсивные исследования роли эндотелия в функционировании сосудистой системы по-

Рис. 3. Эхиноциты в венозной крови больных COVID-19 (ув. 25 тыс.).



казали, что этот монослой клеток выполняет важнейшие функции не только в регуляции сосудистого тонуса и деятельности системы гемостаза, но и при осуществлении иммунных реакций [21]. Это связано с тем, что эндотелиоциты являются объектом инфицирования со стороны большинства вирусов, а повреждение ЭК и их десквамация характерны для многих критических состояний, включающих активный иммунный ответ и сопровождающихся цитокиновым штормом [22]. К таким состояниям относится и COVID-19.

Особая роль эндотелия в распространении COVID-19 обусловлена тем, что рецептор АПФ-2, с которым связывается вирус SARS-CoV-2, экспрессируется на ЭК практически всех органов. Высокая экспрессия рецептора АПФ-2 выявлена на эпителиальных клетках альвеол легких и тонкого кишечника, на ЭК и гладкомышечных клетках сосудов всех органов, в базальном эпидермальном слое кожи и в слизистой оболочке полости рта и носа [23].

В результате складывается ясная картина распространения инфекции в организме человека. SARS-CoV-2, проникая через дыхательные пути в альвеолы, вызывает их поражение, нарушает целостность альвеолярно-капиллярного барьера, попадает в сосудистое русло малого круга и разносится током крови по всему организму, прикрепляясь и проникая в ЭК. Реплицируясь в ЭК, коронавирус убивает «притившую» клетку, которая отделяется от стенки сосу-

да, оголяя тромбогенную и провоспалительную субэндотелиальную поверхность [24]. Это в свою очередь приводит к развитию коагулопатии, периваскулярному воспалению, отеку тканей и прокоагулянтному статусу.

Однако далеко не все исследователи, изучающие особенности COVID-19, согласны с такой интерпретацией событий, происходящих после попадания вируса в нижние отделы легких. Ряд из них полагают, что «вирусный этап» болезни реализуется исключительно в легких, а сосудистый компонент заболевания имеет уже иммунную природу и реализуется вследствие того, что активировавшийся иммунный ответ поражает кровеносные сосуды всех органов во время цитокинового шторма и, соответственно, именно в этот период болезни происходит поражение самих органов.

Полученные нами данные позволяют отвергнуть эту трактовку развития заболевания, поскольку практически все ЦЭК имеют многочисленные отверстия на мембране (см. рис. 1), причем диаметр этих отверстий сопоставим с размером суперкапсида вируса SARS-CoV-2 [17]. Это наблюдение доказывает не только факт проникновения вируса в ЭК, но и его репликацию в них, что приводит к гибели ЭК, их десквамации с выходом в кровоток. Таким образом, «сосудистая стадия» заболевания происходит вследствие непосредственного разрушительного действия вируса на клетки сосудистого эндотелия.

Степень поражения сосудов, их денудация тесно связаны с количеством ЦЭК, обнаруживающихся в свободном виде в крови. В большинстве своем в научной литературе ЦЭК определяют как зрелые дифференцированные ЭК, в норме циркулирующие в кровотоке в незначительном количестве. Точное происхождение ЦЭК в настоящее время полностью не определено. Считается, что они вовлекаются в кровообращение в результате их нормального процесса рециркуляции в виде жизнеспособных клеток, а также в результате воздействия повреждающих факторов, сердечно-сосудистых нарушений или воспалительных заболеваний: иммуноопосредованных васкулитов, злокачественных новообразований и других [25], в результате чего, по многочисленным литературным данным, уровень ЦЭК в периферической крови повышается. Поэтому на сегодняшний день уровень ЦЭК в периферической крови считается отражением системного повреждения эндотелия и квалифицируется как достоверный и воспроизводимый маркер для оценки его повреждения/дисфункции [26].

То, что количество ЦЭК увеличивается при вирусных заболеваниях и особенно при сепсисе, было показано во многих работах [27]. Исследования концентрации ЦЭК у больных COVID-19 также показали значительное увеличение этого показателя: в среднем от 1–15 клеток/мл крови у здоровых людей до 40–50 клеток/мл у больных, находящихся на излечении в стационаре [28, 29].

Отметим два важных факта. Во-первых, концентрация ЦЭК (средние значения) была значимо больше у больных, находящихся в реанимации, чем у больных, получавших лечение в линейных отделениях [29]. Во-вторых, приведенные здесь цифры действительно являются средними значениями, разброс уровней ЦЭК от индивидуума к индивидууму очень большой. Пациенты, которые не находятся в реанимации, формируют 2 большие группы: 1-я – наиболее многочисленная, имеющая очень низкую концентрацию ЦЭК (меньше 20 кл/мл), и 2-я – концентрация ЦЭК составляет 200–300 кл/мл. Удивительно, но у больных, пребывающих в реанимации, таких цифр не встречается [29].

Данные, полученные в нашем исследовании, значительно отличаются от приведенных показателей. Наши средние результаты, характеризующие уровень ЦЭК (300–400 кл/мл), соответствуют максимальным величинам, подсчитанным другими авторами у отдельных пациентов [28, 29]. Заметим, что больные, включенные в наше исследование, не относи-

лись к категории тяжелых или критических, но тем не менее у них наблюдалась высокая степень десквамации эндотелия. По всей видимости, различия величин концентрации ЦЭК связаны с особенностями методов, использовавшихся в разных работах. Дело в том, что практически во всех исследованиях, посвященных анализу уровня ЦЭК при различных патологических состояниях, используется метод, при котором ЦЭК рассматриваются как зрелые, здоровые, полноценные и целостные ядерные клетки с экспрессией эндотелиального антигена. Однако еще в 1970-е годы ЦЭК были определены не только как интактные, содержащие ядра клетки, выделенные из лейкоконцентрата, но и как безъядерные клеточные «каркасы», выделенные из богатой тромбоцитами плазмы. Достаточно посмотреть на наблюдавшиеся нами при электронной микроскопии ЭК, чтобы понять, что в случае коронавирусной инфекции они как раз в большей степени представляют собой поврежденные клеточные «каркасы», которые вряд ли учитываются при рутинной реализации метода цитофлуометрии. Мы же при проточной цитометрии брали в расчет не только целостные ЭК, но и безъядерные клеточные «каркасы».

Сопоставляя оценки уровня ЦЭК, полученные при микроскопии крови больных и при помощи модифицированного цитофлуометрического метода, мы смогли убедиться в верности сделанной нами оценки. Результаты позволяют сделать вывод о том, что повреждение сосудов, вызываемое вирусом SARS-CoV-2, приводит к весьма значительной денудации сосудов, что неизбежно должно вызывать как нарушение нормального функционирования сосудистой системы, так и сдвиг параметров крови, приводящий к интенсивному внутрисосудистому тромбообразованию и изменениям эритроцитов, сопровождающихся нарушением газообмена в органах и тканях и в конечном счете – выраженной гипоксии.

О поражении системы крови, развивающемся при COVID-19, наиболее ярко свидетельствует большое количество эритроцитарных сладжей, циркулирующих в крови (см. рис. 2). Известно, что если короткие (2–3 клетки) эритроцитарные сладжи могут присутствовать в крови здоровых людей, то длинные столбики, состоящие из десятка клеток, образуются при увеличении концентрации белков острой фазы, таких как фибриноген и СРБ. Мощным стимулятором агрегации эритроцитов, приводящей к образованию длинных сладжей, является нарушение кислотно-щелочного равновесия, приводящее к закислению крови, что часто встречается у больных COVID-19.

Остановимся на двух важных обстоятельствах. Первое заключается в том, что агрегация эритроцитов обратима, и при удалении факторов, стимулирующих «склеивание» эритроцитов (восстановление нормального pH крови, снижение уровня белков острой фазы), столбики становятся короче и в конце концов распадаются до отдельных эритроцитов. Мы наблюдали значимое уменьшение длины монетных столбиков по окончании лечения в клинике по сравнению с их длиной при поступлении (см. рис. 2). Такое изменение числа клеток, образующих сладж, было вполне естественно, так как в ходе лечения происходила нормализация факторов, вызывающих агрегацию эритроцитов: значительно уменьшался уровень СРБ и фибриногена, восстанавливалось кислотно-щелочное равновесие. Уменьшение длины и количества эритроцитарных агрегатов сопровождалось достоверным снижением СОЭ, поскольку эта величина в большой мере зависит от наличия и длины склеившихся эритроцитов. Однако такая картина наблюдалась отнюдь не у всех больных. Для некоторых пациентов на момент выписки были характерны и довольно длинные (3–4 клетки) эритроцитарные агрегаты (см. рис. 2, б).

Второе обстоятельство имеет, на наш взгляд, очень важное значение. Дело в том, что образовавшие монетный столбик эритроциты вряд ли способны проходить через кровеносные капилляры. Отдельные эритроциты «протискиваются» через капилляр, диаметр которого (4–5 мкм)

меньше диаметра красных кровяных клеток (7 мкм) исключительно благодаря их необычайно высокой деформируемости. Утратившие способность хорошо деформироваться эритроциты элиминируются из кровотока именно потому, что больше не способны проходить через капилляры и пополнять свою основную функцию – доставлять кислород из капилляров в ткани и удалять из тканей избыток углекислого газа. Образовавшие агрегаты эритроциты, а также эхиноциты не обладают столь высокой деформируемостью, чтобы проходить через капилляры и потому переходят из артериальной части сосудистого русла в венозную по артериовенозным анастомозам. Газообмен в этих сосудах-перемычках не происходит, кислород в ткани не поступает, вследствие чего развивается гипоксия. Очевидно, однако, что эта гипоксия связана не с нарушением газообмена в легких (гипоксическая гипоксия), а с неполноценностью переносчика (гемическая гипоксия). Это позволяет объяснить, почему состояние больных при поступлении признается достаточно тяжелым, отмечаются очевидные признаки гипоксии тканей, но при этом SpO_2 часто находится в пределах нормы (больше 95%). Такая ситуация также свидетельствует в пользу утверждения о том, что COVID-19 только на ранних этапах протекает как легочная патология, но по мере развития болезни все большее значение приобретает сосудистый компонент.

Наконец, мы считаем необходимым отметить следующее обстоятельство. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, биохимические показатели, характеризующие состояние воспаления, к моменту выписки больных из клиники практически пришли в норму. Больные не нуждались в респираторной поддержке, как, впрочем, и при поступлении в стационар, и субъективно чувствовали себя вполне нормально. Основным симптомом у выписываемых больных была слабость, что является естественным проявлением интоксикации после вирусной инфекции.

Однако изучение взятой при выписке крови больных с помощью электронной микроскопии показывает у части (22%) этих выписываемых из клиники пациентов наличие сохраняющихся нарушений клеток крови. Во-первых, за время пребывания в стационаре у них увеличилась концентрация ЦЭК, что указывает на продолжающееся развитие васкулита. Во-вторых, в крови этих больных сохраняются многоклеточные эритроцитарные сладжи (см. рис. 2). Нет сомнений, что эти больные нуждаются в дальнейшем лечении, поскольку в данном случае мы, по-видимому, имеем дело с так называемым постковидным синдромом. Именно у этой категории больных следует, на наш взгляд, ожидать тяжелых последствий в период после выписки из стационара.

Нам непонятно, каким образом можно вычленил эту группу больных, поскольку, как мы отмечали, ни субъективная оценка состояния, ни рутинные анализы крови не указывают на продолжающееся развитие воспалительного процесса. Однако этот вопрос, по нашему мнению, должен привлечь особое внимание исследователей и клиницистов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Благодарности. Мы признательны компании «Нанопромимпорт» (Научный парк ФГОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»), лично его главе Вячеславу Голкову и инженеру Игорю Богданову за высокопрофессиональную техническую поддержку. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 19-015-00213).

Acknowledgments. We are grateful to "Nanopromimport" (Science Park of the Lomonosov Moscow State University), personally to its head Vyacheslav Golkov and engineer Igor Bogdanov for highly professional technical support. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant 19-015-00213).

Литература/References

- Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727-33. DOI:10.1056/NEJMoa2001017
- Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *N Engl J Med*. 2020;383(2):120-8. DOI:10.1056/NEJMoa2015432
- Thompson BT, Chambers RC, Liu KD. Acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2017;377(6):562-72. DOI:10.1056/NEJMra1608077
- Zaim S, Chong JH, Sankaranarayanan V, Harky A. COVID-19 and multi-organ response. *Curr Probl Cardiol*. 2020;45(8):100618. DOI:10.1016/j.cpcardiol.2020.100618
- Kochi AN, Tagliari AP, Forleo GB, et al. Cardiac and arrhythmic complications in patients with COVID-19. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2020;31(5):1003-8. DOI:10.1111/jce.14479
- Маев И.В., Шпектор А.В., Васильева Е.Ю., и др. Новая коронавирусная инфекция COVID-19: экстрапульмональные проявления. *Терапевтический архив*. 2020;92(8):4-11 [Maev IV, Shpektor AV, Vasilyeva EYu, et al. Novel coronavirus infection COVID-19: extrapulmonary manifestations. *Terapevticheskiy Arkhiv (Ter. Arkh.)*. 2020;92(8):4-11 (in Russian)]. DOI:10.26442/00403660.2020.08.000767
- Zhai Z, Li C, Chen Y, et al. Prevention and treatment of venous thromboembolism associated with coronavirus disease 2019 infection: a consensus statement before guidelines. *Thromb Haemost*. 2020;120(6):937-48. DOI:10.1055/s-0040-1710019
- Battle D, Soler MJ, Sparks MA, et al. Acute kidney injury in COVID-19: emerging evidence of a distinct pathophysiology. *JASN*. 2020;31(7):1380-3. DOI:10.1681/ASN.2020040419
- Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(5):428-30. DOI:10.1016/S2468-1253(20)30057-1
- Sepehrinezhad A, Shahbazi A, Negah SS. COVID-19 virus may have neuroinvasive potential and cause neurological complications: a perspective review. *J Neurovirol*. 2020;26:324-9. DOI:10.1007/s13365-020-00851-2
- Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020;395(10234):1417-8. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30937-5
- O'Sullivan JM, Mc Gonagle D, Ward S.E., et al. Endothelial cells orchestrate COVID-19 coagulopathy. *Lancet Haematology*. 2020;7(8):e553-5. DOI:10.1016/S2352-3026(20)30215-5
- Воробьев П.А., Момот А.П., Зайцев А.А., и др. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови при инфекции COVID-19. *Терапия*. 2020;6(5):25-34 [Vorobev PA, Momot AP, Zaitsev AA, et al. Sindrom disseminirovannogo vnutrisosudistogo svertyvaniia krovi pri infektsii COVID-19. *Terapiia*. 2020;6(5):25-34 (in Russian)]. DOI:10.18565/therapy.2020.5.25-34
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80.e8. DOI:10.1016/j.cell.2020.02.052
- Патологическая анатомия COVID-19. Атлас. Под ред. О.В. Заратьянца. М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2020 [Pathological anatomy of COVID-19. Atlas. Ed. Zayratyants OV. Moscow: GBU "NIIOZMM DZM", 2020 (in Russian)].
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-20. DOI:10.1056/NEJMoa2002032
- Haddad G, Bellali S, Fontanini A, et al. Rapid scanning electron microscopy detection and sequencing of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 and other respiratory viruses. *Front Microbiol*. 2020;11:596180. DOI:10.3389/fmicb.2020.596180
- Hladovec J, Rossmann P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thromb Res*. 1973;3(6):665-74. DOI:10.1016/0049-3848(73)90014-5
- Lanuti P, Simeone P, Rotta G, et al. A standardized flow cytometry network study for the assessment of circulating endothelial cell physiological ranges. *Sci Rep*. 2018;8(1):5823. DOI:10.1038/s41598-018-24234-0
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
- Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell*. 2011;146(6):980-91. DOI:10.1016/j.cell.2011.08.015
- Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Amer J Emerg Med*. 2008;26(6):711-5. DOI:10.1016/j.ajem.2007.10.031
- Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004;203(2):631-7. DOI:10.1002/path.1570
- Fraga-Silva RA, Sorg BS, Wankhede M. ACE2 activation promotes antithrombotic activity. *Mol Med*. 2010;16(5):210-5. DOI:10.2119/molmed.2009.00160
- Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol*. 2000;65(4):215-20. DOI:10.1034/j.1600-0609.2000.065004215.x
- Fadini GP, Avogaro A. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovasc Res*. 2010;87(1):2-21. DOI:10.1093/cvr/cvq119
- Moussa MD, Santonocito C, Fagnou D. Evaluation of endothelial damage in sepsis-related ARDS using circulating endothelial cells. *Intensive Care Med*. 2015;41(2):231-8. DOI:10.1007/s00134-014-3589-9
- Mancuso P, Gidaro A, Gregato G, et al. Circulating endothelial progenitors are increased in COVID-19 patients and correlate with SARS-CoV-2 RNA in severe cases. *J Thromb Haemost*. 2020;18(10):2744-50. DOI:10.1111/jth.15044
- Guervilly C, Burtey S, Sabatier F. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID-19. *J Infect Dis*. 2020;222(11):1789-93. DOI:10.1093/infdis/jiaa528

Статья поступила в редакцию / The article received: 21.05.2021

Статья принята к печати / The article approved for publication: 14.06.2021



OMNIDOCTOR.RU