

На правах рукописи

Иванов Иван Валерьевич

**Нарушения в системе гемостаза при COVID-19 в условиях
экстракорпоральной мембранной оксигенации**

3.1.12. Анестезиология и реаниматология (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в государственном бюджетном учреждении города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Журавель Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

Бабаев Максим Александрович – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отделения реанимации и интенсивной терапии II Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского»;

Клыпа Татьяна Валерьевна – доктор медицинских наук, заместитель главного врача по анестезиологии – реанимации, заведующая кафедрой анестезиологии и реаниматологии Академии постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно – клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико – биологического агентства».

Ведущая организация

федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2023 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 21.1.044.01 при ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27.

С диссертацией можно ознакомиться в ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27 и на сайте www.vishnevskogo.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета
доктор медицинских наук

Сапелкин Сергей Викторович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

COVID-19 (coronavirus disease 2019) – новое инфекционное респираторное заболевание человека, вызываемое одноцепочечным, РНК-положительным вирусом SARS-COV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), появившееся внезапно и в короткий срок распространившееся повсеместно. 11 марта 2020 года ВОЗ объявила пандемию COVID-19.

Анализ течения случаев предшествующих респираторных вирусных инфекций (грипп А(Н1N1), middle east respiratory syndrome (MERS)) позволил сделать вывод о снижении смертности у данных пациентов при использовании экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО). ВОЗ, Организацией экстракорпорального жизнеобеспечения (ELSO), Министерством здравоохранения Российской Федерации (МЗ РФ) в свою очередь было рекомендовано использование ЭКМО у тяжелых пациентов, не имеющих достаточного для поддержания жизни эффекта от оптимальных режимов искусственной вентиляции легких, предполагая не только улучшение газообмена, но и минимизацию вентиляционно-индуцируемой травмы легких, баротравмы, токсического эффекта кислорода [Tillmann BW et al., 2017]. По данным ряда авторов, отбор пациентов происходил и происходит достаточно скрупулезно, включая всестороннюю оценку предполагаемого исхода [Sromicki J et al., 2021]. По данным ELSO к середине 2022 года по всему миру было зарегистрировано 14216 случаев использования методики ЭКМО у пациентов с COVID-19, смертность которых составила в среднем 50%.

Немалый вклад в увеличение смертности вносят последствия тяжелых нарушений системы гемостаза. По данным публикаций о пациентах с COVID-19 на ЭКМО, частота встречаемости клинически значимых случаев тромбозов (в том числе компонентов экстракорпорального контура) и/или кровотечений близка к 100% при проведении стандартной антикоагулянтной терапии [Beuys C et al., 2020, Guo Z et al., 2021]. В докладе ELSO по данным, предоставленным 276 специалистами ЭКМО из 98 госпиталей 30 разных стран, сообщается о том, что в

13% случаев дальнейшее продолжение процедуры ЭКМО у пациентов с COVID-19 становилось невозможным по причине массивных кровотечений, преимущественно внутричерепных [Mang S et al., 2021].

Таким образом, поиск оптимальной схемы коррекции нарушений системы гемостаза при использовании ЭКМО у пациентов с COVID-19 является одной из важнейших задач, стоящих перед специалистами.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения пациентов с COVID-19 в условиях экстракорпоральной мембранной оксигенации путем снижения частоты осложнений, связанных с нарушениями в системе гемостаза.

Задачи исследования:

1. Исследовать структуру нарушений гемостаза при COVID-19 у критических пациентов при проведении ЭКМО.
2. Изучить динамику системного воспаления и состояния эндотелия при COVID-19 в условиях ЭКМО.
3. Изучить частоту тромбгеморрагических осложнений при проведении ЭКМО у пациентов с COVID-19.
4. Определить роль антитромбина-III при проведении ЭКМО у пациентов с COVID-19.

Научная новизна

Впервые определены особенности изменений системы гемостаза при COVID-19 в условиях ЭКМО.

Впервые проведена оценка динамики системного воспаления и состояния эндотелия при COVID-19 в условиях ЭКМО.

Впервые установлена частота и структура осложнений тромботического и геморрагического характера у пациентов с COVID-19 в условиях ЭКМО.

Впервые оценена роль антитромбина-III в системе коагуляции у пациентов с COVID-19 в условиях ЭКМО и эффективность его использования.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость заключается в выявлении патофизиологических механизмов развития ЭКМО – ассоциированных осложнений тромботического и геморрагического характера.

Применение результатов исследования в клинической практике позволит уменьшить число осложнений, ассоциированных с нарушениями системы коагуляции.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Пациентам с COVID-19 при проведении ЭКМО свойственно гипокоагулянтное состояние системы гемостаза.
2. При COVID-19 в условиях ЭКМО у пациентов имеют место нарушения функции эндотелия независимо от динамики системного воспалительного ответа.
3. Наибольший риск осложнений тромботического и геморрагического характера, ассоциированных с проведением ЭКМО у пациентов с COVID-19, наблюдается в первую неделю интенсивной терапии.
4. Антитромбин-III является ведущим компонентом в предотвращении тромбозов при проведении ЭКМО при COVID-19.

Апробация результатов

Апробация работы состоялась на заседании проблемно-плановой комиссии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» 02.08.2022 г.

Основные положения диссертационной работы доложены на следующих конгрессах и конференциях:

1. XIX Съезд федерации анестезиологов и реаниматологов, 9 – 11 октября 2021 года, г. Москва.
2. XIX Всероссийская научно – образовательная конференция «Рекомендации и индивидуальные подходы в анестезиологии и реаниматологии», секция молодых ученых, 18 мая 2022 года, г. Москва
3. II Совместный съезд РОСЭКТ и РосЭКМО, 30 сентября – 1 октября 2022 года, г. Москва.

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанная в результате проведенного исследования схема диагностики, профилактики развития и коррекции ЭКМО – ассоциированных осложнений тромботического и геморрагического характера успешно внедрена в рутинную клиническую практику ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

Личный вклад автора

Соискатель разработал дизайн исследования, самостоятельно осуществил набор клинического материала. Автор лично выполнил работу по систематизации и статистической обработке полученных данных, проанализировал и интерпретировал полученные результаты, а также подготовил материалы к публикациям. Полученные данные автор представил в виде рисунков и таблиц. На основании полученных результатов были сформулированы выводы и даны практические рекомендации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа на тему «Нарушения в системе гемостаза при COVID-19 в условиях экстракорпоральной мембранной оксигенации» соответствует специальности 3.1.12. «Анестезиология и реаниматология».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 2 работы в виде статей в журналах, рецензируемых Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации и получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, включая 19 рисунков и 23 таблицы, и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 187 источников, из них 9 отечественных и 178 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Данное исследование представляет собой открытое одноцентровое, ретроспективно-проспективное исследование эффективности и безопасности изменений системы коагуляции и антикоагулянтной терапии у пациентов с COVID-19 в условиях ЭКМО, проведенное на базе инфекционного корпуса COVID-19 ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» в период с марта 2020 г. по март 2022 г. В качестве исследуемой популяции были выбраны пациенты с тяжелым течением COVID-19, находившиеся в ОРИТ и требовавшие ЭКМО-поддержки. Включено 100 пациентов с подтвержденным диагнозом НКИ COVID-19 методом ПЦР и КТ признаками пневмонии, находящихся на ЭКМО-поддержке: 72 мужчины и 28 женщин в возрасте от 26 до 75 лет, медиана 55 лет [IQR 47; 60]. Во всех наблюдениях проводилась ВВ-ЭКМО. Причиной развития дыхательной недостаточности, потребовавшей проведения ВВ-ЭКМО была COVID-19-ассоциированная пневмония в 100 (100%) наблюдениях. После подтверждения соответствия всем критериям включения и отсутствию критериев исключения пациенты были рандомизированы в 2 группы: группа пациентов со стандартной антикоагулянтной терапией, согласно Временным методическим рекомендациям (ВМР) МЗ РФ по профилактике, диагностике и лечению COVID-19, и группа применения антитромбина-III в дополнение к стандартной антикоагулянтной терапии.

Для достижения поставленной цели и решения сформулированных задач дизайн исследования предполагал анализ клинико-лабораторных данных пациентов в течение первых 7 суток проведения ЭКМО. В этот период времени у пациентов реализуются действительно COVID-19 ЭКМО-ассоциированные осложнения тромботического и геморрагического характера, а не осложнения, ассоциированные, например, с вторичной бактериальной внутрибольничной инфекцией. Кроме того, важно отметить, что первые 7 суток проведения представляют собой период времени, в течение которого ЭКМО проводилась у

подавляющего большинства пациентов, вошедших в исследование. Соответственно, именно в этот период получен наибольший объем данных о состоянии системы гемостаза. Для обеспечения возможности проведения последующего статистического анализа период проведения ЭКМО во всех наблюдениях был разделен на 24-часовые интервалы. Каждый такой 24-часовой интервал начинался срезом лабораторных данных, включавшим в себя все мониторируемые лабораторные параметры. Таким образом, в каждом отдельном клиническом наблюдении, вошедшем в исследование, количество анализируемых срезов не превышало 7. Все 24-часовые интервалы затем были разделены на 2 группы в зависимости от факта развития COVID-19 ЭКМО-ассоциированного геморрагического осложнения, а так же на 2 группы в зависимости от факта развития COVID-19 ЭКМО-ассоциированного тромботического осложнения в течение этого 24-часового интервала.

При развитии COVID-19 ЭКМО-ассоциированного кровотечения или тромбоза фиксировали срез, непосредственно предшествовавший этому 24-часовому интервалу и сутки от начала момента ЭКМО. Фиксация суток от момента начала процедуры, в которые происходило развитие COVID-19 ЭКМО-ассоциированных геморрагических и тромботических осложнений, позволила сохранить временную шкалу и динамику изменений изучаемых показателей системы гемостаза в привязке ко времени проведения экстракорпоральной поддержки жизнедеятельности. Наглядно дизайн исследования представлен на рисунке 1.

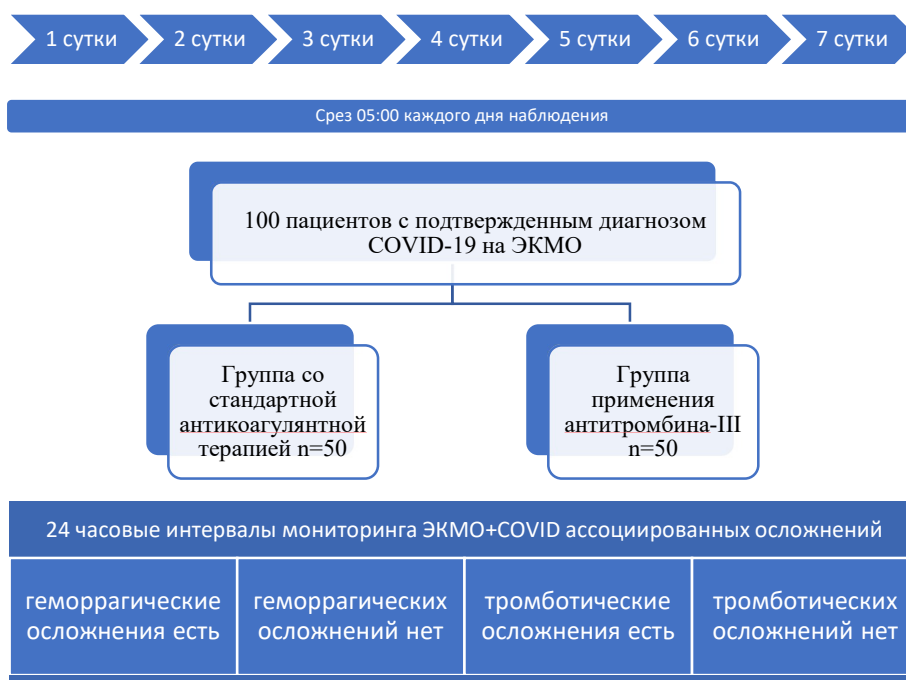


Рисунок 1. Дизайн исследования.

Клинический метод оценки состояния пациента

Клиническая оценка состояния пациента производилась ежедневно и включала в себя оценку неврологического статуса, физикального осмотра. Состояние всех пациентов оценивали при помощи шкал: RESP – при подключении ЭКМО, SOFA – ежедневно. В каждом наблюдении отмечали COVID-19 ЭКМО-ассоциированные геморрагические и тромботические осложнения. Диагноз COVID-19 пневмонии устанавливался строго в соответствии с актуальными временными рекомендациями МЗ РФ и международными рекомендациями.

Методы лабораторной диагностики

Общий (клинический) анализ венозной крови выполняли на гематологическом анализаторе «ADVIA 2120i», «Bayer», (США) в цельной венозной крови, биохимический анализ в сыворотке крови на биохимическом анализаторе «AU 2700» «Beckman Coulter», (США) с применением реактивов фирмы «Beckman Coulter», США. Исследования состояния системы гемостаза выполняли на автоматическом коагулометре «ACL TOP-700», Instrumentation laboratory, (США). Интегральная оценка гемостаза производилась с помощью

ручного метода тромбозластометрии на компьютерном тромбозластометре Rotem Delta, «Pentapharm», (Германия). Исследование кислотно-основного состояния и газов крови проводили на анализаторе «ABL 800», «RADIOMETER», (Дания) в артериальной или смешанной венозной крови. Целевые значения мониторируемых параметров соответствовали актуальным временным рекомендациям МЗ РФ.

Методы интенсивной терапии

ЭКМО начинали строго в соответствии с актуальными на момент подключения временными рекомендациями МЗ РФ и проводили ее на аппаратах ROTAFLOW (Maquet, Германия), STOCKERT, MEDOS DELTASTREAM, CARDIONHELP (Maquet, Германия). Для проведения выполняли канюляцию бедренной вены (канюля 21, 23, 25 Fr) для забора неоксигенированной крови из нижней полой вены и канюляцию внутренней яремной вены справа (канюля 17, 19, 21 Fr) для возврата оксигенированной крови в правое предсердие. Сразу после канюляции болюсно вводили 35-50 Ед/кг нефракционированного гепарина. При ВВ-ЭКМО начальный поток крови устанавливали на уровне 30-50/мл/кг идеальной массы тела, с последующей коррекцией потока под контролем параметров оксигенации (PaO_2 60-80 мм рт.ст., SpO_2 88-94%) для ВВ-ЭКМО и параметров гемодинамики (АД ср. 65-75 мм рт.ст., SvO_2 65-75%), снижение лактата ниже 2 ммоль/л. Фракция кислорода в дыхательной смеси аппарата ЭКМО составляла 100%. Поток газа на аппарате ЭКМО достигали нормакапнии.

Концентрат АТ-III использовали при формировании резистентности к гепарину и/или снижении антитромбина-III менее 60%. Трансфузию концентрата тромбоцитов производили при тромбоцитопении менее 80-100 10⁹/л, снижении MSF_{ex} и/или нормальном уровне MSF_{fib} . Трансфузию криопреципитата проводили при уменьшении плазменной концентрации фибриногена менее 1,5, снижении MSF_{fib} менее 7 мм.

Доза гепарина подбиралась под контролем АЧТВ. При отсутствии геморрагических либо тромботических осложнений целевыми значениями АЧТВ были 55-70 сек. При развитии COVID-19 ЭКМО ассоциированных

геморрагических осложнений корректировалась антикоагулянтная терапия, а доза гепарина снижалась вплоть до нуля под контролем показателей гемостаза.

Методы статистического анализа

Учет полученных в ходе исследования данных проводился с помощью персонального компьютера на операционной системе Windows 10 при помощи программы «Microsoft Excel 2007». Статистическая обработка данных производилась с использованием среды для статистических вычислений R 3.6.3 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия) и пакета lme4 1.1-21, а также пакета STATISTICA 12 (Starsoft, США). Проверка нормальности распределения количественных признаков проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Большинство данных в проведенном исследовании не соответствует нормальному распределению, для анализа количественных признаков использовались непараметрические критерии Манна-Уитни. Количественные данные представлены в виде медианы (M) и квартилей (25%;75%). Для сравнения количественных переменных использовался тест Краскела-Уоллиса, в качестве post hoc метода использовался тест Данна с поправкой Холма для множественных сравнений. Корреляционный анализ проводился с использованием коэффициента корреляции (ρ) Спирмена. Ассоциацию считали статистически значимой при $p < 0,05$. Анализ различий в группах для количественных признаков проводился с использованием критерия χ^2 . Проверка статистических гипотез и наличие статистической значимости устанавливалось при значении $p < 0,05$. Пороговые значения были оценены на основе J-статистики Юдена. Использовался коэффициент асимметрии и, если он больше 2-х, то проводилась log-трансформация. Описательные статистики представлены в виде среднего (стандартное отклонение) и медианы (1-й и 3-й квартили). При анализе количественных переменных с выраженной правосторонней асимметрией (коэффициент асимметрии > 2) последние подвергались log₂-трансформации. Для анализа динамики показателей использовались смешанные линейные регрессионные модели с использованием базисных сплайнов 2-го порядка ($df = 3$).

Для анализа ассоциации риска развития тромбоза и кровотечения использовались робастные GEE-модели (generalized estimating equation) с использованием базисных сплайнов 2-го порядка ($df = 3$). Для сравнения групп использовались смешанные линейные регрессионные модели.

Результаты исследования и их обсуждение

На фоне проведения ЭКМО и соответствующей антикоагулянтной терапии было установлено, что в общей группе пациентов с COVID-19 на ЭКМО статистически значимо АЧТВ увеличивалось в среднем на 2.37 секунд [ДИ 95% - 2.38; 7.11] каждый день ($p = 0.0208$). Тромбоциты в среднем снижались на $27.00 \times 10^9/\text{л}$ [ДИ 95% -31.58; -22.42] в сутки. Протромбин по Квику в среднем уменьшался в 0.94 раза [ДИ 95% 0.89; 0.98] каждый день. Фибриноген в среднем уменьшался в 0.91 раза [ДИ 95% 0.86; 0.96] каждый день. Динамика показателей тромбоэластограммы свидетельствовала о снижении плотности сгустка (таблица 1).

Таблица 1. Динамика показателей гемостаза у пациентов с COVID-19 в условиях ЭКМО

| Показатель | Δ/FC [95% ДИ] | p |
|------------------------------|-----------------------------|---------|
| АЧТВ [Δ] | 2,37 [-2,38; 7,11] | 0,0208 |
| Антитромбин-III [Δ] | -2,42 [-6,12; 1,29] | 0,3395 |
| Тромбоциты $\times 10^9$ [Δ] | -27,00 [-31,58; -22,42] | <0,0001 |
| Протромбин по Квику [FC] | 0,94 [0,89; 0,98] | 0,0132 |
| МНО [FC] | 1,06 [1,02; 1,10] | 0,0101 |
| ПВ [FC] | 1,06 [1,02; 1,09] | 0,0092 |
| Тромбин. Вр. [Δ] | 1,26 [-6,32; 8,84] | 0,2602 |
| Фибриноген [FC] | 0,91 [0,86; 0,96] | 0,0001 |
| МСF-Инт [Δ] | -3,17 [-5,70; -0,64] | 0,0263 |
| МСЕ-Экст [Δ] | -17,02 [-28,21; -5,82] | 0,0011 |
| МСF-Геп [Δ] | -0,45 [-4,24; 3,34] | 0,0414 |

Изменения показателей гемостаза у критических пациентов с COVID-19 в условиях ЭКМО носили непредсказуемый характер, их коррекция и достижение баланса тяжело достижимы и тактика стандартных рекомендаций не позволяла добиться стабилизации.

Для оценки выраженности системной воспалительной реакции, состояния эндотелия и наличия оксидативного стресса было проведено динамическое исследование ряда маркеров, так как помимо самой методики ЭКМО все вышеперечисленные факторы влияют на состояние системы гемостаза у пациентов с COVID-19 (таблица 2).

В первые 7 суток с момента подключения ЭКМО было установлено отсутствие прогрессирования окислительного стресса (1 сутки Ме 1,42 [0,9; 1,7] ммоль/л, 3 сутки Ме 1,46 [0,96; 1,71] ммоль/л, 7 – Ме 1,49 [1,17; 1,87] ммоль/л) при сохраняющихся высоких значениях малонового диальдегида (1 сутки Ме 3,87 [3,36; 4,23] нмоль/мл, на 3 сутки Ме 3,93 [3,5; 4,3] нмоль/мл, на 7 суток – Ме 3,83 [3,38; 4,40] нмоль/мл) и нарастании дисфункции эндотелия (Δ оксида азота = -0.85 [-2.89; 1.19], $p=0,0173$).

Таблица 2. Динамика маркеров повреждения эндотелия и окислительного стресса.

| Характеристика | 1 сутки N = 55 | 3 сутки N = 45 | 7 суток N = 36 | p |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| NOx, 20-40 мкмоль/л | | | | 0,0979 |
| Среднее (СтО) | 12,4 (13,2) | 13,0 (9,5) | 16,0 (11,4) | |
| Медиана [ИКР] | 8,0 [4,8; 14,4] | 9,3 [5,1; 20,0] | 13,7 [6,4; 21,4] | |
| АСЕ, 20-70 ед | | | | 0,4099 |
| Среднее (СтО) | 35,1 (17,5) | 33,2 (20,8) | 32,2 (21,6) | |
| Медиана [ИКР] | 32,2 [20,9; 49,4] | 27,6 [18,8;38,8] | 26,6 [16,4; 39,5] | |
| NOx/АСЕ | | | | 0,0627 |
| Среднее (СтО) | 1,1 (1,8) | 1,4 (2,8) | 1,5 (1,4) | |
| Медиана [ИКР] | 0,6 [0,3; 1,0] | 0,7 [0,4; 1,2] | 0,8 [0,5; 2,0] | |
| MDA, $\geq 1,2$ нмоль/мл | | | | 0,0835 |
| Среднее (СтО) | 3,8 (0,6) | 3,9 (0,6) | 4 (0,9) | |
| Медиана [ИКР] | 3,87 [3,36; 4,23] | 3,93 [3,5; 4,3] | 3,83 [3,38; 4,40] | |
| TAS, 1,5-2,75 ммоль/л | | | | 0,2311 |
| Среднее (СтО) | 1,36 (0,6) | 1,39 (0,6) | 1,5 (0,7) | |
| Медиана [ИКР] | 1,42 [0,9; 1,7] | 1,46 [0,96;1,71] | 1,49 [1,17; 1,87] | |

Адекватная оксигенация и базовая терапия позволяли поддерживать приемлемый уровень системы антиоксидантной защиты; приемлемый, но не оптимальный, так как снижалась вазопротективная функция оксида азота, нарушалась регуляция сосудистого тонуса, формировались благоприятные условия для тромбообразования вследствие эндотелиальной дисфункции.

У пациентов, подключенных к ЭКМО, уже в первые сутки уровень С-реактивного белка (СРБ) был повышен – среднее значение составило $31,9 \pm 39$ мг/мл, медиана 11,5 [2,1; 49,5] мг/мл; и далее этот показатель статистически значимо возрастал ($p=0,0002$). Тогда как значения расчетных гематологических индексов PLR и SII, ассоциирующихся в литературе с тяжелым течением COVID-19, статистически значимо снижались в ходе лечения ($p < 0,0001$) (таблица 3).

По динамике СРБ активность воспалительного процесса нарастала (в первые сутки Me 11,5 [2,1; 49,5] мг/мл, к третьим суткам Me 44,4 [5,3; 90,8] мг/мл, а к седьмым – Me 76,3 [25,3; 162,5] мг/мл), однако гематологические маркеры (отношение нейтрофилов к лимфоцитам, отношение тромбоцитов к лимфоцитам и системный иммуно-воспалительный индекс), ассоциированные с тяжестью течения COVID-19 снижались (SII в 1 сутки – Me 3,836.0 [1,880.7; 6,383.5], на 3 сутки – Me 2,099.2 [905.9; 3,393.4], на 7 сутки – Me 1,256.4 [682.4; 2,716.9]). Динамика гематологических маркеров свидетельствовала о сдерживании инфекционного процесса, повреждающего форменные элементы крови и эндотелий.

Причинами роста СРБ могли служить как активация системного воспалительного ответа в результате контакта крови с неэндотелизированной поверхностью магистралей ЭКМО, так и давление сдвига на разных участках контура и механическим разрушением форменных элементов подвижной частью центрифужного насоса, а также присоединение вторичной бактериальной инфекции.

Таблица 3. Динамика маркеров воспалительного ответа.

| Характеристика | 1 сутки N = 55 | 3 сутки N = 45 | 7 сутки N = 36 | p |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|--------------------|---------|
| СРБ г/л | | | | 0,0002 |
| Среднее (СтО) | 31,9 (39,0) | 67,1 (77,2) | 99,3 (83,6) | |
| Медиана [ИКР] | 11,5 [2,1; 49,5] | 44,4 [5,3; 90,8] | 76,3 [25,3; 162,5] | |
| лейк. X10 ⁹ кл/л | | | | 0,9152 |
| Среднее (СтО) | 14,7 (8,0) | 14,2 (7,9) | 14,0 (7,2) | |
| Медиана [ИКР] | 14,9 [8,6; 19,9] | 13,1 [8,3; 18,2] | 13,7 [8,6; 18,4] | |
| эозин. % | | | | 0,0513 |
| Среднее (СтО) | 0,5 (0,5) | 1,0 (1,1) | 1,2 (1,7) | |
| Медиана [ИКР] | 0,3 [0,2; 0,8] | 0,6 [0,2; 1,5] | 0,4 [0,2; 1,4] | |
| лимф. % | | | | 0,3833 |
| Среднее (СтО) | 5,5 (4,8) | 5,6 (4,1) | 6,9 (6,2) | |
| Медиана [ИКР] | 4,2 [2,4; 6,7] | 5,3 [2,8; 7,8] | 5,7 [3,2; 8,3] | |
| Ne/Ly NLR | реф. инт. = 0,88-4,0 | | | 0,3661 |
| Среднее (СтО) | 29,2 (22,4) | 31,9 (33,7) | 25,1 (24,8) | |
| Медиана [ИКР] | 22,0 [13,3; 38,4] | 16,8 [11,3; 32,9] | 15,9 [10,0; 27,0] | |
| Tr/Ly PLR | реф. инт. = 49-198 | | | <0,0001 |
| Среднее (СтО) | 397 (344) | 270 (309) | 162,4 (184) | |
| Медиана [ИКР] | 318 [160; 499] | 182 [97; 304] | 109,2 [82; 166] | |
| TrNe/Ly SII | реф. инт. = 142-804 | | | <0,0001 |
| Среднее (СтО) | 4649 (4266) | 3137 (4240) | 1815 (1576) | |
| Медиана [ИКР] | 3836 [1880; 6383] | 2099 [905; 3393] | 1256 [682; 2716] | |

Для того чтобы проследить взаимосвязь воспалительного ответа с повреждением эндотелия была оценена корреляция соответствующих маркеров. Нами была выявлена статистически значимая слабая положительная корреляция концентрации С-реактивного белка и оксида азота. Иными словами, интенсивность воспалительного процесса увеличивалась пропорционально увеличению NO – маркера повреждения эндотелия. Отрицательная средней силы корреляция оксида азота с соотношением тромбоциты/лимфоциты и системным иммуно-воспалительным индексом означает что снижение протективной функции оксида азота ассоциировалось с более тяжелым течением коронавирусного заболевания (таблица 4).

Была установлена корреляционная связь между активностью оксида азота и уровнем гематологических маркеров, ассоциированных с тяжелым течением и

неблагоприятным исходом COVID-19: оксид азота/соотношение «Тромбоциты/Лимфоциты» $R = -0,45$ [95% ДИ $-0,68; -0,15$], $p = 0,0059$ и оксид азота/соотношение «Тромбоциты x Нейтрофилы / Лимфоциты» $R = -0,41$ [95% ДИ $-0,65; -0,09$], $p = 0,0146$.

Таблица 4. Корреляция маркеров повреждения эндотелия и маркеров воспалительного ответа (метод Спирмена).

| Показатель | Сутки | СРБ | лейк. | Ne/Ly | Tr/Ly | TrNe/Ly |
|------------|---------|---|---------------------------------|---|--|--|
| NOx | 1 сутки | 0,28 [0,02; 0,51] p=0,0360 | -0,02 [-0,29; 0,24] p=0,8651 | -0,19 [-0,43; 0,08] p=0,1705 | -0,21 [-0,45; 0,06] p=0,1291 | -0,19 [-0,43; 0,08] p=0,1610 |
| | 3 сутки | 0,25 [-0,05; 0,51] p=0,0986 | 0,03 [-0,27; 0,32] p=0,8545 | -0,07 [-0,35; 0,23] p=0,6669 | -0,22 [-0,48; 0,08] p=0,1422 | -0,24 [-0,50; 0,05] p=0,1051 |
| | 7 сутки | 0,16 [-0,18; 0,46] p=0,3622 | -0,08 [-0,40; 0,25] p=0,6222 | -0,31 [-0,58; 0,02] p=0,0640 | -0,45 [-0,68; -0,15] p=0,0059 | -0,41 [-0,65; -0,09] p=0,0146 |
| ACE | 1 сутки | -0,15 [-0,41; 0,12] p=0,2699 | -0,03 [-0,30; 0,24] p=0,8446 | -0,06 [-0,33; 0,21] p=0,6546 | 0,04 [-0,24; 0,30] p=0,7889 | 0,05 [-0,22; 0,32] p=0,7096 |
| | 3 сутки | -0,05 [-0,34; 0,25] p=0,7444 | -0,19 [-0,46; 0,11] p=0,2104 | 0,02 [-0,27; 0,31] p=0,8907 | 0,10 [-0,20; 0,38] p=0,5153 | -0,03 [-0,32; 0,26] p=0,8212 |
| | 7 сутки | -0,22 [-0,51; 0,12] p=0,2001 | 0,19 [-0,15; 0,49] p=0,2658 | 0,22 [-0,12; 0,51] p=0,2025 | -0,01 [-0,34; 0,32] p=0,9649 | 0,12 [-0,22; 0,43] p=0,4944 |
| NOx/ACE | 1 сутки | 0,29 [0,03; 0,52] p=0,0323 | -0,03 [-0,30; 0,24] p=0,8266 | -0,05 [-0,32; 0,22] p=0,6967 | -0,14 [-0,40; 0,13] p=0,3126 | -0,16 [-0,41; 0,12] p=0,2591 |
| | 3 сутки | 0,29 [-0,00; 0,54] p=0,0511 | 0,14 [-0,16; 0,41] p=0,3757 | -0,04 [-0,33; 0,25] p=0,7823 | -0,30 [-0,54; -0,00] p=0,0475 | -0,24 [-0,50; 0,06] p=0,1176 |
| | 7 сутки | 0,25 [-0,09; 0,53] p=0,1484 | -0,16 [-0,47; 0,18] p=0,3455 | -0,33 [-0,59; 0,00] p=0,0506 | -0,32 [-0,58; 0,01] p=0,0596 | -0,34 [-0,60; -0,01] p=0,0435 |

В настоящем исследовании у 50 пациентов на фоне проведения ЭКМО вводились препараты АТ-III, в 50 случаях АТ-III не вводился. В группе с применением препаратов активность АТ-III была в среднем в каждые наблюдаемые сутки закономерно на 23% выше по сравнению с пациентами, не получавшими препарат ($p = 0,0001$). Препарат АТ-III вводился пациентам с более грубой

тромбоцитопенией, среднесуточный уровень которой был ниже на 29 тыс. кл/мкл по сравнению с пациентами другой группы ($p=0,0189$).

Для сравнительной межгрупповой оценки частоты тромбгеморрагических осложнений, с учетом множественного характера последних у части пациентов, были применены обобщенные смешанные модели (GEE, Generalized Linear Model), позволявшие учитывать наличие нескольких событий у одного пациента. Применение препаратов АТ-III в лечении тяжелой коронавирусной инфекции на фоне проведения ЭКМО снижало шанс развития тромбозов в 0,450 раза 95%ДИ [0,448; 0,451] на высоком уровне значимости $p<0,0001$, а шанс развития кровотечений – в 0,578 раза 95%ДИ [0,330; 1,012] на недостаточном уровне значимости $p=0,0551$ (95%-й доверительный интервал имеет переход через единицу). Однако и последний результат следует принять во внимание, несмотря на недостаточную мощность сравнения, ввиду его высокой клинической значимости (таблица 5). Таким образом, вероятность развития тромбоза без применения в лечении АТ-III была в 2,22 раза выше по сравнению с вероятностью избежать тромбоза в случае применения концентрата антитромбина-III, а вероятность кровотечения без АТ- III была в 1,73 раза выше.

Таблица 5. Сравнение рисков тромбозов и кровотечений в группах с антитромбином-III и без.

| Событие | Сравнение | ОШ [95% ДИ] | p |
|--------------|-----------------------------|----------------------|---------|
| Тромбоз | Группа с АТ / группа без АТ | 0,450 [0,448; 0,451] | <0,0001 |
| Кровотечение | Группа с АТ / группа без АТ | 0,578 [0,330; 1,012] | 0,0551 |

На основе построенных моделей была определена оптимальная точка отсечения активности антитромбина-III в крови, составившая 82,5% (таблица 6).

Таблица 6. Пороговые значения активности антитромбина-III.

| Предиктор | Исход | Порог | Специфичность | Чувствительность |
|---------------|--------------|-------|------------------|------------------|
| Антитромбин-3 | Тромбоз | 82,5 | 56,9 [50,7-61,1] | 72,2 [66,7-78,2] |
| | Кровотечение | 82,5 | 56,3 [50,3-60,5] | 81,8 [75,2-86,7] |

На основе J-статистики Юдена без учета возможной нелинейности связи (GEE для бинарного исхода; интерпретация ОШ такая же, как и в обычной логистической регрессии) была рассчитана зависимость вероятности развития осложнений тромботического характера от дозы нефракционированного гепарина (таблица 7). Так, при увеличении дозы гепарина на 1 МЕ/кг/час вероятность тромбоза возрастала в 1,050 раза [95% ДИ 1.008- 1.094; $p < 0,0183$] с площадью под ROC-кривой 0,56 [95% ДИ 0,49-0,63]. Хотя значение $p < 0,0183$ статистически значимо, однако точность прогноза (OFC-Overall Fraction Correct, площадь под кривой) 0,56 – низкая.

Таблица 7. Вероятность развития тромбоза в зависимости от дозы нефракционированного гепарина.

| Показатель | ОШ [95% ДИ] | p | AUC [95% ДИ] |
|-------------------------------------|----------------------|--------|-------------------|
| Гепарин МЕ/кг/час (увеличение на 1) | 1.050 [1.008; 1.094] | 0.0183 | 0.56 [0.49; 0.63] |

На основании полученных данных было рассчитано пороговое значения дозы гепарина в отношении шанса развития тромбоза. Результат можно рассматривать как ориентировочный (таблица 8).

Таблица 8. Пороговое значения дозы нефракционированного гепарина.

| Предиктор | Исход | Порог | Специфичность | Чувствительность |
|----------------------|---------|-------|---------------|------------------|
| Гепарин МЕ/кг/час | Тромбоз | 9,3 | 71,1 | 42,0 |

В ходе исследования был проведен анализ частоты развития кровотечений и тромбозов с учетом их локализации. Исследование продолжалось в течение первых 7 суток проведения ЭКМО или меньше, в случаях если ЭКМО прекращали раньше или наступал летальный исход. За этот период времени у 100 пациентов, вошедших в исследование, было зафиксировано 49 эпизодов геморрагических и 76 эпизодов тромботических осложнений (таблица 9).

Таблица 9. Распределение осложнений.

| Локализация осложнения | Частота осложнений | |
|--|--------------------|-------|
| | n | Доля |
| Кровотечение из верхних дыхательных путей | 12 | 24,4% |
| Кровоизлияние в плевральную полость | 9 | 18,3% |
| Кровотечение внутричерепное | 7 | 14,2% |
| Кровотечение из области канюляции | 6 | 12,2% |
| Кровотечение из трахеобронхиального дерева | 4 | 8,1% |
| Кровотечение диффузное | 4 | 8,1% |
| Кровотечение из желудочно-кишечного тракта | 4 | 8,1% |
| Кровотечение забрюшинное | 2 | 4% |
| Кровотечение внутримышечное | 1 | 2% |
| Тромбоз вен нижних конечностей | 41 | 53,9% |
| Тромбоз экстракорпорального контура | 9 | 11,8% |
| Тромбоэмболия легочной артерии | 8 | 10,5% |
| Тромбоз внутренней яремной вены | 5 | 6,5% |
| Тромбоз коронарных артерий | 3 | 3,9% |
| Тромбоз артерий нижних конечностей | 1 | 1,3% |
| Тромбоз вен верхних конечностей | 1 | 1,3% |
| Тромбоз мезентериальный | 1 | 1,3% |
| Тромбоз внутренней яремной вены + вен нижних конечностей | 3 | 3,9% |
| Тромбоз внутренней яремной вены + подключичной вены | 2 | 2,6% |
| Тромбоз артерий + вен нижних конечностей | 1 | 1,3% |
| Тромбоз артерий нижних конечностей + нисходящей аорты | 1 | 1,3% |

Осложнения как тромботического, так и геморрагического характера в некоторых случаях сочетались и носили множественный характер (таблица 10).

Таблица 10. Частота встречаемости осложнений у одного пациента.

| Характер осложнений | 0 эпизодов | 1 эпизод | 2 эпизода | 3 эпизода |
|---------------------|------------|----------|-----------|-----------|
| Тромбозы | n=42 | n=40 | n=14 | n=2 |
| Кровотечения | n=58 | n=35 | n=7 | n=0 |

Также нами была проанализирована ассоциация рисков тромбозов и кровотечений с показателями гемостаза, маркерами повреждения эндотелия и окислительного стресса.

Была установлена связь между активностью антитромбина-III и шансом тромбоза, ОШ составило 0,997 [ДИ 95% 0,996-0,999; p=0,0476], то есть увеличение активности антитромбина-III на 1% снижало шанс развития тромбоза на 0,3% (рисунок 2).

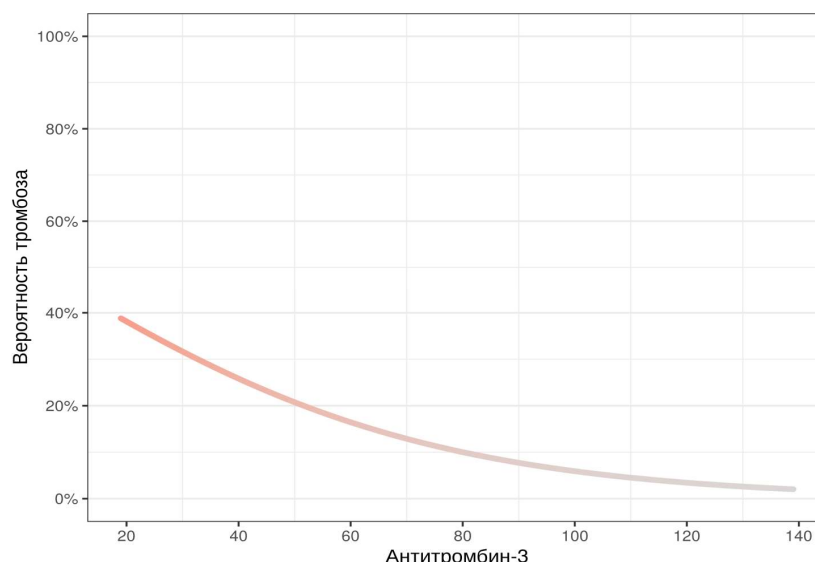


Рисунок 2. Риск тромбоза в зависимости от активности антитромбина-III.

Первые 7 дней с момента подключения ЭКМО пациентам с COVID-19 явились наиболее критичным периодом с точки зрения вероятности развития COVID-19/ЭКМО-ассоциированных осложнений тромботического и геморрагического характера. У пациентов, переживших 7-суточный период ЭКМО, шанс развития тромбоза был в 2,353 раза ниже (ОШ 0,425; 95% ДИ [0,266; 0,680], $p=0,0004$), а шанс развития кровотечения – в 3,067 раза ниже (ОШ 0,326; 95% ДИ [0.201; 0.529], $p < 0,0001$) (таблица 11).

Таблица 11. Отношение шансов развития осложнений.

| Событие | Сравнение | ОШ [95% ДИ] | p |
|--------------|--|----------------------|---------|
| Тромбоз | Группа долгого срока / группа малого срока | 0.425 [0.266; 0.680] | 0.0004 |
| Кровотечение | Группа долгого срока / группа малого срока | 0.326 [0.201; 0.529] | <0.0001 |

Выводы

1. В первые 7 суток проведения ЭКМО у пациентов с COVID-19 отмечались как признаки гипокоагуляции, так и гиперкоагуляции с преобладанием гипокоагулянтного состояния.

2. При проведении ЭКМО у пациентов с COVID-19 в первые 7 суток наблюдался прогрессирующий дефицит маркера эндотелиальной дисфункции – оксида азота ($\Delta = -0.85$ [95% ДИ -2.89; 1.19] $p=0,0173$), что ассоциировалось с прогрессированием дисфункции эндотелия. Снижение протективной функции оксида азота ассоциировалось с более тяжелым течением коронавирусного заболевания и неблагоприятным исходом (отрицательная средней силы корреляция концентрации оксида азота с соотношением «Тромбоциты/Лимфоциты» ($R= -0,45$ [95% ДИ -0,68; -0,15], $p=0,0059$) и с соотношением «Тромбоциты x Нейтрофилы / Лимфоциты» ($R= -0.41$ [95% ДИ -0,65; -0,09], $p=0,0146$).

3. Первые 7 дней – наиболее критичный период для развития COVID-19/ЭКМО-ассоциированных тромбгеморрагических осложнений. У пациентов, переживших 7-суточный период, риск развития тромбоза снижался в 2,353 раза (ОШ 0,425; 95% ДИ [0,266; 0,680], $p=0,0004$), а риск развития кровотечения – в 3,067 раза (ОШ 0,326; 95% ДИ [0.201; 0.529], $p < 0,0001$).

4. Увеличение активности антитромбина-III на 1% снижало риск развития тромбоза на 0,3% (ОШ 0,997; 95% ДИ [0,996-0,999], $p=0,0476$). Применение препаратов антитромбина-III при тяжелой коронавирусной инфекции у пациентов с некомпенсируемой гипоксемией, нуждавшихся в проведении ЭКМО, позволило снизить риск развития тромбозов в 2,22 раза (ОШ 0.450 [0.448; 0.451], $p < 0,0001$), риск развития кровотечений – в 1,73 раза (ОШ 0.578 [0.330; 1.012], $p=0,0551$). Оптимальная точка отсечения активности антитромбина-III – 82,5%.

Практические рекомендации

1. При проведении ЭКМО у пациентов с COVID-19 показатели гемостаза меняются разнонаправленно, угрожая повышенным риском как тромбозов, так и кровотечений, что требует обязательного лабораторного контроля АЧТВ, активности антитромбина-III, ТЭГ ROTEM, АВСК.

2. В случае использования в качестве основного антикоагулянта нефракционированного гепарина во избежание развития тромбозов следует поддерживать активность антитромбина выше 82,5%, дозировку нефракционированного гепарина – не более 9,3 МЕ/кг/час.

3. При оценке выраженности системного воспалительного ответа у пациентов с тяжелым течением COVID-19 следует осуществлять динамический мониторинг гематологических индексов PLR, SII и уровня С-реактивного белка, так как в первые 7 суток проведения ЭКМО исходно повышенный в 2-7 раз уровень соотношений «тромбоциты / лимфоциты» (PLR – platelet-to-lymphocyte ratio) и «тромбоциты x нейтрофилы / лимфоциты» (SII – systematic immune-inflammation index) статистически значимо снижался ($p < 0,0001$), а уровень С-реактивного белка возрастал ($p=0,0002$).

4. В случае обнаружения признаков кровотечения или тромбоза следует выполнить диагностику объективными методами исследования зон частой локализации. Наиболее частой локализацией кровотечения являются верхние дыхательные пути (24,4%), также наблюдаются внутриплевральные кровотечения (18,3%), интракраниальные кровотечения (14,2%), кровотечения из области канюляции (12,2%). Наиболее частой локализацией тромбоза являются вены нижних конечностей (53,9%), также наблюдаются тромбозы экстракорпорального контура (11,8%), тромбоз эмболия легочной артерии (10,5%).

5. При диагностировании тромбоза или кровотечения у крайне тяжелых пациентов с COVID-19 на ЭКМО следует проводить широкий скрининг пациента на предмет осложнений, связанных с нарушениями системы гемостаза, так как проведение ЭКМО у данной категории пациентов сочетается в 16% (16/100)

наблюдений с множественными тромбозами, в 7% (7/100) – с множественными кровотечениями; в 7% наблюдается сочетание тромбоза и кровотечения.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Применение Антитромбина-III при новой коронавирусной инфекции (Covid-19) в условиях экстракорпоральной мембранной оксигенации (клиническое наблюдение) // С.В. Журавель, В.В. Владимиров, П.В. Гаврилов, **И.В. Иванов**, С.С. Петриков, К.А. Попугаев, А.М. Талызин // Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 642-648.

2. Особенности изменений показателей системы гемостаза при экстракорпоральной мембранной оксигенации у пациентов с новой коронавирусной инфекцией // С.В. Журавель, **И.В. Иванов**, А.М. Талызин, Е.В. Клычникова, А.Ю. Буланов, К.А. Попугаев, В.В. Владимиров, Е.В. Тазина, С.С. Петриков // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2022. – Т. 19, № 4. – С. 15-21.

3. Патент № 2766350 ¹³ С1 Российская Федерация, МПК 51 G01N 33/86 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01). Способ прогнозирования тромбозов и кровотечений у критических пациентов с COVID-19 в условиях проведения ЭКМО / **И.В. Иванов**, С.В. Журавель, А.Ю. Буланов, Е.В. Клычникова, К.А. Попугаев, Н.К. Кузнецова, А.М. Талызин, С.С. Петриков; патентообладатель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы (ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ») (RU). – № 2021124661; заявл. 19.08.2021; опубл. 15.03.2022. – Бюл. № 8.

Список сокращений

ACE – ангиотензинпревращающий фермент

COVID-19 – коронавирус-индуцированное заболевание 2019 года

ELSO - организация экстракорпорального жизнеобеспечения

GEE – обобщенные оценочные уравнения

MDA – малоновый диальдегид

MCF – максимальная плотность сгустка

MERS – ближневосточный респираторный синдром

NLR – отношение нейтрофилов к лимфоцитам

NO_x – оксид азота

PLR – отношение тромбоцитов к лимфоцитам

RESP – оценка госпитальной выживаемости при ЭКМО

SII – системный иммуно-воспалительный индекс

SOFA – последовательная оценка органной недостаточности

TAS – общий антиоксидантный статус

AT-III – антитромбин III

АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ДИ – доверительный интервал

МНО – международное нормализованное отношение

ОШ – отношение шансов

ПВ – протромбиновое время

ЭКМО – экстракорпоральная мембранная оксигенация