

Некрасова Людмила Андреевна

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ
С ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ, С ТЯЖЕСТЬЮ ПОРАЖЕНИЯ
ЛЕГКИХ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19**

3.3.8 – Клиническая лабораторная диагностика

1.5.4 – Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

МОСКВА – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», обособленное подразделение Медицинский научно-образовательный центр Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

Кандидат медицинских наук, доцент

Самоходская Лариса Михайловна

Доктор биологических наук

Семина Екатерина Владимировна

Официальные оппоненты:

Попова Елена Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры терапии и профессиональных болезней, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Филипенко Максим Леонидович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией фармакогеномики ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.04 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук в ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.rsmu.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и разработанность темы исследования. Пандемия COVID-19 потребовала быстрой разработки новых и эффективных подходов, направленных на предотвращение развития тяжелых осложнений, таких как фиброз легких, острый респираторный дистресс-синдром и тромбоз (Farghaly et al., 2022). При прогнозировании различной степени тяжести и смертности, связанных с COVID-19, широко используются биомаркёры воспалительных процессов, в частности, уровень С-реактивного белка (Kazemi et al., 2021; Bhowmik et al., 2022). В настоящее время ясно, что огромную роль в патогенезе COVID-19 играет поражение кровеносных сосудов (Paramo, 2021). Поскольку при COVID-19 происходит усиленное тромбообразование в сосудах мелкого калибра жизненно важных органов и блокада микроциркуляции, часто имеющая необратимый характер (Paramo, 2021), предполагается, что система активаторов плазминогена может играть решающую роль при неблагоприятном течении заболевания (D'Alonzo et al., 2020). Во многих клинических исследованиях установлен гиперкоагуляционный и гипофибринолитический статус у пациентов с COVID-19 (Hammer et al., 2021; Jover et al., 2021; Juneja et al., 2021; Jin X et al., 2020). В контексте предикторов тяжелого течения и осложнений при COVID-19 наиболее часто анализируются показатели гемостаза (Teimury et al., 2022; Len et al., 2022). Однако, далеко не все пациенты укладываются в данную тенденцию, и в ряде исследований получены противоположные результаты (Guervilly et al., 2021; Keskinidou et al., 2021). Эти данные делают особенно актуальным поиск новых молекулярных и генетических критериев, прогнозирующих развитие тяжелых патологических состояний и осложнений при COVID-19.

В последнее время появились данные о возможной наследственной предрасположенности к определенному варианту течения заболевания COVID-19 (COVID-19 Host Genetics Initiative, 2021). В частности, определенные генотипы могут играть существенную роль в определении предрасположенности к более тяжелому клиническому течению COVID-19 (Severe Covid-19 GWAS Group, 2020; Wang et al., 2020; Pairo-Castineira et al., 2021). Известно, что носительство

полиморфных вариантов генов, участвующие в формировании эндотелиальной дисфункции, коррелируют с тяжестью течения сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз и тромбоз (Zarkasi et al., 2022). В норме однонуклеотидный полиморфизм генов не является причиной развития серьезных изменений сосудов, но это может быть фактором, ухудшающим тяжесть заболевания (Barton et al., 2009; Ierodiakonou et al., 2016). Молекулярный механизм, объясняющий данный феномен, заключается в том, что полиморфизм в участках ДНК, регулирующих активность генов, может, не меняя свойств белка, изменить его количество или его взаимодействие с другими молекулами, что может отразиться на его функции (Balta et al., 2002; Guo et al., 2020). Перспективными мишенями для изучения механизмов развития эндотелиальной дисфункции при COVID-19 являются гены, участвующие в формировании коммуникаций между эндотелиальными клетками, клетками стромы и иммунными клетками, определяющими барьерную функцию эндотелия (COVID-19 Host Genetics Initiative, 2021). Среди таких генов огромную роль играют гены, кодирующие урокиназный активатор плазминогена uPA и его рецептор uPAR, ингибитор активатора плазминогена PAI-1, сам плазминоген, эндотелиальную синтазу оксида азота eNOS, молекулы эндотелиальной клеточной адгезии. Ранняя диагностика, основанная на анализе полиморфизма данных генов, будет иметь важное значение для прогнозирования тяжести течения и возможных осложнений при COVID-19.

Цель данного исследования – изучение ассоциации полиморфизма генов, связанных с эндотелиальной дисфункцией, с тяжестью поражения легких у пациентов с COVID-19.

Задачи исследования:

1. Сравнить характер распределения генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов, кодирующих белки урокиназного активатора плазминогена uPA и его рецептора uPAR, ингибитора активатора плазминогена PAI-1, эндотелиальной синтазы оксида азота eNOS у пациентов с различной тяжестью поражения легких, обусловленного COVID-19.

2. Выявить полиморфные аллели и (или) генотипы изучаемых генов, ассоциированные с определенной тяжестью поражения легких у пациентов с COVID-19.

3. Оценить взаимосвязь генов, ассоциированных с определенной тяжестью поражения легких у пациентов с COVID-19, с концентрацией их белковых продуктов в плазме крови.

4. Проанализировать связь сывороточной концентрации белков, кодируемых обнаруженными значимыми полиморфизмами генов, с тяжестью поражения легких при COVID-19.

5. Построить интегральную модель, позволяющую дополнительно к биохимическим и гемостатическим показателям посредством анализа молекулярно-генетических критериев прогнозировать тяжесть поражения легких при COVID-19.

Научная новизна. Это первое ретроспективное когортное исследование в Российской Федерации, в котором изучалась взаимосвязь между определенными полиморфными вариантами генов, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией, уровнем растворимой формы белка uPAR в сыворотке крови, параметрами лабораторного анализа крови и процентом поражения легких на основе компьютерной томографии у пациентов с COVID-19.

Впервые идентифицирован полиморфный вариант rs2302524 гена *PLAUR*, кодирующего рецептор урокиназного активатора плазминогена, как полиморфизм, достоверно связанный с менее тяжелым поражением легких по результатам компьютерной томографии у пациентов с диагностированным COVID-19. Уровень растворимой формы белка uPAR, продукта гена *PLAUR*, в сыворотке крови определен как независимый показатель, высокий уровень которого достоверно ассоциирован с более тяжелым поражением легких, обусловленным SARS-CoV-2. Проведена оценка прогностической значимости уровня растворимой формы uPAR в сравнении с широко используемыми факторами биохимического и коагулологического анализа крови.

Впервые для исследуемых генетических, биохимических и гемостатических параметров построена интегральная регрессионная модель, определяющая независимые показатели оценки и прогнозирования тяжести повреждения легких при COVID-19.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты настоящей работы могут быть использованы для дальнейших исследований, направленных на выявление индивидуальных генетических особенностей пациентов, обуславливающих течение COVID-19. Ассоциация гетерозиготного генотипа варианта гена *PLAUR* rs2302524 с меньшим повреждением легких может быть принята во внимание как предиктор благоприятного развития заболевания, вызванного SARS-CoV-2, и использована для определения наилучшей терапевтической стратегии. Высокие уровни растворимого uPAR в крови могут быть использованы в качестве предикторов тяжелого течения COVID-19, что также способствует выбору оптимальной тактики лечения и улучшению результатов лечения пациентов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Гетерозиготный генотип ТС полиморфного варианта гена *uPAR* (*PLAUR*) rs2302524 независимо ассоциирован с менее тяжелым повреждением легких у пациентов с COVID-19.

2. Высокий уровень растворимой формы рецептора урокиназы uPAR (продукта гена *PLAUR*) связан с тяжелым повреждением легких при COVID-19; по прогностической способности уровень uPAR в сыворотке крови уступает концентрации С-реактивного белка, но сопоставим с уровнями фибриногена и D-димера.

3. Носительство варианта гена *PLAUR* rs2302524, ассоциированного с легкой степенью повреждения легких при COVID-19, не связано с уровнем растворимой формы uPAR в сыворотке крови.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов исследований определяется качеством исследований, проведенных современными методами клинической лабораторной диагностики.

Достоверность результатов подтверждена методами статистической обработки данных, адекватных поставленным задачам. Материалы диссертационного исследования представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения — 2022: Молодые ученые — медицине» (Самара, 2022), II Российской конференции с международным участием «Фундаментальные исследования в эндокринологии: современная стратегия развития и технологии персонализированной медицины» (Новосибирск, 2022). Апробация работы проведена на Факультете фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова 6 марта 2023 г.

Личный вклад автора заключался в постановке экспериментальных исследований, в получении всех видов изображений, систематизации, статистической обработке и интерпретации всех полученных данных, анализе результатов.

Внедрение результатов в практику. Результаты исследования используются при обучении студентов Факультета фундаментальной медицины МГУ в рамках курса «Микробиология, вирусология и иммунология».

Публикации

По теме диссертации опубликованы 4 научные статьи, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в перечень ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах печатного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и библиографического списка (192 источника литературы: 19 отечественных и 173 иностранных). Диссертация иллюстрирована 11 таблицами и 18 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее исследование включены пациенты, проходившие стационарное лечение на базе МНОЦ МГУ, Москва, с подтвержденным диагнозом COVID-19. Объектом исследования являлись образцы крови и сыворотки крови, а также результаты лабораторных исследований крови пациентов с диагностированным COVID-19 различной степени тяжести заболевания по результатам компьютерной томографии (КТ). Включение пациентов в исследование, проведение данной работы было одобрено комитетом по этике МНОЦ МГУ, протокол № 07/22 от 26 сентября 2022 г. Исследование проводили в соответствии с нормами Хельсинской декларации.

Диагноз COVID-19 подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на SARS-Cov-2. Анализ показателей гемостаза проводился на автоматическом анализаторе Stago STA Compact (Stago, Франция). Анализ уровня биохимических показателей крови проводился с использованием автоматического биохимического анализатора AU480 (Beckman Coulter, Германия).

КТ легких и органов грудной клетки была выполнена на компьютерном томографе Somatom Scope (Siemens, Германия) с толщиной среза 1 мм. Для обработки и анализа КТ использовали платформу Syngo.via (Siemens). При обработке и описании данных КТ использовалась полуколичественная шкала оценки объема зон инфильтрации и уплотнения легких.

Геномную ДНК экстрагировали из периферической венозной крови с использованием набора для выделения ДНК «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ДНК-Технология, Россия). Полиморфные варианты исследуемых генов были генотипированы с использованием наборов с аллель-специфичными праймерами (ДНК-технология, Россия). Количественную ПЦР проводили на устройстве для ПЦР в реальном времени «ДТ-96» (ДНК-технология, Россия). Генотипы определяли по температурам плавления продуктов амплификации в каналах FAM и HEX.

Уровни растворимого uPAR (suPAR) в образцах сыворотки измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Для анализа использовали набор

для иммуноферментного анализа uPAR человека «Human uPAR ELISA Kit» (Abcam, США).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы R (версия 4.2.1) и встроенных пакетов epitools (версии 0.5-10.1), genetics (версия 1.3.8.1.3), haplo.stats (версия 1.8.9), ROCit (версия 2.1.1), forestmodel (версия 0.6.2), ggpubr (версия 0.4.0) и ggplot2 (версия 3.3.6).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании определяли следующие полиморфные варианты генов: *NOS3* (rs2070744, rs1799983), *SERPINE1* (rs1799768), *PLAU* (rs2227564) и *PLAUR* (rs344781, rs2302524). Основанием для изучения полиморфных вариантов данных генов стало предположение их возможной взаимосвязи с тяжестью течения заболевания при инфицировании вирусом SARS-Cov-2, основанное на понимании функций продуктов этих генов. Перечень и характеристика однонуклеотидных полиморфных вариантов, включенных в исследование, представлены в Таблице 1. Отклонение генетических частот от равновесия Харди-Вайнберга (HWE) оценивали по всем аллелям с помощью точного критерия Фишера. Распределение частот аллелей для всех генов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Таблица 1. Полиморфные варианты генов, включенные в исследование. Частоты минорных аллелей в популяции были импортированы из Базы данных с агрегированными сведениями о геномах (gnomAD, версия 3.1.2, <https://gnomad.broadinstitute.org/>) а также из данных мета-анализа (Jarahzadeh et al., 2022)

Ген	Идентификатор	Полиморфизм	Тип мутации	Хромо-сома	Частота минорной аллели (gnomAD)	р-значение для HWE
<i>NOS3</i>	rs2070744	c.-786T>C	в промоторе	7	0.2998	0.611
<i>NOS3</i>	rs1799983	c.894G>T p.Glu298Asp	миссенс-мутация	7	0.2446	0.705
<i>SERPINE1</i>	rs1799768	c.-675 4G>5G c.-1969_- 1968insG	в промоторе	7	0.370 [†]	1

PLAU	rs2227564	c.422C>T p.Pro141Leu	миссенс- мутация	10	0.1952	0.470
PLAUR	rs344781	c.-516T>C	в промоторе	19	0.2028	0.417
PLAUR	rs2302524	g.43652320T>C c.659A>G p.Lys220Arg	миссенс- мутация	19	0.1683	0.538

†(Jarahzadeh et al., 2022)

В общей сложности в исследуемую когорту был включен 151 пациент в возрасте 24-96 лет с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2. Пациенты были классифицированы в соответствии с процентом поражения легких на КТ-снимках на группы «легкой» степени ($\leq 25\%$ поражения легких) и «от умеренной до тяжелой», далее именуемой «тяжелой» степенью ($> 25\%$ поражения легких). В данном исследовании не было обнаружено существенных различий в распределении по возрасту и полу между группами «легкой» степени и «тяжелой» степени поражения легких ($p = 0,053$ и $p = 0,3258$ соответственно).

Распределение генотипов и аллелей изучаемых генов

В Таблицах 2 и 3 представлены распределения генотипов и аллелей изучаемых полиморфных вариантов генов у пациентов с «легкой» и «тяжелой» степенью поражения легких, приведены p -значения, указаны отношения шансов (ОШ) и доверительные интервалы (95%ДИ). В таблицах 2, 3 и далее использовались следующие обозначения уровней статистической значимости результатов: $p \leq 0,05$ — получен статистически значимый результат (*); $p \leq 0,01$ — обнаружена выраженная закономерность (**); $p \leq 0,001$ — очень высокий уровень значимости (***); $p \leq 0,0001$ — максимально высокий уровень значимости, (****).

Таблица 2. Распределение генотипов у пациентов с «легкой» и «тяжелой» степенью поражения легких при COVID-19

Полиморфизм	Генотип	Частота генотипа n (%)		р-значение точный критерий Фишера	ОШ [95%ДИ]	р-значение точный критерий Фишера
		«Легкая» степень COVID-19	«Тяжелая» степень COVID-19			
NOS3: -769 T>C	ТТ	30 (36%)	26 (39%)	0,6566	1	
	СТ	41 (49%)	28 (42%)		0.790	0,5871

					[0,385 - 1,617]	
	CC	13 (15%)	13 (19%)		1.152 [0,447 - 2,972]	0,8151
NOS3, rs1799983	GG	43 (51%)	28 (42%)	0,3233	1	
	GT	36 (43%)	31 (46%)		1.319 [0,669 - 2,614]	0,4918
	TT	5 (6%)	8 (12%)		2.406 [0,713 - 8,930]	0,2220
SERPINE1, rs1799768	4G4G	19 (23%)	19 (28%)	0,6349	1	
	4G5G	45 (54%)	31 (46%)		0.692 [0,312 - 1,524]	0,4243
	5G5G	20 (24%)	17 (25%)		0.852 [0,339 - 2,131]	0,8185
PLAU, rs2227564	CC	49 (58%)	42 (63%)	0,1957	1	
	CT	34 (40%)	21 (31%)		0,723 [0,361 - 1,430]	0,3909
	TT	1 (1%)	4 (6%)		4,190 [0,554 - 117,613]	0,1906
PLAUR, rs344781	TT	45 (54%)	37 (55%)	0,6836	1	
	TC	33 (39%)	23 (34%)		0,850 [0,423 - 1,692]	0,7272
	CC	6 (7%)	7 (10%)		1,409 [0,422 - 4,846]	0,5676
PLAUR, rs2302524	TT	53 (63%)	55 (82%)	0,0199 *	1	
	TC	28 (33%)	10 (15%)		0,349 [0,147 - 0,773]	0,0130*
	CC	3 (4%)	2 (3%)		0,660 [0,074 - 4,495]	0,6790

Таблица 3. Распределение аллелей у пациентов с «легкой» и «тяжелой» степенью поражения легких при COVID-19

Полиморфизм	Аллель	Частота аллели n (%)		ОШ [95%ДИ]	p-значение точный критерий Фишера
		«Легкая» степень COVID-19	«Тяжелая» степень COVID-19		
NOS3: -769 T>C	T	101 (60%)	80 (60%)	1	
	C	67 (40%)	54 (40%)	1,018 [0,639-1,619]	1
NOS3: -894 G>T (Glu298Asp)	G	122 (73%)	87 (65%)	1	
	T	46 (27%)	47 (35%)	1,431 [0,875-2,345]	0,168

<i>SERPINE1</i> , rs1799768	5G	85 (51%)	65 (49%)	1	
	4G	83 (49%)	69 (51%)	1,087 [0,689-1,715]	0,730
<i>PLAU</i> , rs2227564	C	132 (79%)	105 (78%)	1	
	T	36 (21%)	29 (22%)	1,013 [0,579-1,762]	1
<i>PLAUR</i> , rs344781	T	123 (73%)	97 (72%)	1	
	C	45 (27%)	37 (28%)	1,043 [0,623-1,738]	0,8969
<i>PLAUR</i>, rs2302524	T	134 (80%)	120 (90%)	1	
	C	34 (20%)	14 (10%)	0,464 [0,230-0,892]	0,0261*

Из представленных данных следует, что не обнаружено существенной связи анализируемых вариантов генов *NOS3*, *SERPINE1*, *PLAU* и однонуклеотидного полиморфного варианта rs344781 гена *PLAUR* с тяжестью поражения легких, обусловленного COVID-19.

Ассоциация полиморфизма rs2302524 гена *PLAUR* с менее тяжелой степенью поражения легких

Вариант rs2302524 гена *PLAUR* выявлен как достоверно связанный с определенной тяжестью поражения легких. Гетерозиготный генотип TC rs2302524 продемонстрировал защитный эффект, будучи достоверно более частым в группе пациентов с «легкой» степенью поражения легких при COVID-19: ОШ = 0,349 [95%ДИ: 0,147-0,773], $p = 0,0130$, предполагая кодоминантную модель наследования. Для корректировки параметров возраста и пола была выполнена логистическая регрессия. Тенденция ассоциации генотипа rs2302524 TC с «легкой» степенью поражения легких у больных COVID-19 сохранялась: ОШ = 0,315 [95%ДИ: 0,130-0,708] ($p = 0,0069$) в кодоминантной модели наследования (ТС против ТТ; информационный критерий Акаике (ИКА) 204,6). В доминантной модели наследования (ТС-СС против ТТ; ИКА 203,1) прослеживается аналогичная закономерность: ОШ = 0,345 [95%ДИ: 0,152-0,741] ($p = 0,0081$). Также в сверхдоминантной модели наследования (ТС против ТТ-СС; ИКА 202,9) определено ОШ = 0,321 [95%ДИ: 0,133-0,719] ($p = 0,0077$).

Ранее показано, что полиморфный вариант *PLAUR* rs2302524 связан с восприимчивостью к астме и снижением функции легких при астме (Barton et al., 2009) и пролиферацией базального эпителия у лиц, страдающих астмой (Ierodiakonou et al., 2016). Также определено, что данный полиморфизм не только является ассоциированным с астмой вариантом гена *PLAUR*, но также влияет на исходную функцию легких у курильщиков (Stewart et al., 2009). Тем не менее, о функциональном и клиническом значении данного полиморфизма известно мало, также в литературе отсутствуют данные о взаимосвязи варианта гена *PLAUR* rs2302524 с особенностями течения COVID-19.

Известно, что ген *PLAUR* кодирует белок-рецептор урокиназы uPAR, а однонуклеотидный полиморфный вариант rs2302524 этого гена приводит миссенс-мутации uPAR Lys220Arg в третьем домене белка (DIII). Третий домен белка uPAR непосредственно участвует в связывании uPA (Barinka et al., 2006). Взаимодействуя с uPA, uPAR активирует урокиназу, способствуя образованию плазмина из плазминогена (Blasi et al., 2002; Jaiswal et al., 2018). Таким образом, изменение экспрессии uPAR может приводить к изменению реологических свойств крови и нарушению процессов фибринолиза. Белок uPAR, экспрессируемый на поверхности клеток и выступающий в роли рецептора урокиназы, связан с целым рядом физиологических процессов, включая дифференцировку клеток, пролиферацию, миграцию и фибринолиз (Blasi et al., 2002; Jaiswal et al., 2018). Он также может быть вовлечен в патогенез ремоделирования дыхательных путей, повреждения легких, легочного фиброза (Marudamuthu et al., 2015; Schuliga et al., 2017; D'Alonzo et al., 2020), что повышает вероятность того, что uPAR является важным фактором при респираторных заболеваниях (Xiao et al., 2005; Chen et al., 2021; Tucker et al., 2021).

Взаимосвязь уровня растворимого uPAR в сыворотке крови с тяжестью поражения легких

Установлено, что уровень сывороточной концентрации uPAR (его растворимой формы suPAR) был значительно выше в группе пациентов с «тяжелой» степенью повреждения легких ($p < 0,0001$, t-тест) (Таблица 7).

Таблица 7. Данные анализа концентрации uPAR в сыворотке крови у пациентов, включенных в исследование.

Фактор анализа	Всего (n = 151)	«Легкая» степень COVID-19 (n = 84)	«Тяжелая» степень COVID-19 (n = 67)	p-значение
uPAR сывороточная концентрация, нг/мл	7,61 ± 0,328	6,20 ± 0,277	9,40 ± 0,580	3,43 x 10 ⁻⁶ ****

На Рисунке 1 представлена корреляция сывороточной концентрации uPAR и процента поражения легких, показан коэффициент корреляции Спирмена (R). Красная линия представляет соответствие линейной регрессии, а серая область представляет 95% доверительные интервалы. ROC-кривая для концентрации растворимой формы uPAR в крови при прогнозировании «тяжелой» степени поражения легких представлена на Рисунке 2 с указанием площади под кривой AUC [95% доверительные интервалы]. Пунктирная линия представляет собой линию вероятности. TPR - истинно положительный показатель, FPR – ложно положительный показатель.

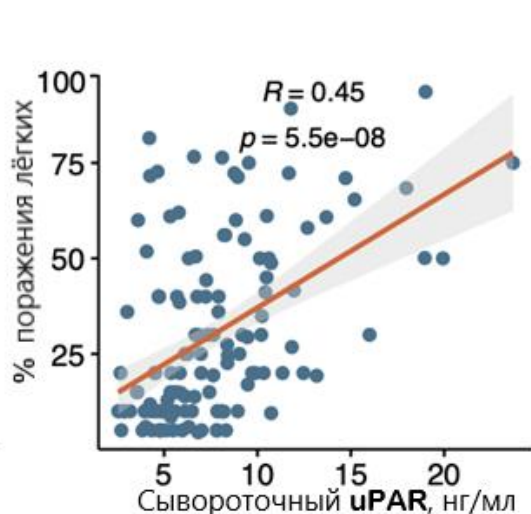


Рисунок 1. Корреляция сывороточной концентрации uPAR и тяжести повреждения легких (процент поражения легких)

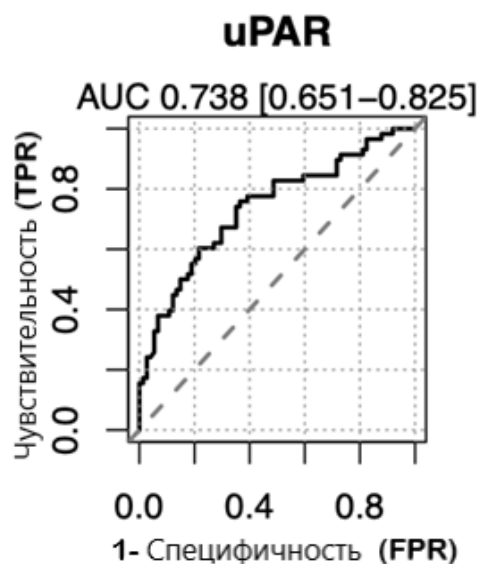


Рисунок 2. ROC-кривая сывороточной концентрации uPAR при прогнозировании «тяжелой» степени поражения легких

Таким образом, нами продемонстрировано, что уровень растворимой формы uPAR в сыворотке крови положительно коррелирует с процентом поражения легких у пациентов с COVID-19. Также показано, что уровень концентрации uPAR в крови пациента может быть использован для прогнозирования повреждения легких более 25%, что соответствует группе пациентов с «тяжелой» степенью поражения легких по результатам компьютерной томографии.

Высокий уровень белка uPAR в сыворотке крови может служить ранним предиктором клинической тяжести и неблагоприятного исхода у пациентов с COVID-19 (Azam et al., 2020; Rovina et al., 2020; Arnold et al., 2021; Napolitano et al., 2021). В связи с относительной простотой измерения сывороточной концентрации suPAR именно она используется в качестве показателя активности системы uPA/uPAR на фоне COVID-19 в большинстве клинических исследований (Huang et al., 2020; Reisinger et al., 2021; Kerget et al., 2021; Lippi et al., 2021; Velissaris et al., 2021). Скрининг uPAR, а именно его растворимой формы suPAR, был рекомендован для прогнозирования риска неблагоприятных исходов у пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии, с целью улучшения ранней диагностики и ведения сепсиса в работе группы экспертов в области медицины интенсивной терапии, неотложной медицины, внутренних болезней и инфекционных заболеваний (Velissaris et al., 2020). В клиническом исследовании третьей фазы COVID-19 высокий уровень suPAR в сыворотке крови использовался для выявления пациентов с риском прогрессирования дыхательной недостаточности (Kyriazopoulou et al., 2021).

Прогностическая значимость uPAR в сравнении с другими показателями анализа крови

В данной работе среди показателей лабораторного анализа крови более высокая тяжесть повреждения легких была достоверно связана с более высокими показателями активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) ($p = 0,00105$, t-тест), С-реактивного белка (СРБ) ($p < 0,0001$, t-тест), D-димера ($p = 0,00114$, t-тест), фибриногена ($p < 0,0001$, t-тест) и увеличенным тромбиновым временем ($p = 0,00993$, t-тест). Международное нормализованное отношение

(МНО) и протромбиновое время существенно не различались между группами «легкой» и «тяжелой» степени поражения легких (Рисунок 4).

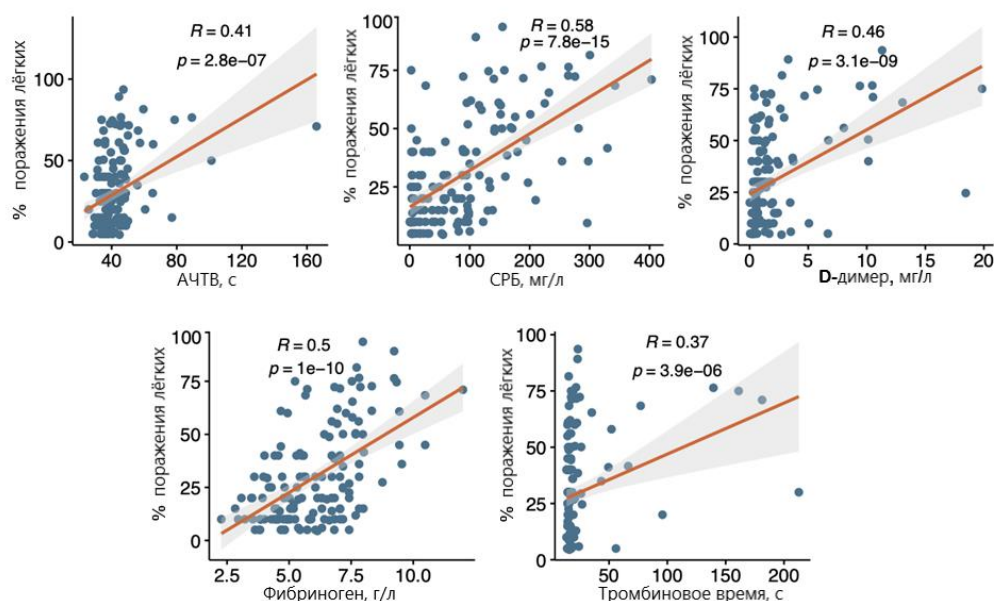


Рисунок 4. Графики корреляции параметров анализа крови и тяжести повреждения легких (% поражения легких). Показаны коэффициенты корреляции Спирмена (R). Красные линии представляют соответствие линейной регрессии, а серые области представляет 95% доверительные интервалы.

Установленная положительная корреляция концентрации uPAR с тяжестью повреждения легких, сила корреляции ($R = 0,45$) выше, чем для параметров АЧТВ ($R = 0,41$) и тромбинового времени ($R = 0,37$), но ниже, чем для D-димера ($R = 0,46$), фибриногена ($R = 0,50$) и СРБ ($R = 0,58$).

По результатам ROC-анализа установлено, что среди всех анализируемых показателей крови наилучшая прогностическая способность показана для СРБ ($AUC = 0,806$ [95% ДИ: 0,734-0,878]). Уровень uPAR в сыворотке крови демонстрирует показатель ($AUC = 0,738$ [95% ДИ: 0,651-0,825]), сопоставимый с уровнями фибриногена и D-димера ($AUC = 0,76$ [95% ДИ: 0,68-0,84] и $AUC = 0,756$ [95% ДИ: 0,677-0,835] соответственно) в прогнозировании тяжести повреждения легких, связанного с COVID-19 (Рисунок 5).

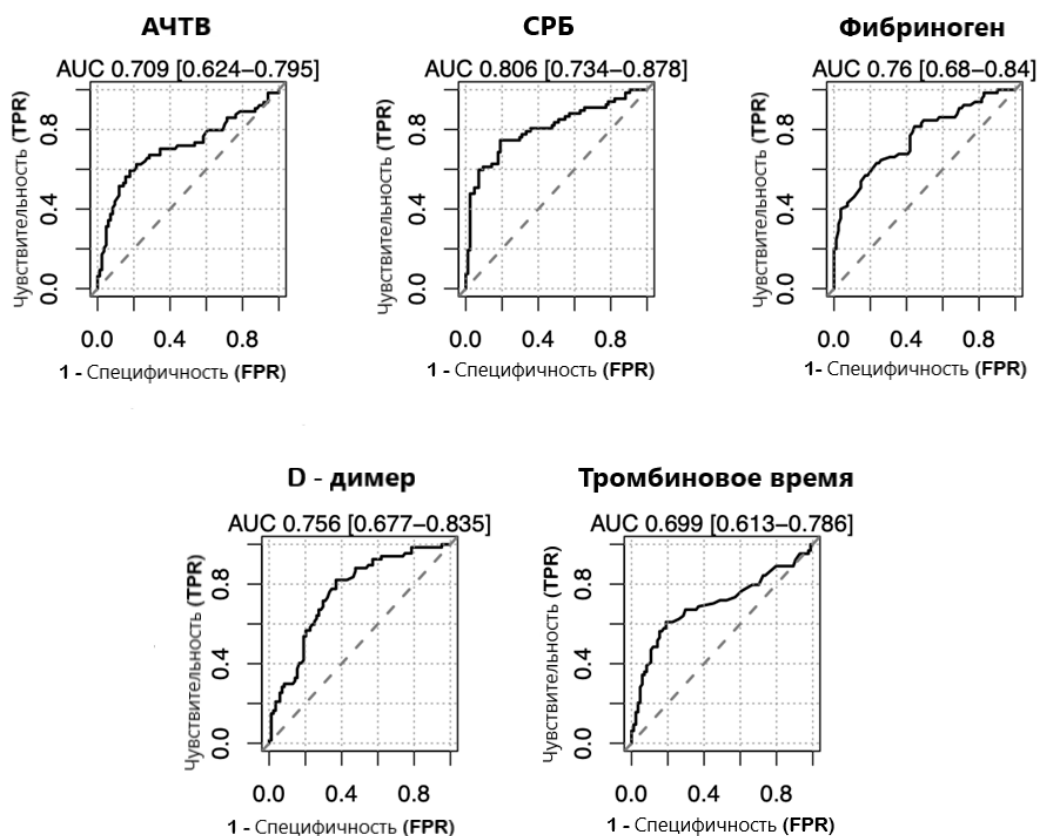


Рисунок 5. ROC-кривые параметров анализа крови при прогнозировании «тяжелой» степени поражения легких. Пунктирная линия представляет собой линию вероятности. TPR - истинно положительный показатель, FPR - ложноположительный показатель

Таким образом, в данном исследовании установлено, что по прогностической способности уровень растворимой формы uPAR уступает концентрации С-реактивного белка, но сопоставим с уровнями фибриногена и D-димера. Также в рамках работы показано, что уровень концентрации белка suPAR в сыворотке крови пациентов с COVID-19 положительно коррелирует с уровнем концентрации С-реактивного белка. Обобщая вышесказанное, можно утверждать, что показатель уровня uPAR имеет высокую прогностическую значимость при прогнозировании тяжелого течения COVID-19.

Концентрация uPAR в сыворотке крови показывает высокую прогностическую значимость в опубликованных ранее исследованиях в сравнении с другими показателями. В исследовании (Arnold et al., 2021) концентрация suPAR продемонстрировала максимальную клиническую значимость в прогнозировании

тяжести COVID-19 среди концентраций девяти факторов, проанализированных в крови: интерлейкин-6, suPAR, высокомолекулярный гликопротеин KL-6, тропонин, ферритин, лактатдегидрогеназа, мозговой натрийуретический пептид, прокальцитонин. В то же время важно отметить, что в другом исследовании получены данные, согласно которым при средней степени тяжести заболевания концентрация suPAR при поступлении в стационар значительно выше, чем при тяжёлой (Kerget et al., 2021). По-видимому, продолжая изучать активности системы uPA/uPAR у пациентов с COVID-19, следует принимать во внимание не только степень повреждения легочной ткани, но и интенсивность процессов регенерации тканей, активность иммунных реакций. Возможно, при существенном влиянии этих процессов на течение заболевания ассоциация высокого уровня uPAR в сыворотке крови с тяжелой степенью повреждения легких может нарушаться.

Взаимосвязь концентрации uPAR в сыворотке крови с изучаемыми полиморфными вариантами генов

В ходе проведенного исследования не обнаружено значимой связи между уровнем uPAR в сыворотке крови и изучаемыми полиморфными вариантами *PLAUR* rs344781 и rs2302524 (Рисунок 6) или другими протестированными полиморфными вариантами генов.

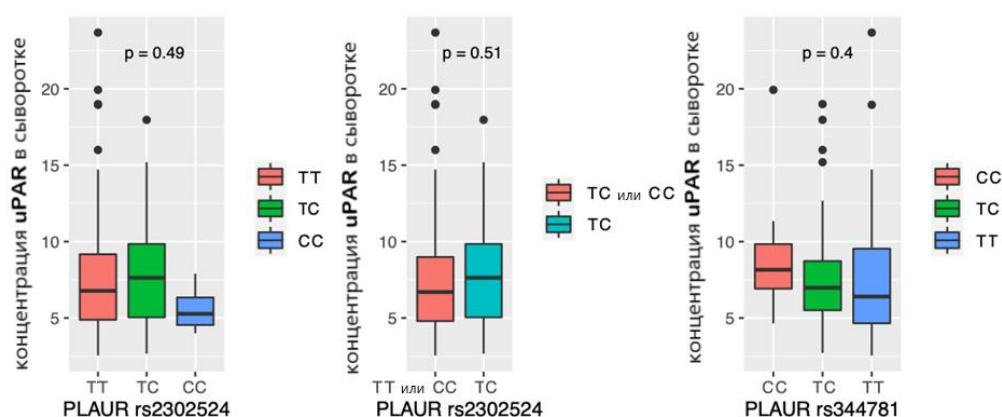


Рисунок 6. Ассоциация полиморфных вариантов гена *PLAUR* с уровнями uPAR в сыворотке крови. Приведены р-значения, сопоставленные с помощью ANOVA. Показаны медианы концентрации suPAR (горизонтальные линии в блоках) для разных генотипов, нижние и верхние квартили (границы блоков), края статистически-значимой выборки (усы) и выбросы (точки).

Результаты настоящего исследования согласуются с выводом Olson et al. о том, что полиморфный вариант *PLAUR* rs2302524 не связан с уровнем uPAR в сыворотке крови (Olson et al., 2021). В связи с этим предполагается, что полиморфизм *PLAUR* rs2302524 скорее влияет на функционирование своего белкового продукта uPAR в легочной ткани, участвует в процессах, вызывающих повреждение легких, усугубляющих повреждение легочной ткани. Возможно, вариант rs2302524 гена *PLAUR*, приводящий к замене одной аминокислоты Lys220Arg в белке uPAR, способен провоцировать чрезмерное разрушение клеток, в том числе эндотелиальных, на фоне воспаления, прогрессирующего под действием растворимой активной формы suPAR. В то же время полученные результаты приводят к пониманию не связанности данного полиморфного варианта гена с уровнем экспрессии белка uPAR или процессом секреции растворимой формы uPAR в кровь.

Интегральная модель оценки характера течения COVID-19 и прогнозирования тяжести заболевания

С целью выявления независимых прогностических факторов тяжести повреждения легких, связанного с COVID-19, была проведена многофакторная логистическая регрессия. В качестве независимых переменных были взяты возраст, пол, уровень С-реактивного белка, уровень фибриногена, уровень D-димера, тромбиновое время и гетерозиготный генотип *PLAUR* rs2302524 (СТ) против двух вариантов гомозиготного генотипа (СС или ТТ). Таким образом, в построение модели включены факторы, показавшие прогностический потенциал в ходе данного исследования, и сделана поправка на возраст и пол. В качестве двоичной зависимой переменной в модель включена тяжесть поражения легких, вызванная COVID-19: «легкая» степень ($\leq 25\%$), и «тяжелая» степень ($> 25\%$).

Результат построения модели представлен на Рисунке 7. Горизонтальные линии соответствуют отношению шансов проявления «тяжелой» по сравнению с «легкой» степени поражения легких для каждого из обозначенных выше параметров. В квадратных скобках указаны 95% доверительные интервалы. Уровень значимости результатов был принят как $p < 0,05$.

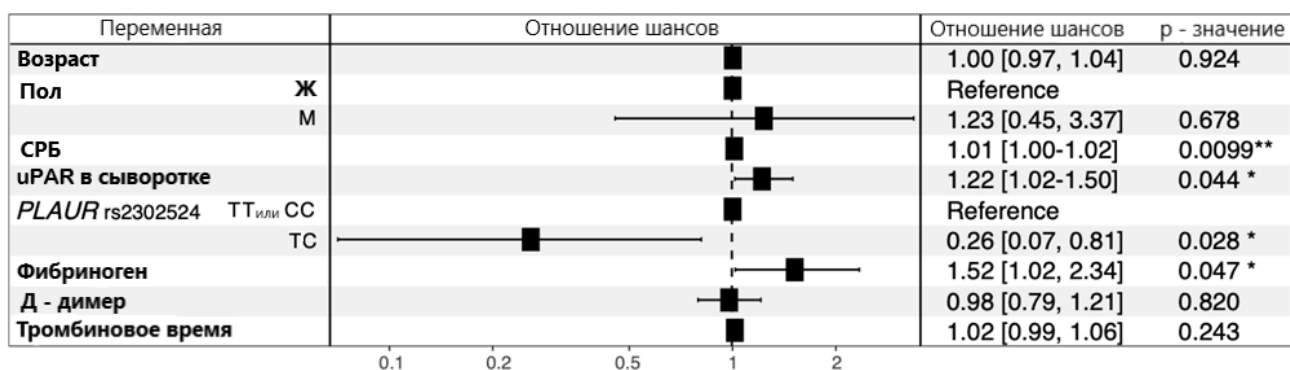


Рисунок 7. Модель многомерной логистической регрессии для факторов, связанных с тяжестью поражения легких, обусловленного COVID-19

Среди включенных в описанную регрессионную модель факторов были обнаружены три показателя, которые являются независимыми предикторами «тяжелой» степени повреждения легких при COVID-19.

1. Для уровня СРБ ОШ = 1,012 (95%ДИ: 1,003-1,022; $p = 0,00992$).
2. Для уровня suPAR ОШ = 1,219 (95%ДИ: 1,016-1,498; $p = 0,0444$).
3. Для фибриногена ОШ = 1,517 (95%ДИ: 1,018-2,341; $p = 0,0477$).

Важным результатом построения модели стало то, что гетерозиготный генотип ТС *PLAUR* rs2302524 был установлен независимым предиктором «легкой» степени поражения легких при COVID-19 (ОШ = 0,258; 95%ДИ: 0,071-0,811; $p = 0,0276$).

Гомозиготный генотип СС полиморфизма гена *PLAUR* rs2302524 не показал статистически значимой взаимосвязи с определенной степенью поражения легких у пациентов, включенных в исследование (Таблица 2). В случае проведения многофакторной логистической регрессии с выбором в качестве независимой переменной генотип гена *PLAUR* rs2302524, содержащий минорную аллель (ТС или СС) против генотипа, не содержащего полиморфный вариант (ТТ), статистическая значимость ассоциации носительства полиморфного варианта rs2302524 с определенной степенью поражения легких для данной когорты пациентов не была установлена. В данное исследование включены 5 пациентов, гомозиготных по минорной аллели rs2302524 гена *PLAUR*, среднее значение процента поражения легких в этой группе пациентов составило 22,7%. По-

видимому, такой малой выборки пациентов недостаточно для того, чтобы обнаружить ассоциацию гомозиготного СС генотипа с определенной степенью поражения легких у пациентов с COVID-19.

Таким образом, на основе проведенной оценки связи выбранных полиморфных вариантов генов, отдельных лабораторных параметров крови и концентрации растворимого uPAR в сыворотке крови с тяжестью поражения легких нами (1) идентифицирован полиморфный вариант гена *PLAUR* rs2302524, как полиморфизм, в гетерозиготном генотипе достоверно ассоциированный с легкой степенью поражения легких у пациентов с COVID-19; среди изучаемых показателей анализа крови высокие уровни (2) растворимого uPAR, (3) СРБ и (4) фибриногена определены как независимые предикторы тяжелого поражения легких при COVID-19.

ВЫВОДЫ

1. Анализируемые варианты генов *NOS3*, *SERPINE1*, *PLAU* и вариант rs344781 гена *PLAUR* распределены в группах пациентов легкой и тяжелой степени поражения легких, обусловленного COVID-19, без статистически значимых различий.

2. Гетерозиготный генотип ТС полиморфного варианта гена *PLAUR* rs2302524, вызывающего миссенс-мутацию Lys220Arg, является достоверно ассоциированным с легкой степенью поражения легких у пациентов с COVID-19.

3. Носительство варианта гена *PLAUR* rs2302524, ассоциированного с легкой степенью повреждения легких при COVID-19, не связано с концентрацией растворимой формы его белкового продукта uPAR в сыворотке крови.

4. Сывороточная концентрация растворимой формы белка uPAR достоверно ассоциирована с тяжелой степенью поражения легких у пациентов с COVID-19.

5. Построена интегральная модель, определяющая гетерозиготный генотип ТС полиморфного варианта rs2302524 гена *PLAUR* как независимый предиктор легкого поражения легких у пациентов с COVID-19; определяющая высокие

уровни растворимого uPAR, С-реактивного белка и фибриногена как независимые предикторы тяжелого поражения легких у пациентов с COVID-19.

Практические рекомендации

1. Необходимо проведение дальнейших исследований по выявлению генетических факторов, ассоциированных с тяжестью течения заболевания у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2.

2. Высокие уровни растворимой формы uPAR, С-реактивного белка и фибриногена в плазме крови могут быть использованы в качестве предикторов тяжелого течения COVID-19.

3. Ассоциация ТС генотипа *PLAUR* rs2302524 с меньшим повреждением легких может быть принята во внимание как предиктор благоприятного прогноза и использована для выбора оптимальной тактики лечения пациентов с COVID-19.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Некрасова Л.А. Возможность использования показателей клинического анализа крови в оценке воспалительного статуса пациентов с COVID-19 / Л.А. Некрасова, М. Джайн, Н.С. Губенко, А.А. Будко, Л.М. Самоходская, Я.А. Орлова, А.А. Камалов // Клиническая практика. - 2022. - Т. 13. - №1. - С. 14-21.

2. Некрасова Л.А. Анализ прогностической значимости молекул эндотелиальной адгезии VCAM-1 и ICAM-1 в отношении тяжести течения заболевания у пациентов с COVID-19 / Л.А. Некрасова, О.Ю. Нестерова, Л.М. Самоходская, Е.В. Семина, А.А. Камалов // Технологии живых систем. - 2022. - Т. 19. - №3. - С. 5-14.

3. Некрасова Л.А. Взаимосвязь белков системы фибринолиза с тяжестью течения COVID-19. Обзор актуальных клинических данных и перспективных терапевтических стратегий / Л.А. Некрасова, О.Ю. Нестерова, Л.М. Самоходская, Е.В. Семина, А.А. Камалов // Кардиологический вестник. - 2022. - Т. 17. - №3. - С. 29-38.

4. Nekrasova L.A. The association of PLAUR genotype and soluble suPAR serum level with COVID-19 -related lung damage severity / L.A. Nekrasova, A.A. Shmakova, L.M. Samokhodskaya et al. // International Journal of Molecular Sciences. - 2022. - Vol. 23, N. 24.

Список сокращений

ANOVA – односторонний дисперсионный анализ
AUC – площадь под ROC-кривой
COVID-19 – потенциально тяжелая острая респираторная инфекция, вызванная коронавирусом SARS-Cov-2
ELISA – иммуноферментный анализ
eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота
gnomAD – база данных с агрегированными сведениями о геномах
PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена 1 типа
SEM – стандартная ошибка среднего
suPAR – растворимая форма рецептора урокиназы
uPA – урокиназный активатор плазминогена, урокиназа
uPAR – рецептор урокиназы
XWE – равновесия Харди-Вайнберга
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
ДИ – доверительный интервал
КТ – компьютерная томография
МНО – международное нормализованное отношение
ОШ – отношение шансов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СРБ – С-реактивный белок