

ВНУТРЕННИЕ БОЛЕЗНИ INTERNAL DISEASES

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *ITGB3*, *GP1B1* И *ITGA2* В ПАТОГЕНЕЗЕ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ COVID-19-АССОЦИИРОВАННОМ ПОРАЖЕНИИ ЛЁГКИХ СРЕДНЕЙ И ТЯЖЁЛОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

РЕЗЮМЕ

Осиков М.В.^{1,2},
Антонов В.Н.^{1,3},
Зотов С.О.^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (454048, г. Челябинск, ул. Воровского, 64, Россия)

² ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» (454048, г. Челябинск, ул. Воровского, 70, Россия)

³ ГАУЗ «Областная клиническая больница № 3» (454136, г. Челябинск, просп. Победы, 287, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Зотов Семён Олегович,
e-mail: semenz2007@yandex.ru

Цель работы. Исследовать агрегацию тромбоцитов, полиморфизм в генах, обеспечивающих её реализацию, и ассоциацию между данными показателями у пациентов с COVID-19 при среднем и тяжёлом течении заболевания.

Методология. В исследовании принимали участие 75 больных COVID-19, которые в зависимости от объёма поражения лёгочной паренхимы разделены на две группы в зависимости от объёма поражения паренхимы лёгких. Контрольная группа – практически здоровые люди ($n = 24$). У всех лиц исследованы количество тромбоцитов в крови и агрегация тромбоцитов, индуцированная аденозиндифосфатом (АДФ), коллагеном и ристомидином; методом полимеразной цепной реакции определяли полиморфизмы rs6065 в гене *GP1BA*, rs1126643 в гене *ITGA2*, rs5918 в гене *ITGB3*. Анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics v. 23 (IBM Corp., США).

Результаты и обсуждение. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких среднего и тяжёлого течения ускоряется агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ, коллагеном, ристомидином; при тяжёлом течении снижается количество тромбоцитов. Не изменяется частота встречаемости вариантов полиморфизма rs6065, повышается частота встречаемости генотипа Т/С полиморфизма rs5918; при средней тяжести повышается частота встречаемости генотипов С/Т и Т/Т полиморфизма rs1126643; при тяжёлом поражении лёгких повышается частота встречаемости мутантного генотипа С/С полиморфизма rs5918. При поражении лёгких средней степени тяжести наличие мутантного варианта Т/Т полиморфизма rs1126643 ускоряет коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов; при тяжёлой степени тяжести наличие мутантного С/С и гетерозиготного С/Т вариантов полиморфизма rs5918 ускоряет АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Не выявлено влияния полиморфизма rs6065 на агрегацию тромбоцитов. Полученные данные указывают на возможную роль генетической предрасположенности в активации агрегации тромбоцитов у больных с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких.

Ключевые слова: COVID-19, тромбоциты, агрегация, полиморфизм, *GP1BA*, *ITGA2*, *ITGB3*

Статья поступила: 30.03.2023

Статья принята: 17.11.2023

Статья опубликована: 29.12.2023

Для цитирования: Осиков М.В., Антонов В.Н., Зотов С.О. Роль полиморфизма генов *ITGB3*, *GP1B1* и *ITGA2* в патогенезе гиперреактивности тромбоцитов при COVID-19-ассоциированном поражении лёгких средней и тяжёлой степени тяжести. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(6): 14-22. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.2

ROLE OF *ITGB3*, *GP1B1*, AND *ITGA2* GENE POLYMORPHISMS IN PLATELET DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH COVID-19-ASSOCIATED LUNG DAMAGE

Osikov M.V.^{1,2},
Antonov V.N.^{1,3},
Zotov S.O.^{1,3}

¹ South Ural State Medical University
(Vorovskogo str. 64, Chelyabinsk 454048,
Russian Federation)

² Chelyabinsk Regional Clinical Hospital
(Vorovskogo str. 70, Chelyabinsk 454048,
Russian Federation)

³ Regional Clinical Hospital No. 3
(Pobedy Ave. 271, Chelyabinsk 454136,
Russian Federation)

Corresponding author:

Semen O. Zotov,
e-mail: semenz2007@yandex.ru

ABSTRACT

The aim of the work. To investigate platelet aggregation, polymorphism in the genes that ensure its implementation, and the association between these indicators in patients with COVID-19-associated lung damage, depending on the severity of the clinical course.

Methodology. The study involved 75 patients with COVID-19, which, depending on the severity of lung involvement, were divided into two groups: patients with damage of up to 50 % of the lung parenchyma (n = 48) and with damage of more than 50 % (n = 27) respectively. The control group consisted of healthy people (n = 24), comparable in sex and age. In all individuals, the number of platelets, platelet aggregation induced by ADP, collagen and ristomycin were studied; polymorphisms rs6065 in the GP1BA gene, rs1126643 in the ITGA2 gene, and rs5918 in the ITGB3 gene were determined by polymerase chain reaction. The analysis of the obtained data was executed using the IBM SPSS Statistics v. 23 (IMB Corp., USA).

Results and discussion. In patients with moderate and severe COVID-19-associated lung damage, platelet aggregation induced by ADP, collagen, and ristomycin accelerated; in severe cases, the number of platelets decreased. The frequency of variants of the rs6065 polymorphism did not change, the frequency of occurrence of the T/C genotype of the rs5918 polymorphism increased; with moderate severity, the frequency of occurrence of the C/T and T/T genotypes of the rs1126643 polymorphism increased; with severe lung damage, the frequency of occurrence of the mutant C/C genotype polymorphism rs5918 increased. In moderate lung damage, the presence of the mutant T/T polymorphism rs1126643 accelerated collagen-induced platelet aggregation; in severe cases, the presence of mutant C/C and heterozygous variant C/T polymorphism rs5918 accelerated ADP-induced platelet aggregation. There was no effect of the rs6065 polymorphism on platelet aggregation. The data obtained indicate the possible role of genetic predisposition in the activation of platelet aggregation in patients with COVID-19-associated lung damage.

Key words: COVID-19, platelets, aggregation, polymorphism, GP1BA, ITGA2, ITGB3

Received: 30.03.2023
Accepted: 17.11.2023
Published: 29.12.2023

For citation: Osikov M.V., Antonov V.N., Zotov S.O. Role of *ITGB3*, *GP1B1*, and *ITGA2* gene polymorphisms in platelet dysfunction in patients with COVID-19-associated lung damage. *Acta biomedica scientifica*. 2023; 8(6): 14-22. doi: 10.29413/ABS.2023-8.6.2

ВВЕДЕНИЕ

Изменения гемостаза, приводящие к тромботическим осложнениям, характерны для госпитализированных пациентов с COVID-19 (coronavirus disease 2019). Учитывая, что тромбоциты – ключевые участники и регуляторы тромбообразования и воспаления, они являются важным источником медиаторов в патогенезе COVID-19 [1, 2]. У пациентов с COVID-19-ассоциированным повреждением лёгких повышен риск тромботических осложнений и смертности, в том числе благодаря гиперреактивности тромбоцитов [3–5]. Тромбоциты участвуют в патогенезе COVID-19 разными путями. SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) инфицирует мегакариоциты костного мозга; показано присутствие вирионов в тромбоцитах периферической крови, что напрямую усиливает их агрегационную способность [6]. Доказано, что маркеры активности тромбоцитов (размер тромбоцитов и их зрелость) в значительной степени связаны как с тяжестью заболевания, так и со смертностью, даже с учётом наличия сопутствующих заболеваний, приёма лекарств и других лабораторных показателей, включая биомаркеры воспаления и тромбоза (например, D-димер). Исследование тромбоцитов у пациентов с COVID-19 продемонстрировало активацию метаболических процессов, включая окислительное фосфорилирование и гликолиз, что усиливает их агрегацию [7]. Многочисленные пути активации тромбоцитов иницируют и поддерживают образование тромбов. Тромбоциты, выделенные от больных с COVID-19, показывают большую степень агрегации с различными агонистами (аденозинтрифосфат, адреналин, коллаген, ристомицин), что может быть обусловлено, в том числе, генетическими факторами [8–10]. В ограниченном количестве исследований изучалось влияние отдельных протромботических факторов риска – как генетических, так и приобретённых – на тяжесть COVID-19.

Среди генетических факторов указан полиморфизм гена ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1) 4G/5G: обнаружено, что он усиливает тромбоз-опосредованный остеонекроз после перенесённой инфекции COVID-19. Описана сильная корреляция между наличием полиморфизма C677T гена метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) и тяжестью течения COVID-19 [11]. Однако сложность клинического течения и основных осложнений, наблюдаемых у пациентов с тяжёлой формой COVID-19, предполагает, что в патогенез COVID-19 может быть вовлечён ряд других генетических факторов риска. Этим обусловлена актуальность исследований генов белков, участвующих в гемостазе и сердечно-сосудистых осложнениях у пациентов с COVID-19. К таким генам относятся, в том числе, *GP1BA* (glycoprotein Ib-alpha), *ITGB3* (integrin beta 3) и *ITGA2* (integrin alpha 2), которые опосредуют запуск различных механизмов активации тромбоцитов. Связь названных генов с повышенной активацией тромбоцитов индукторами агрегации у больных COVID-19 систематически не исследовалась. Высокая частота тромботических осложнений при тяжёлых формах COVID-19-ассоциированного поражения лёгких

может быть связана с гиперреактивностью тромбоцитов в условиях наследственной предрасположенности.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ агрегации тромбоцитов и полиморфизмов в генах, обеспечивающих её реализацию у пациентов с COVID-19-ассоциированным повреждением лёгких, в зависимости от тяжести клинического течения

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 75 больных (44 женщины и 31 мужчина) в возрасте от 44 до 75 лет с COVID-19, госпитализированных в ГАУЗ «Областная клиническая больница № 3» г. Челябинска, не принимавших препараты, влияющие на функцию тромбоцитов, перед госпитализацией и не родственные между собой. В контрольную группу вошли 24 клинически здоровых добровольца (группа 1), сопоставимых по полу и возрасту с больными COVID-19 и не родственные между собой. В зависимости от объёма поражения лёгких больные с COVID-19 поделены на группы: группа 2 с поражением до 50 % – средняя степень тяжести ($n = 48$); группа 3 с поражением более 50 % – тяжёлая степень тяжести ($n = 27$), – в соответствии с методическими рекомендациями Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» [12]. Критериями включения в группы 2 и 3 было наличие COVID-19, подтверждённое обнаружением на слизистых оболочках зева и носовой полости РНК вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (РелБест РНК SARS-CoV-2; АО «Вектор Бест», Россия). Критериями исключения являлись: наличие ранее выявленных онкологических заболеваний, хронических заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной систем и органов желудочно-кишечного тракта; крайне тяжёлое течение сочетанной патологии, требующее госпитализации пациента в отделение реанимации и интенсивной терапии; наличие у пациента артериальной гипертензии 2-й степени и выше; индекс массы тела более 30 кг/м²; анемия. Всеми пациентами подписано информированное согласие. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 4 от 24.05.2021). У всех пациентов методом мультиспиральной компьютерной томографии грудной клетки (SOMATOM Definition AS 64; Siemens, Германия) выявлено двустороннее поражение лёгких, соответствующее патогномичным изменениям при COVID-19: диффузное уплотнение лёгочной ткани по типу «матового стекла» и консолидации в сочетании с ретикулярными изменениями.

Забор крови осуществлялся на 1-е сутки поступления больного в стационар. Стандартная тромбопрофилактика нефракционированным гепарином начиналась после забора крови на исследование. Помимо антикоагулянт-

ной терапии, больные получали стандартную терапию противовирусными препаратами и глюкокортикостероидами, антибактериальную терапию, согласно временным методическим рекомендациям Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 15 от 22.02.2022.

Количество тромбоцитов в крови подсчитывали по методу Фолио. Агрегацию тромбоцитов оценивали на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «АЛАТ-2» (БИОЛА, Россия), в качестве индукторов использовали аденозиндифосфат (АДФ; 2,5 ммоль/мл), коллаген (3,3 мкг/мл), ристомицин (7,5 мг/мл) (ООО «Технология Стандарт», Россия), учитывали количество единиц агрегатов среднего размера в минуту (ед./мин), за единичный радиус принимался средний радиус тромбоцитов до начала агрегации.

Генетические исследования проводились с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (Roche LightCycler 96; Roche Molecular Systems, США), материал – буккальный соскоб эпителия. Использовали наборы реагентов для выявления полиморфизмов в генах «SNP-экспресс-кардиогенетика» (НПФ «Литех», Россия). Определяли следующие полиморфизмы: rs6065 (Thr145Met) в гене *GP1BA*, rs1126643 (Phe253Phe) в гене *ITGA2*, rs5918 (Leu33Pro) в гене *ITGB3*. Результаты представляли в виде гомозиготного немутантного варианта: С/С – для полиморфизмов rs6065 и rs1126643, Т/Т – для полиморфизма rs5918; гетерозиготного варианта: С/Т – для rs6065 и rs1126643, Т/С – для rs5918; гомозиготного мутантного варианта: Т/Т – для rs6065 и rs1126643, С/С – для rs5918.

Статистическая обработка проведена с использованием IBM SPSS Statistics v. 23 (IBM Corp., США), характеристика выборок представлена в формате Me (Q_{25} – Q_{75}), где Me – медиана; Q_{25} и Q_{75} – значения нижнего и верхнего квартилей соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев Манна – Уитни. При сравнении долей (процентов) использовался точный критерий Фишера. При множественных сравнениях вводили поправку Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$. Частота аллелей оценивались по методу подсчёта гена, а критерий χ^2 был использован для выявления отклонений от равновесия Харди – Вайнберга.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание тромбоцитов в крови у больных с поражением лёгких средней степени тяжести в ходе исследования статистически значимо не менялось. В группе 2 отмечено статистически значимое ускорение АДФ-, коллаген- и ристомицин-индуцированной агрегации тромбоцитов соответственно на 9 % ($p = 0,038$), 23 % ($p = 0,027$) и 8 % ($p = 0,042$) по медиане относительно группы контроля. У больных с тяжёлой степенью поражения лёгочной ткани количество тромбоцитов в крови относительно контрольной группы статистически значи-

мо ниже на 37 % ($p = 0,002$) по медиане. В группе 3 отмечено статистически значимое ускорение индуцированной АДФ, коллагеном и ристомицином агрегации тромбоцитов на 21 % ($p = 0,024$), 38 % ($p = 0,003$) и 16 % ($p = 0,019$) соответственно относительно контрольной группы. По сравнению с группой больных с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких средней степени тяжести количество в крови тромбоцитов меньше на 30 % ($p = 0,007$), индуцированная АДФ, коллагеном и ристомицином агрегация тромбоцитов ускоряется соответственно на 16 % ($p = 0,011$), 24 % ($p = 0,004$) и 10 % ($p = 0,009$) по медиане (рис. 1).

Распределение частот генотипов генов *ITGA2*, *GP1BA* и *ITGB3* соответствовало ожидаемому равновесию Харди – Вайнберга как в группе контроля ($p = 0,51$, $p = 0,95$ и $p = 0,81$ соответственно), так и в группе пациентов с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких средней степени тяжести ($p = 0,50$, $p = 0,87$ и $p = 0,82$ соответственно). Комбинация двух мутаций у одного человека выявлена у 5 (21 %) человек из группы контроля и у 13 (27 %) человек из группы 2. Комбинация трёх мутаций одновременно выявлена у 1 (4,8 %) человека из группы контроля и у 4 (8,3 %) человека из группы 2. В группе пациентов с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких средней степени тяжести в гене *ITGB3* статистически значимо чаще по сравнению с контролем встречается аллель С полиморфизма rs5918 и, соответственно, реже – аллель Т ($p = 0,009$). В группе 2 по сравнению с контрольной группой отмечена меньшая частота ($p = 0,012$) встречаемости Т/Т варианта полиморфного локуса rs5918 гена *ITGB3* – 64,5 % наблюдений, большая частота ($p = 0,007$) – Т/С варианта (29,2 % наблюдений), частота встречаемости варианта С/С статистически значимо не меняется. В группе 2 при анализе встречаемости частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs6065 в гене *GP1BA*, в том числе мутантного варианта С/С, не выявлено статистически значимых различий с группой 1. При анализе частоты встречаемости полиморфизма rs1126643 в гене *ITGA2* выявлено, что аллель С встречается реже ($p = 0,022$), а аллель Т – чаще ($p = 0,014$), чем соответствующие аллели в группе контроля. Вариант С/С этого полиморфизма встречается в 39,6 % наблюдений – статистически значимо реже ($p = 0,002$), чем в группе контроля; варианты С/Т и Т/Т обнаружены у 43,8 % и 16,6 % наблюдений соответственно, что чаще ($p = 0,031$ и $p = 0,042$ соответственно) встречаемости аналогичных вариантов в группе контроля (табл. 1).

В группе 3 распределение частот генотипов генов *ITGA2*, *GP1BA* и *ITGB3* соответствовало ожидаемому равновесию Харди – Вайнберга ($p = 0,47$, $p = 0,82$ и $p = 0,71$ соответственно). Комбинация двух мутаций одновременно выявлена у 6 (22,2 %) человек, трёх мутаций одновременно – у 3 (11 %) человек. При анализе полиморфизма rs5918 гена *ITGB3* статистически значимо чаще встречается аллель С и, соответственно, реже – аллель Т как по сравнению с контролем, так и при сравнении с группой 2 (табл. 1). В группе 3 частота встречаемости Т/Т варианта полиморфного локуса rs5918 гена *ITGB3* – 51,9 %, что статистически значимо меньше, чем в группах 1 и 2 ($p = 0,030$

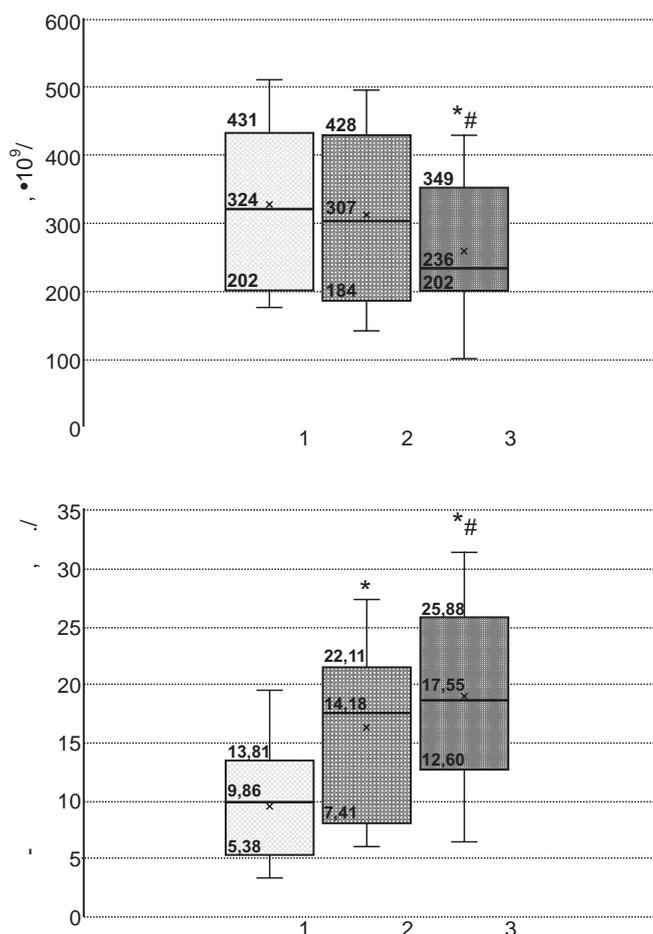


РИС. 1.

Количество в крови тромбоцитов и скорость их агрегации при COVID-19-ассоциированном поражении лёгких в зависимости от тяжести заболевания: — — медиана; □ — 25-й–75-й процентилю; × — среднее арифметическое; * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1; # — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 2

и $p = 0,038$ соответственно), при этом Т/С вариант обнаружен в 29,6 % наблюдений, что статистически значимо больше, чем в группе контроля, но не отличается от значений группы 2. Частота встречаемости мутантного варианта С/С статистически значимо больше ($p = 0,043$) в этой группе по сравнению с контролем и группой 2 и составляет 18,5 %. При анализе частоты распределения аллелей и генотипов полиморфного локуса rs6065 в гене *GP1BA* в группе 3 не выявлено статистически значимых различий с группой контроля и с группой 2. При анализе частоты встречаемости полиморфизма rs1126643 в гене *ITGA2* различий с группой контроля не выявлено, но обнаружено, что аллель С встречается чаще, а аллель Т – реже, чем соответствующие аллели в группе 2. При этом вариант С/С полиморфизма rs1126643 встречается у 59,3 % наблюдений, что не отличается от группы контроля, но статистически значимо чаще, чем в группе 2 ($p = 0,024$); вариант С/Т обнаружен у 29,6 % наблюдений, что реже ($p = 0,033$) встречается аналогичного варианта в группе 2 и статистически значимо не отличается от группы контроля; вари-

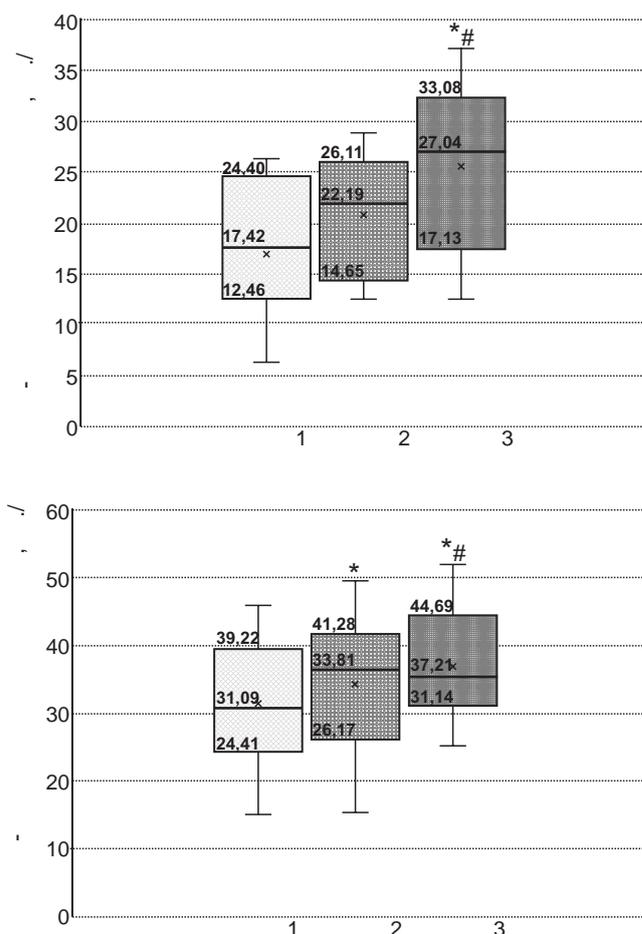


FIG. 1.

Platelet blood count and their aggregation rate in COVID-19-associated lung damage depending on the severity of the disease. — — median; □ — 25th–75th percentiles; × — arithmetic mean; * — statistically significant ($p < 0,05$) differences with group 1; # — statistically significant ($p < 0,05$) differences with group 2

ант Т/Т наблюдается в 11,1 % случаев, что статистически не значимо при сравнении с группами 1 и 2.

В ходе анализа агрегации тромбоцитов в группе 2 в зависимости от полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* отмечено, что при мутантном варианте Т/Т ускоряется коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов – на 31 % ($p = 0,011$) и 23 % ($p = 0,019$) по сравнению с вариантами С/С и С/Т соответственно. Статистический анализ не выявил различий в индуцированной агрегации тромбоцитов в этой группе в зависимости от полиморфизмов генов *ITGB3* и *ITGA2* (табл. 2).

В результате анализа агрегации тромбоцитов в группе 3 при наличии полиморфизма rs5918 гена *ITGB3* замечено, что при варианте Т/С наблюдается статистически значимое ускорение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на 13 % ($p = 0,022$) по сравнению с вариантом Т/Т. При варианте С/С АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов ускоряется на 18 % ($p = 0,017$) по сравнению с вариантом Т/Т и не изменяется по сравнению с вариантом Т/С. Статистический анализ не выявил статистически

ТАБЛИЦА 1
ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ ПРИ АНАЛИЗЕ
ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *ITGB3*, *GP1B1* И *ITGA2*
ПРИ COVID-19-АССОЦИИРОВАННОМ ПОРАЖЕНИИ
ЛЁГКИХ, МЕ (Q25; Q75)

TABLE 1
FREQUENCY OF OCCURRENCE OF GENOTYPES
IN THE ANALYSIS OF *ITGB3*, *GP1B1*, AND *ITGA2* GENE
POLYMORPHISMS IN COVID-19-ASSOCIATED LUNG
DAMAGE, ME (Q25; Q75)

Полиморфизмы	Генотипы/аллели	Частота генотипа			
		Группа 1 (n = 24)	Группа 2 (n = 48)	Группа 3 (n = 27)	
rs5918 в гене <i>ITGB3</i>	генотипы	0 (T/T)	19 (79,0 %)	31 (64,5 %)*	14 (51,9 %)*#
		I (T/C)	4 (16,7 %)	14 (29,2 %)*	8 (29,6 %)*
		II (C/C)	1 (4,3 %)	3 (6,3 %)	5 (18,5 %)*:#
	аллели	T	87,3 %	79,1 %*	66,7 %*:#
		C	12,7 %	20,9 %*	33,3 %*:#
rs6065 в гене <i>GP1BA</i>	генотипы	0 (C/C)	20 (83,4 %)	38 (79,1 %)	22 (81,4 %)
		I (C/T)	4 (16,6 %)	9 (18,8 %)	5 (18,6 %)
		II (T/T)	0	1 (2,1 %)	0
	аллели	C	91,7 %	88,5 %	90,7 %
		T	8,3 %	11,5 %	9,3 %
rs1126643 в гене <i>ITGA2</i>	генотипы	0 (C/C)	16 (66,7 %)	19 (39,6 %)*	16 (59,3 %)#
		I (C/T)	6 (25,0 %)	21 (43,8 %)*	8 (29,6 %)#
		II (T/T)	2 (8,3 %)	8 (16,6 %)*	3 (11,1 %)
	аллели	C	79,2 %	61,5 %*	74,1 %#
		T	20,8 %	38,5 %*	25,9 %#

Примечание. * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1; # – статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 2; 0 – гомозиготный немутантный вариант; I – гетерозиготный вариант; II – гомозиготный мутантный вариант.

ТАБЛИЦА 2
СКОРОСТЬ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ
ПРИ COVID-19-АССОЦИИРОВАННОМ ПОРАЖЕНИИ
ЛЁГКИХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ
***ITGB3*, *GP1B1* И *ITGA2*, МЕ (Q25; Q75)**

TABLE 2
THE RATE OF PLATELET AGGREGATION
IN COVID-19-ASSOCIATED LUNG DAMAGE DEPENDING
ON POLYMORPHISMS OF *ITGB3*, *GP1B1* AND *ITGA2* GENES,
ME (Q25; Q75)

Полиморфизмы	Генотипы	Группа 2 (n = 48)	Группа 3 (n = 27)
АДФ-индуцированная агрегация (ед./мин)			
rs5918 в гене <i>ITGB3</i>	0 (T/T)	19,84 (14,45; 23,32)	20,19 (17,11; 23,17)
	I (T/C)	20,71 (15,81; 25,02)	23,19 (17,31; 25,72)*
	II (C/C)	21,22 (18,35; 24,11)	24,74 (16,91; 28,12)*
Ристомицин-индуцированная агрегация (ед./мин)			
rs6065 в гене <i>GP1BA</i>	0 (C/C)	33,72 (26,17; 39,03)	38,58 (31,14; 44,69)
	I (C/T)	34,06 (28,44; 40,28)	36,41 (32,78; 39,90)
	II (T/T)	27,18	–
Коллаген-индуцированная агрегация (ед./мин)			
rs1126643 в гене <i>ITGA2</i>	0 (C/C)	13,17 (7,31; 19,63)	17,17 (12,60; 24,11)
	I (C/T)	14,02 (8,67; 24,15)	18,24 (13,41; 22,58)
	II (T/T)	17,25 (9,42; 22,14)*:#	16,22 (13,01; 19,28)

Примечание. * – статистически значимые ($p < 0,05$) различия с гомозиготным немутантным вариантом внутри группы; # – статистически значимые ($p < 0,05$) различия с гетерозиготным вариантом внутри группы; 0 – гомозиготный немутантный вариант; I – гетерозиготный вариант; II – гомозиготный мутантный вариант.

значимых связей других исследованных генотипов генов *ITGB3* и *ITGA2* с агрегацией тромбоцитов в группе 3. В ходе исследования не выявлено влияния полиморфизма rs6065 гена *GP1BA* на агрегационную способность тромбоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение количества тромбоцитов у больных с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких наблюдается в 58–95 % случаев и может быть связано с множеством факторов. Тромбоцитопения на ранних стадиях COVID-19, как правило, обусловлена разрушением тромбоцитов и усилением потребления, однако на поздних стадиях заболевания может наблюдаться уменьшение их продукции [9]. Ранее была продемонстрирована связь между количеством тромбоцитов в крови, тяжестью течения заболевания и повышенным риском летального исхода госпитализированных пациентов с COVID-19 [13]. При COVID-19 активация тромбоцитов осуществляется воспалительными медиаторами, комплексами антиген – антитело, повреждённым эндотелием. Активированные таким образом тромбоциты выводятся из кровотока мононуклеарными фагоцитами. Вирус SARS-CoV-2 способен ингибировать тромбоцитопозз за счёт прямого взаимодействия с мегакариоцитами, а также обладает прямым действием на тромбоцит за счёт связывания с ACE2-рецепторами, что вызывает эскалацию окислительного стресса в тромбоцитах, их повышенное потребление, нарушение тромбоцитопозз в костном мозге запуск и аутоиммунных реакций [14]. Продукты разрушенных вирусом SARS-CoV-2 клеток (в первую очередь эндотелиоцитов) могут являться ещё одной причиной ускорения агрегации тромбоцитов, что в свою очередь приводит к тромбообразованию и тромбоцитопении. Другими факторами, оказывающими заметное влияние на агрегационную активность тромбоцитов, являются индивидуальные особенности генотипа, в том числе полиморфизмы генов *GP1BA*, *ITGA2* и *ITGB3*.

Ген *GP1BA* кодирует α -субъединицу гликопротеина Ib, участвующую в образовании тромбоцитарного рецептора GpIb/IX/V. Основным лигандом рецептора является фактор Виллебранда (vWF), связывающий тромбоциты с участком повреждённого сосуда [15]. Сила образующейся между ними связи во многом зависит от конфигурации рецептора, структуры vWF и скорости потока крови. Полиморфизм rs6065 гена *GP1BA* связан с заменой цитозина (C) на тимидин (T) вблизи старта транскрипции гена, что приводит к замене аминокислоты треонин на метионин в участке рецептора, отвечающем за связывание с vWF. В результате у носителей генотипа C/C концентрация гликопротеина Ib на мембране тромбоцитов выше, чем у лиц с другими вариантами генотипа. При мутантной гомозиготной форме T/T (частота в популяции около 1,5 %) резко повышаются риски тромбообразования. При гетерозиготном варианте C/T экспрессия рецепторов GpIb/IX/V на тромбоцитах не так сильно выражена, однако в некоторых исследованиях выяв-

лен повышенный риск тромбообразования у носителей этого варианта гена [16]. В ряде исследований показано, что носители аллеля C имеют повышенный риск коронарного тромбоза, ишемического инсульта и снижения возраста его наступления [17].

В представленном исследовании не получено данных, указывающих на влияние полиморфизма rs6065 гена *GP1BA* на ускорение, в том числе ристомидин-индуцированной агрегации тромбоцитов, отражающей взаимодействие vWF с рецептором GpIb. Возможное объяснение – это отсутствие в исследуемой популяции значительного количества носителей гомозиготного мутантного варианта гена T/T и немногочисленность выборки. Кроме того, в связывании vWF с GpIb тромбоцитов имеет место эффект кооперативности: в формировании комплекса с коллагеном участвуют гликопротеины IX и V, чья структура и функция могут оставаться интактными. Кроме этого, в большей степени рецептор GpIb/IX/V служит для адгезии тромбоцитов, его роль в агрегации выражена в меньшей степени [18]. Таким образом, ускорение ристомидин-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких нельзя объяснить полиморфизмом rs6065 гена *GP1BA*, и, вероятно, оно обусловлено другими генетическими и негенетическими факторами.

Ген *ITGB3* регулирует синтез мембранного белка интегрин β -3, участвующего во взаимодействии между тромбоцитами. Интегрин β -3 является компонентом гликопротеина IIb/IIIa и распознает специфическую аминокислотную последовательность глицин – пролин – аргинин в широком спектре лигандов, включая протромбин, фибриноген, плазминоген, vWF. Интегрин β -3 является гетеродимером, состоящим из нековалентно связанных субъединиц α и β . Эти субъединицы имеют большую внеклеточную часть, трансмембранную часть и короткую цитоплазматическую часть [19]. Полиморфизм rs5918 гена *ITGB3* вызван заменой нуклеотида тимина (T) на цитозин (C) в определённом участке ДНК, из-за чего происходит замена аминокислоты лейцин на пролин в 33-м положении белковой цепи и возникает нарушение трёхмерной структуры рецептора. Нарушение структуры рецептора в свою очередь приводит к повышению реактивности тромбоцитов и способствует усилению их тромбогенности [20, 21]. У лиц с вариантом C/C этого полиморфизма повышается склонность к агрегации тромбоцитов и, соответственно, риск тромбообразования [22]. Предполагается, что влияние полиморфизма rs5918 на характеристики тромбоцитов наблюдается только для гомозигот по аллелю C [23].

Связь полиморфизма rs5918 гена *ITGB3* с возникновением тромботических событий выявлена ранее [22–24]. Основываясь на наличии этих нежелательных явлений у больных с COVID-19 и частотой встречаемости вариантов T/C и C/C полиморфизма rs5918 у этих больных, можно предположить, что этот генетический дефект имеет значение в патогенезе COVID-19, особенно при нарушениях в системе гемостаза. Нами обнаружено, что частота встречаемости гетерозигот и мутантных гомозигот гена *ITGB3* выше у пациентов с ускорени-

ем АДФ-индуцированной агрегации, а также с тяжёлой формой COVID-19. Увеличение среднего объёма тромбоцита и повышение концентрации гликопротеина IIb/IIIa на мембране тромбоцитов характерно для носителей мутантных гомозигот и в меньшей степени – гетерозигот полиморфизма rs5918. Следствием таких изменений является повышение реактивности тромбоцитов [25]. Однако точные механизмы, вызывающие агрегацию тромбоцитов при наличии варианта С/С полиморфизма rs5918, до конца не изучены и требуют дальнейшего исследования.

Ген *ITGA2* кодирует белок интегрин альфа-2 – мембранный гликопротеин GPIa, находящийся на мембранах различных клеток, в том числе на тромбоцитах. На мембране тромбоцитов GPIa образует комплекс с GPIIb, являющимся одним из рецепторов коллагена. Полиморфизм rs1126643 гена *ITGA2* обусловлен заменой нуклеотида цитозина (C) на тимин (T). Эта мутация изменяет аминокислотную последовательность, что обуславливает корреляцию между этим полиморфизмом и уровнем экспрессии GPIa на мембране тромбоцитов [26]. В случае варианта Т/Т полиморфизма rs1126643 связь тромбоцитов с коллагеном происходит быстрее, гетерозиготные индивидуумы с вариантом С/Т демонстрируют промежуточный уровень экспрессии рецепторов [27]. Полученные в ходе исследования данные – ускорение индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов – соответствуют известным сведениям о функции интегрин альфа-2 и могут указывать на роль полиморфизма rs1126643 в патогенезе COVID-19, хотя его механизм остаётся не до конца ясным.

Полученные данные указывают на возможную роль генетической предрасположенности, в частности полиморфизмов rs6065 гена *GP1BA*, rs1126643 гена *ITGA2* и rs5918 гена *ITGB3*, в гиперактивации тромбоцитов у больных с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких. Эти сведения могут быть использованы для планирования более масштабных исследований с целью оценки потенциального риска тромботических осложнений, определения дальнейшей тактики лечения и выбора антикоагулянтной и дезагрегантной терапии. Звенья гемостаза контролируются различными генами, и влияние их полиморфизмов на патогенез COVID-19 исследовано недостаточно; связь генетических факторов с возможными осложнениями и тяжестью течения болезни требует дальнейшего исследования.

ВЫВОДЫ

У больных с COVID-19-ассоциированным поражением лёгких среднего и тяжёлого течения ускоряется индуцированная агрегация тромбоцитов; при тяжёлом течении снижается количество тромбоцитов в крови. При средней тяжести поражения лёгких повышается частота встречаемости гетерозиготного С/Т и гомозиготного мутантного Т/Т генотипов полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2*; наличие Т/Т генотипа ассоциировано с коллаген-индуцированной агрегацией тромбоцитов; при тяжёлом поражении лёгких повышается частота встречае-

мости гомозиготного мутантного генотипа С/С полиморфизма rs5918 гена *ITGB3*, наличие генотипов С/С и С/Т полиморфизма rs5918 связано с АДФ-индуцированной агрегацией тромбоцитов.

Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта внутривузовского конкурса, посвящённого Году науки и технологий, на соискание грантов научными коллективами ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России 2021 г.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Barrett TJ, Schlegel M, Zhou F, Gorenchtein M, Bolstorff J, Moore KJ, et al. Platelet regulation of myeloid suppressor of cytokine signaling 3 accelerates atherosclerosis. *Sci Transl Med*. 2019; 11(517): eaax0481. doi: 10.1126/scitranslmed.aax0481
- Rolfes V, Ribeiro LS, Hawwari I, Böttcher L, Rosero N, Maasewerd S, et al. Platelets fuel the inflammasome activation of innate immune cells. *Cell Rep*. 2020; 31(6): 107615. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107615
- Zhou T, Su TT, Mudianto T, Wang J. Immune asynchrony in COVID-19 pathogenesis and potential immunotherapies. *J Exp Med*. 2020; 217(10): e20200674. doi: 10.1084/jem.20200674
- Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 2020; 369(6508): eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511
- Smilowitz NR, Kunichoff D, Garshick M, Shah B, Pillinger M, Hochman JS, et al. C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19. *Eur Heart J*. 2021; 42(23): 2270-2279. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa1103
- Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KE. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(8): 2940-2947. doi: 10.1128/JCM.00636-10
- Denorme F, Manne BK, Portier I, Petrey AC, Middleton EA, Kile BT, et al. COVID-19 patients exhibit reduced procoagulant platelet responses. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(11): 3067-3073. doi: 10.1111/jth.15107
- Zaid Y, Puhm F, Allaeyes I, Naya A, Oudghiri M, Khalki L, et al. Platelets can associate with SARS-CoV-2 RNA and are hyperactivated in COVID-19. *Circ Res*. 2020; 127(11): 1404-1418. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317703
- Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020; 7(6): e438-e440. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020; 382(18): 1708-1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032
- Ponti G, Pastorino L, Manfredini M, Ozben T, Oliva G, Kaleci S, et al. COVID-19 spreading across world correlates with C677T allele

of the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene prevalence. *J Clin Lab Anal.* 2021; 35(7): e23798. doi: 10.1002/jcla.23798

12. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): временные методические рекомендации; 15-я версия от 02.02.2022. М.; 2022. [Prevention, diagnosis and treatment of a new coronavirus infection (COVID-19): Federal clinical guidelines; 15th version d.d. 02.02.2022. Moscow; 2022. (In Russ.)] URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf. [date of access: 03.04.2023].

13. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(4): 844-847. doi: 10.1111/jth.14768

14. Gaiz A, Mosawy S, Colson N, Singh I. Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity. *Biomed Pharmacother.* 2017; 94: 679-686. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.121

15. Castaman G, Federici AB. Type 2B von Willebrand disease: A matter of plasma plus platelet abnormality. *Semin Thromb Hemost.* 2016; 42(5): 478-482. doi: 10.1055/s-0036-1579638

16. Анисимова А.В., Гунченко А.С., Иконникова А.И., Галкин С.С., Авдонина М.А., Наседкина Т.В. Клинико-генетический анализ факторов риска развития острой и хронической ишемии головного мозга. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2019; 119(3 вып. 2): 62-67. [Anisimova AV, Gunchenko AS, Ikonnikova AYU, Galkin SS, Avdonina MA, Nasedkina TV. Clinical and genetic analysis of risk factors for the development of acute and chronic cerebral ischemia. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry.* 2019; 119(3 vyp 2): 62-67. (In Russ.)]. doi: 10.17116/jnevro201911903262

17. Kraft P, Drechsler C, Gunreben I, Heuschmann PU, Kleinschnitz C. Case-control study of platelet glycoprotein receptor Ib and IIb/IIIa expression in patients with acute and chronic cerebrovascular disease. *PLoS One.* 2015; 10(3): e0119810. doi: 10.1371/journal.pone.0119810

18. Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *J Thromb Haemost.* 2013; 11(4): 605-614. doi: 10.1111/jth.12144

19. Huang J, Li X, Shi X, Zhu M, Wang J, Huang S, et al. Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J Hematol Oncol.* 2019; 12(1): 26. doi: 10.1186/s13045-019-0709-6

20. Pagani G, Pereira JP, Stoldt VR, Beck A, Scharf RE, Gohlke H. The human platelet antigen-1b (Pro33) variant of $\alpha\text{IIb}\beta_3$ allosterically shifts the dynamic conformational equilibrium of this integrin toward the active state. *J Biol Chem.* 2018; 293(13): 4830-4844. doi: 10.1074/jbc.RA118.002149

21. Abboud N, Ghazouani L, Ben-Hadj-Khalifa S, Anabi F, Added F, Khalfallah A, et al. Human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, and HPA-3 polymorphisms associated with extent of severe coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2010; 29(4): 409-415. doi: 10.1007/s11239-009-0368-5

22. Goldschmidt-Clermont PJ, Coleman LD. Higher prevalence of GPIIIa PIA2 polymorphism in siblings of patients with premature coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 123(12): 1223-1229. doi: 10.5858/1999-123-1223-HPOGPA

23. Kucharska-Newton AM, Monda KL, Campbell S, Bradshaw PT, Wagenknecht LE, Boerwinkle E, et al. Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis.* 2011; 216(1): 151-156. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.038

24. Čeri A, Leniček Krleža J, Coen Herak D, Miloš M, Pavić M, Barišić N, et al. Role of platelet gene polymorphisms in ischemic pediatric stroke subtypes: A case-control study. *Croat Med J.* 2020; 61(1): 18-27. doi: 10.3325/cmj.2020.61.18

25. Ezer E, Schrick D, Tóké-Füzesi M, Szapary L, Bogar L, Molnar T. A novel approach of platelet function test for prediction of attenuated response to clopidogrel. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2019; 73(2): 359-369. doi: 10.3233/CH-190580

26. Al-Tae HZ, Alsabti ZM, Al-Ani LM. Genetic study of ITGA2 polymorphisms and impact on diabetic retinopathy risk in Al-Anbar population. *J Pharmaceut Sci Res.* 2021; 10(9): 2305-2308. doi: 10.5281/zenodo.544911

27. Li W, Pi L, Yuan J, Gu X, Wang Z, Liu Y, et al. Impact of platelet glycoprotein Ia/IIa *C807T* gene polymorphisms on coronary artery aneurysms of KD patients. *Cardiol Res Pract.* 2021; 2021: 4895793. doi: 10.1155/2021/4895793

Сведения об авторах

Осиков Михаил Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель отдела научной работы, ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», e-mail: prof.osikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

Антонов Владимир Николаевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры терапии Института дополнительного профессионального образования, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; руководитель Областного пульмонологического центра, ГАУЗ «Областная клиническая больница № 3», e-mail: ant-vn@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3531-3491>

Зотов Семён Олегович – ассистент кафедры патологической физиологии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России; заведующий инфекционным отделением № 5 Областного инфекционного центра, ГАУЗ «Областная клиническая больница № 3», e-mail: semenz2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7469-2386>

Information about the authors

Mikhail V. Osikov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Head of the Research Department, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, e-mail: prof.osikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

Vladimir N. Antonov – Dr. Sc. (Med.), Professor at the Department of Therapy, Institute of Continuing Professional Education, South Ural State Medical University; Head of the Regional Pulmonology Center, Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, e-mail: ant-vn@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3531-3491>

Semen O. Zotov – Teaching Assistant at the Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University; Head of the Infectious Diseases Department No. 5, Regional Center for Infectious Diseases, Regional Clinical Hospital No. 3, e-mail: semenz2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7469-2386>