

Научная статья

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА РАЗВИТИЯ ПРОТРОМБОГЕННОЙ ГОТОВНОСТИ ПРИ ИНФЕКЦИИ COVID-19 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ

Н.А. Воробьева, А.И. Воробьева, А.С. Воронцова

Северный государственный медицинский университет, Россия, 163000, г. Архангельск, Троицкий пр., 51

Инфекция COVID-19 представляет особую опасность в отношении развития декомпенсации исходных хронических заболеваний, специфического поражения сердечно-сосудистой системы, высокого риска развития неблагоприятных исходов в виде тромботических событий. Патогенез коронавирусной инфекции сложен и до сих пор не изучен, что во многом зависит от особенностей вируса и исходного состояния системы гемостаза пациента.

Осуществлен анализ молекулярно-генетических маркеров системы гемостаза у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 как прогностического триггера риска развития протромботической готовности.

Объект исследования – госпитализированные пациенты с инфекцией COVID-19. Проведен молекулярно-генетический анализ основных генов факторов системы гемостаза – факторы V (rs6025), II (rs1799963), I (rs1800790), VII (rs6046), XIII A1 (rs5985), IGN A2 (rs1126643), IGN B3 (rs5918), PAI-1 (rs1799889). Оценка степени выраженности тромбоинемии определялась с помощью теста генерации тромбина на автоматическом коагулометре Severon@alpha с TGA-модулем.

Полиморфизм в генах PAI-1, протромбина (FII), фибриногена (FI) определял высокий уровень тромбоинемии по показателям теста кинетики тромбина (эндогенного тромбинового потенциала (AUC), пиковой концентрации тромбина (Peak thrombin), времени достижения пика генерации тромбина (tPeak), уровня фибриногена и D-димера у пациентов с COVID-19 в течение всего периода госпитализации. Показано, что повышенная генерация тромбина, проявляющаяся повышенным уровнем эндогенного тромбинового потенциала (AUC), может являться прогностическим признаком протромботического состояния у пациентов с генетическим полиморфизмом в генах PAI-1 и фибриногена.

Полученные результаты свидетельствуют о генетической детерминации состояния протромботической готовности при наличии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией аллельных вариантов в генах PAI-1, протромбина (фактора II) и фибриногена (фактора I).

Ключевые слова: COVID-19, генотип, риск, мутация, тромбоинемия, полиморфизм, тромбин, тромбоз.

Пандемия COVID-19 привела к кризису в области здравоохранения, унесшему миллионы жизней по всему миру. Клинические симптомы инфекции варьируются от легких до критических, наиболее частым тяжелым проявлением является пневмония с острым респираторным дистресс-синдромом и органной недостаточностью. Новая вспышка коронавирусной инфекции в случае тяжелого течения представляет особую опасность и в отношении развития декомпенсации исходных хро-

нических заболеваний, специфического поражения сердечно-сосудистой системы, высокого риска развития неблагоприятных исходов в виде тромботических событий [1]. Данные зарубежных и отечественных исследований свидетельствуют о высокой частоте развития тромботических событий у госпитализированных пациентов с COVID-19 некротического течения, несмотря на проведение стандартной тромбопрофилактики. Патогенез коронавирусной инфекции сложен и до сих пор не изучен, что во

© Воробьева Н.А., Воробьева А.И., Воронцова А.С., 2023

Воробьева Надежда Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой клинической фармакологии и фармакотерапии (e-mail: nadejdav0@gmail.com; тел.: 8 (921) 246-28-06; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6613-2485>).

Воробьева Алена Ивановна – научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории (e-mail: greenhamster@rambler.ru; тел.: 8 (911) 223-98-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4817-6884>).

Воронцова Александра Сергеевна – младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории (e-mail: baklab1gkb@yandex.ru; тел.: 8 (991) 113-83-76; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3643-0515>).

многим зависит от особенностей самого вируса и исходного состояния системы гемостаза пациента [2]. Известно, что провоспалительные цитокины при инфекции COVID-19 стимулируют экспрессию тканевого тромбопластина на иммунных клетках и инициируют активацию свертывания крови. Дисфункция эндотелия, вызванная воспалением, дополнительно ускоряет протромботическую готовность, повышенную генерацию тромбина, угнетает активность фибринолиза за счет уменьшения активности активатора плазминогена урокиназного типа и повышения высвобождения ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (PAI-1) [3–7].

В настоящее время активно рассматриваются вопросы генетической предрасположенности к тяжелому течению коронавирусной инфекции. Так, ранее было показано, что изменения в гене ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2), меняющие структуру данного рецептора могут облегчить или усложнить вирусу проникновение в клетку. Существуют отдельные данные, свидетельствующие, что дефицит функции белка ApoE при SARS-CoV-2 может способствовать прогрессированию заболевания и развитию ряда осложнений, обсуждается влияние генов гистосовместимости 1-го типа на течение ковид-инфекции [8–11].

При этом важно отметить, что роли наследственной тромбофилии высокого риска при инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, не уделяется должного внимания. Ранее было показано, что наследственно детерминированные тромбофилии высокого риска, такие как мутация фактора II (протромбина), фактора V Лейдена, а также аллельные варианты в гене PAI-1, могут не проявлять себя в течение всей жизни, но при таких триггерах, как травма, тяжелая инфекция, сепсис, беременность, могут манифестировать органическими нарушениями, прогрессированием тромбозами, тромбозами различной локализации, а в тяжелых случаях – развитием синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) [7, 12, 13]. Следует отметить, что результаты молекулярно-генетического анализа для выявления протромботического полиморфизма в генах системы гемостаза могут влиять на интенсивность и длительность антитромботической терапии [7, 14–16].

В настоящее время используемые и доступные лабораторные тесты не позволяют объективно и достоверно прогнозировать риск развития и тяжесть состояния тромбинемии при инфекции COVID-19 на фоне генетической предрасположенности и, как следствие, выбрать соответствующий оптимальный режим антитромботической профилактики или терапии.

Цель исследования – анализ молекулярно-генетических маркеров системы гемостаза у пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19

как прогностического триггера риска развития протромботической готовности.

Материалы и методы. Проспективное клинико-лабораторное исследование выполнено в период пандемии COVID-19 (апрель 2020 г. – май 2021 г.) на базе Регионального центра антитромботической терапии ГБУЗ АО «Первая городская клиническая больница им. Е.Е. Волосевич» (г. Архангельск) с включением 100 пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением новой коронавирусной инфекции.

Критериями включения в исследование явились: подтвержденная методом ПЦР-анализа инфекция COVID-19; госпитализация в ковидное отделение; письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании; возраст старше 18 лет. Критерии исключения: отказ от участия в исследовании; возраст младше 18 лет. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом Северного государственного медицинского университета (протокол № 2/20 от 23.04.2020).

Лабораторные исследования выполнены на базе Регионального центра антитромботической терапии и бактериологической лаборатории ГБУЗ АО «Первая ГКБ им. Е.Е. Волосевич» (Архангельск). Отбор образцов плазмы осуществляли трижды: первая точка – при госпитализации пациента в стационар до назначения антитромботической терапии, вторая точка – на 3–5-е сутки госпитализации на фоне антитромботической терапии низкомолекулярными гепаринами (НМГ), третья – на 9–10-е сутки госпитализации на фоне антитромботической терапии НМГ.

Материалом для молекулярно-генетического анализа протромботического статуса явилась венозная кровь, полученная путем венопункции локтевой вены объемом 4,5 мл в вакуумный вакутейнер с ЭДТА (этилендиаминуксусная кислота). В качестве материала исследования использовался образец геномной ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови. Для генотипирования полиморфизма и мутаций системы гемостаза использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом продукта.

Для анализа коагуляционных показателей (вакутейнер с цитратом натрия) полученные образцы крови центрифугировали при скорости 3000 об./мин в течение 15 мин. Исходя из временных методических рекомендаций версии 11, действующих на период проведения исследования, определяли протромбиновое время (ПВ), D-димер, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), фибриноген на автоматическом анализаторе Sysmex CS-2000i (Sysmex, Япония) в течение 30 мин с момента забора крови в вакутейнер¹.

¹ Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): Временные методические рекомендации. Версия 11 (07.05.2021) [Электронный ресурс] / утв. Заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Е.Г. Камкиным // Минздрав РФ. – URL: <http://nasci.ru/?id=40123&download=1> (дата обращения: 30.03.2022).

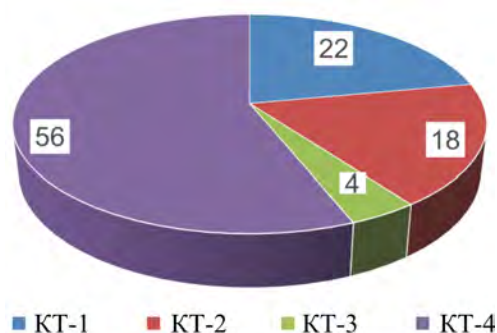


Рис. 1. Класс тяжести течения коронавирусной инфекции по данным томографии легких

Дополнительно для оценки степени выраженности тромбинемии определяли показатели кинетики тромбина на автоматическом коагулометре Severon® alpha с TGA-модулем с использованием реагентов Severon TGA High (Technoclone GmbH, Австрия). Измерены и проанализированы время лаг-фазы (tLag), время образования пика тромбина (tPeak), пик тромбина (Peak), эндогенный тромбиновый потенциал (AUC).

Статистический анализ выполнен с использованием программы SPSS Statistics, версия 20.0, и калькулятора MedCalc. Количественные переменные представлены как *Me* (median) и 25, 75-й процентиля, качественные данные – в виде относительной частоты и 95%-ного доверительного интервала для доли. Сравнение количественных данных между зависимыми группами проводилось с помощью двухвыборочного критерия Вилкоксона. Критический уровень статистической значимости (*p*) принимался равным 0,05. Используются методы корреляционного анализа (коэффициенты линейной корреляции Пирсона и ранговой корреляции Спирмена), регрессионного анализа (множественная линейная регрессия и множественная логистическая регрессия).

Результаты и их обсуждение. Анализ тяжести течения новой коронавирусной инфекции показал, что медианный возраст пациентов, включенных в исследование, составил 63 [31; 85] года, из них женщин – 60 %, 4-й класс тяжести коронавирусной пневмонии наблюдался в 56 % случаев (рис. 1). У госпитализированных пациентов с внегоспитальными пневмониями картина по данным СКТ соответствовала классификации КТ-4, госпитальные

пневмонии развились у 1/3 пациентов, где также преобладали пациенты с КТ-4.

Как демонстрирует реальная клиническая практика, лабораторная диагностика протромботической готовности (тромбинемии) определяет решающую роль как в патогенезе, так и в интенсивной терапии инфекции COVID-19. В настоящее время лабораторными критериями ковид-ассоциированной коагулопатии и воспаления являются лабораторные маркеры, рекомендованные научными обществами [17, 18]. При этом следует учитывать, что рекомендуемые стандартные или рутинные гемостазиологические тесты, такие как протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, уровень D-димера, фибриногена, не способны выявить состояние протромботической готовности при новой коронавирусной инфекции, а также спрогнозировать тяжесть протромботического состояния. Анализ динамики рутинных лабораторных показателей системы гемостаза у пациентов с COVID-19 представлен в табл. 1.

Было выявлено, что уровень D-димера статистически значимо повышался к четвертым суткам госпитализации, несмотря на проводимую анти-тромботическую терапию НМГ, уровни фибриногена и ферритина снижались только к десятым суткам терапии (рис. 2, 3). При этом важно отметить, что указанные лабораторные тесты относятся к лабораторным маркерам диагностики как состояния гиперкоагуляции, так и системного воспаления [19, 20], рутинные клотинговые тесты (АЧТВ, МНО) не показали диагностической значимости для выявления состояния тромбинемии.

Нами выдвигалась гипотеза, согласно которой клиническому проявлению тромбинемии у части пациентов с инфекцией COVID-19 может предшествовать наличие наследственного генетически детерминированного тромбофилического состояния, характеризующегося повышенным риском развития протромботической готовности на фоне носительства полиморфизма в генах фибриногена, протромбина и PAI-1, связанное с регуляцией кинетики (генерации) тромбина. В связи с этим мы посчитали возможным в группе пациентов с диагнозом новой коронавирусной инфекции провести молекулярно-генетическое исследование на предмет наличия генетического полиморфизма в системе гемостаза, указывающего на наследственно детерминированное тромбофилическое состояние.

Таблица 1

Динамика рутинных показателей коагулограммы у пациентов с COVID-19 (*Me* [Q_1 – Q_3])

Показатель	Сутки госпитализации		
	первые	четвертые	десятые
Тромбоциты, 10^9 /л	246 [85–407]	287 [70–615]	319 [179–500]*
АЧТВ, с	34,7 [30–47]	36,8 [30–49]	34,2 [23–79]
Фибриноген, г/л	5,4 [2,3–6,8]	5,8 [3,2–6,5]	4,4 [2,8–7,2]**
D-димер, мг/мл	1,16 [0,2–7,0]	1,6 [0,3–5,5]*	1,2 [0,1–4,2]**
МНО, ед.	1,02 [0,8–1,0]	1,1 [0,9–1,1]	1,2 [1,0–1,2]

Примечание: * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с первыми сутками; ** $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с четвертыми сутками.

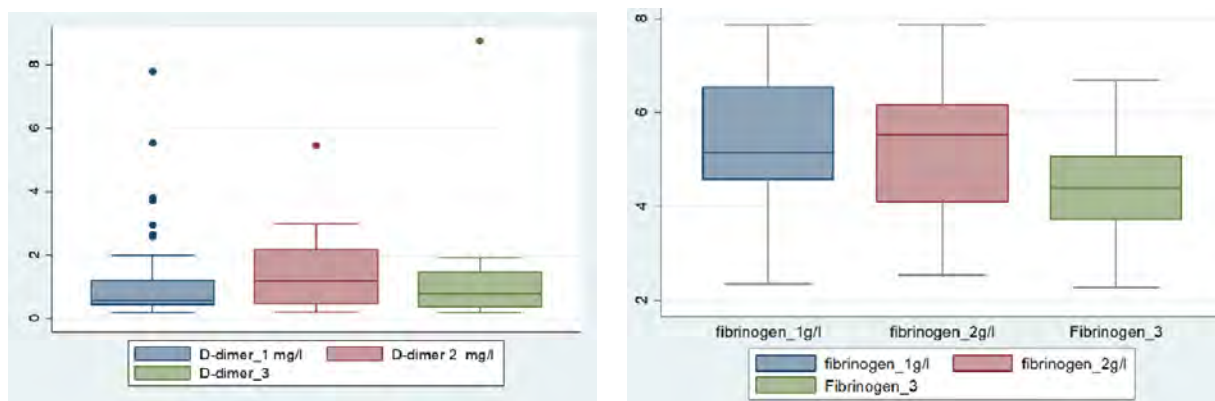


Рис. 2. Динамика показателей D-димера (мг/л), фибриногена (г/л) за время госпитализации: первые, четвертые, десятые сутки ($n = 100$)

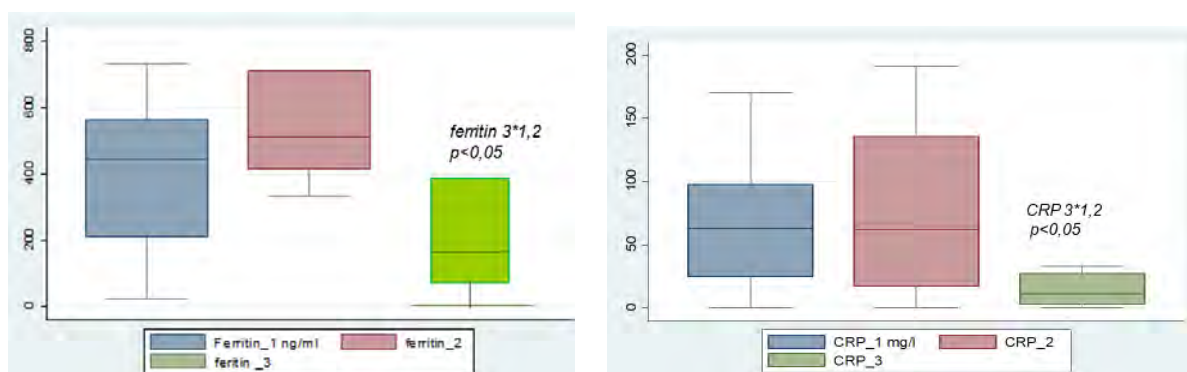


Рис. 3. Динамика показателей ферритина (нг/мл), СРБ (мг/л) за время госпитализации: первые, четвертые, десятые сутки ($n = 100$)

Исходя из основной цели нашего исследования, был выполнен молекулярно-генетический анализ основных генов факторов системы гемостаза, детерминирующих коагуляционное звено (Factor V (rs6025), Factor II (rs1799963), Factor I (rs1800790), Factor VII (rs6046), Factor XIII A1 (rs5985)), тромбоцитарное звено (IGN A2 (rs1126643), IGN B3 (rs5918)) и активность фибринолиза (PAI-1 (rs1799889)), рекомендуемых для проведения персонализированной фармакотерапии (табл. 2) [21]. Данные проведенного молекулярно-генетического тестирования показали, что самым распространенным генетическим полиморфизмом по всем исследуемым генам системы гемостаза в данной выборке пациентов явился «дикий тип», и только в гене PAI-1 (rs1799889) преобладал гетерозиготный полиморфизм – в 49 % и гомозиготный – в 34 % случаев (табл. 2).

Следующим этапом исследования явился анализ взаимосвязи генетического полиморфизма факторов системы гемостаза (FII 20210 G > A (rs1799963), FV 1691 G > A (rs6025), PAI-1 675 5G > 4G (rs1799889)) с тяжестью ковид-ассоциированной коагулопатии с использованием рекомендуемых рутинных тестов. Анализ показал статистически значимый рост уровня фибриногена к четвертым суткам (более 6,0 г/л; $p < 0,001$) на фоне носительства гетерозиготного аллельного варианта в генах PAI-1, фактора V и II. При этом уровень D-димера изменялся недостоверно с

тенденцией к повышению у большинства пациентов независимо от генотипа исследуемых факторов системы гемостаза (табл. 3).

Согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) к наследственным тромбофилиям высокого риска относятся мутации в генах факторов II и V. В связи с этим нами проведен анализ наличия возможной взаимосвязи генетического полиморфизма в генах факторов протромбина FII 20210 G > A, V Лейден G > A с уровнем тромбинемии у пациентов с COVID-19. Анализ подтвердил, что уровень тромбинемии был выше у пациентов с наличием генетического полиморфизма в указанных генах (рис. 4).

Регрессионный анализ независимых предикторов тромбинемии и зависимой переменной D-димера при госпитализации (первые сутки) показал, что риск повышения уровня D-димера более 0,5 мг/л возрастал у пациентов с наличием генетического полиморфизма в генах PAI-1 (гетерозиготный аллельный вариант – β 95 % ДИ: 1,4 [0,6–2,13], $p = 0,001$; гомозиготный – β 95 % ДИ: 2,0 [0,3–1,5], $p = 0,008$) и гетерозиготного полиморфизма в гене фактора II (протромбин) (табл. 4).

По данным многофакторного анализа, на повышение уровня D-димера выше референсных значений достоверно влияло наличие генетического полиморфизма в гене PAI-1 и уровень ферритина выше 200 пг/мл (табл. 5).

Таблица 2

Распространенность генетических полиморфизмов генов системы гемостаза у пациентов с инфекцией COVID-19, n = 100

Исследуемый ген	Генотип	Частота встречаемости, %	95 % ДИ
Factor XIII A1 (rs5985)	103 (G/G)	47,0	41,0; 53,8
	103 (G/T)	40,0	33,7; 46,0
	103 (T/T)	12,0	10,0; 15,4
IGN A2 (rs1126643)	807 (C/C)	43,0	45,0; 59,0
	807 (C/T)	38,0	31,5; 44,0
	807 (T/T)	19,0	17,0; 22,4
IGN B3 (rs5918)	1565 (T/T)	66,0	60,0; 73,0
	1565 (T/C)	26,0	19,0; 31,0
	1565 (C/C)	12,0	10,0; 15,4
Factor V (rs6025)	1691 (G/G)	91,0	89,2; 92,8
	1691 (G/A)	6,0	4,2; 7,8
	1691 (A/A)	0	-
Factor II (rs1799963)	20210 (G/G)	93,0	90,6; 94,0
	20210 (G/A)	2,0	1,2; 4,4
	20210 (A/A)	0	-
PAI-1 (rs1799889)	-675 5G/5G	17,0	11,95; 22,51
	-675 4G/5G	49,0	42,2; 56,1
	675 4G/4G	34,0	30,8; 40,8
Factor I (rs1800790)	455 G/G	57,0	51,0; 63,8
	-455 G/A	37,0	30,7; 42,9
	-455 A/A	6,0	3,7; 9,4
Factor (VII rs6046)	10976 G/G	72,0	65,1; 78,2
	10976 G/A	23,0	17,0; 29,8
	10976 A/A	5,0	3,5; 7,9

Таблица 3

Уровень тромбинемии в зависимости от наличия аллельных вариантов в генах факторов II, V, PAI-1

Генетический полиморфизм	Сутки госпитализации					
	первые	четвертые	десятые	первые	четвертые	десятые
	D-димер, мг/л (Me)			Фибриноген, г/л (Me)		
PAI-1675 5G > 4G (rs1799889)						
5G/5G (n = 17)	0,9	1,5	3,2	4,9	4,6	4,0
4G/5G (n = 49)	1,4	1,5	1,5	5,5	5,0	4,6
4G/4G (n = 34)	0,9	0,9	0,7	5,3	5,7	4,1
FV 1691 G > A (rs6025)						
GG (n = 91)	1,3	1,8	1,2	5,4	5,0	4,5
GA (n = 6)	0,7	0,5	1,1	5,9	6,7	3,7
FII 20210 G > A (rs1799963)						
GG (n = 93)	0,6	1,5	3,03	5,0	5,15	4,4
GA (n = 2)	2,6	0,2	0,4	6,0	6,7	4,1

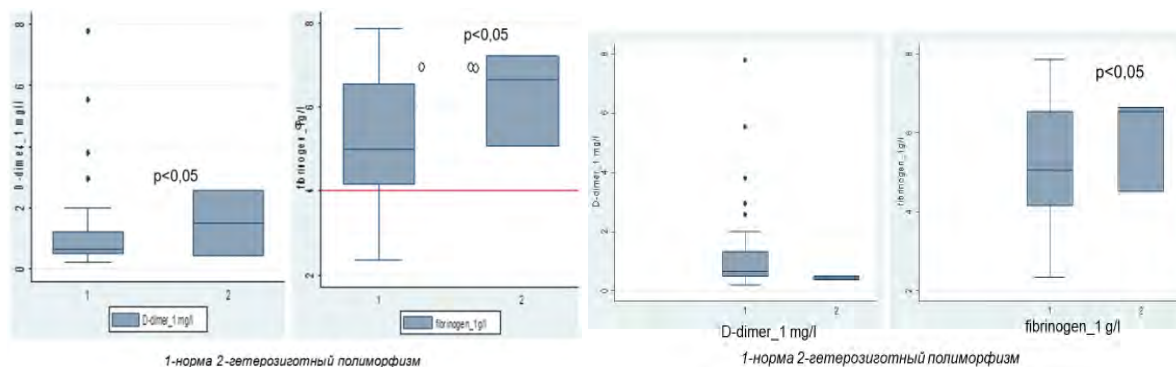


Рис. 4. Уровень D-димера и фибриногена при поступлении при наличии полиморфизма в гене FII 20210 G > A и в гене FV 1691 G > A

Таблица 4

Линейный регрессионный анализ (D-димер и генетический полиморфизм)

Независимый предиктор	D-димер		
	β	p	95 % ДИ
FV (rs6025) дикий тип	1,2	0,1	-2,4; 2,27
– гетерозиготный полиморфизм	0,7	0,2	0,1; 1,1
– гомозиготный полиморфизм	1,0	0,3	0,31; 1,5
PAI-I (rs1799889) дикий тип	0,9	0,1	-0,43; 1,2
– гетерозиготный полиморфизм	1,4	0,001	0,61; 2,13
– гомозиготный полиморфизм	2,0	0,008	0,31; 1,5
FII (rs1799963) дикий тип	1,0	0,6	
– гетерозиготный полиморфизм	0,3	0,01	0,3; 1,9

Таблица 5

Регрессионный анализ независимых предикторов тромбинемии и зависимой переменной D-димера при поступлении (первые сутки)

Предиктор тромбинемии	ОШ [95 % ДИ]	p
Наличие генетического полиморфизма в гене PAI-I (rs1799889)	1,2 [0,1–2,5]	0,005
Уровень ферритина более 200 нг/л	2,4 [1,1–5,4]	0,036
Уровень СРБ более 5,0 мг/л	0,1 [0,01–0,7]	0,999

Таблица 6

Показатели теста кинетики тромбина у пациентов с COVID-19 на момент включения в исследование до назначения антикоагулянтной терапии

Анализируемый показатель	Me [Q1; Q3]	Референсный показатель
Время инициации свертывания (Tlag), мин	2,46 [1,3–4,2]	7,8–13,6
Эндогенный тромбиновый потенциал (AUC, нМ), нМоль/мин	4425,1 [3400–5070]	1379,4–1735,9
Пиковое количество тромбина в образце (Peak), нМоль/мин	862,43 [680,4–1040]	98,4–153,7
Время достижения пика (tPeak), мин	5,87 [4,4–7,5]	16,7–23,2

Для объективизации лабораторной оценки состояния тромбинемии был использован тест генерации (кинетики) тромбина (ТГТ), который отражает количество генерируемого тромбина, кинетику его образования, и, таким образом, оценивается состояние протромботической готовности [22, 23]. Результаты анализа теста кинетики тромбина в нашем исследовании указывали на повышение прокоагулянтного потенциала крови у пациентов с COVID-19 уже при госпитализации в стационар. Так, было установлено, что у пациентов в первые сутки госпитализации статистически значимо изменялись все показатели кинетики тромбина, что свидетельствовало о значимой активации тромбина и состоянии тромбинемии – протромботической готовности (табл. 6).

Заключительным этапом данного исследования явился анализ взаимосвязи полиморфизма генов системы гемостаза с тестом кинетики тромбина как прогностического триггера риска развития протромботической готовности на фоне новой коронавирусной инфекции COVID-19. Корреляционный анализ времени инициации свертывания (Tlag) с генотипом

фактора I (фибриноген) показал отрицательную умеренную взаимосвязь, то есть наличие гетерозиготного полиморфизма в гене фибриногена ассоциировано с уменьшением времени задержки свертывания. Наличие гетерозиготного и гомозиготного полиморфизма в гене фибриногена было ассоциировано с увеличением пиковой концентрации тромбина (Peak), которая была достоверно выше, в отличие от таковой у пациентов без данного генетического полиморфизма (рис. 5).

Наличие гетерозиготного и гомозиготного полиморфизма в гене PAI-1 было ассоциировано с уменьшением времени достижения пика тромбина (tPeak), то есть у пациентов с альтернативным полиморфизмом в гене PAI-1 пик тромбина достигался быстрее (рис. 6).

Корреляционный анализ уровня эндогенного потенциала тромбина (AUC) и генотипов генов факторов свертывания I, II и PAI-1 показал, что наличие альтернативного полиморфизма в гене фибриногена, PAI-1 было ассоциировано с повышением эндогенного потенциала тромбина (рис. 7).

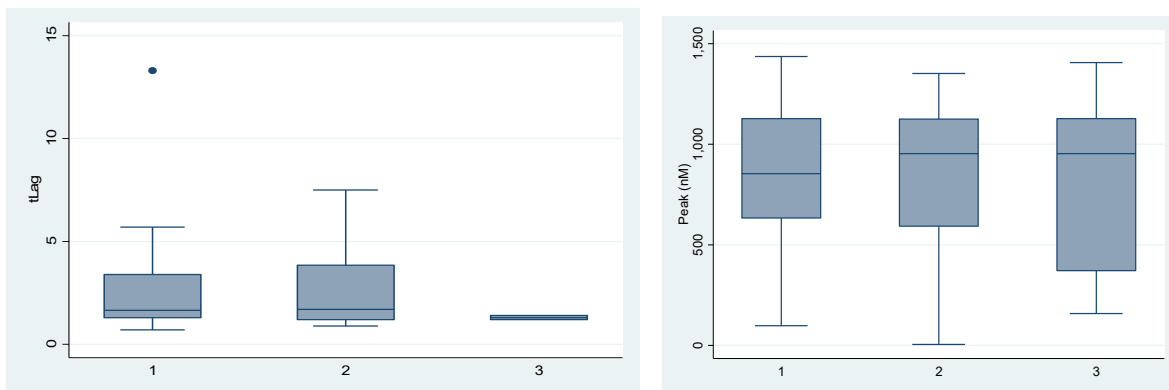


Рис. 5. Корреляционный анализ времени инициации свертывания (tLag), пиковой концентрации тромбина (Peak thrombin, nmol/l) с генотипом фактора I свертывания (фибриноген)

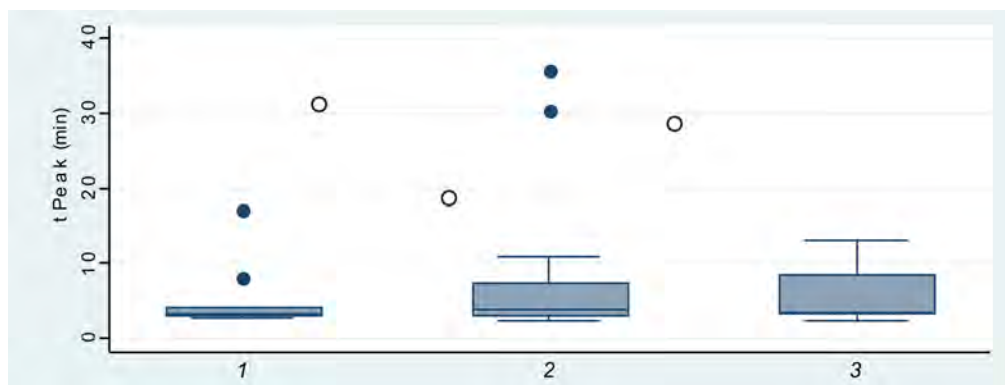


Рис. 6. Корреляционный анализ времени достижения пика генерации тромбина (tPeak, мин) с наличием генетического полиморфизма в гене PAI-1: 1 – дикий тип; 2 – гетерозиготный аллельный вариант; 3 – гомозиготный аллельный вариант

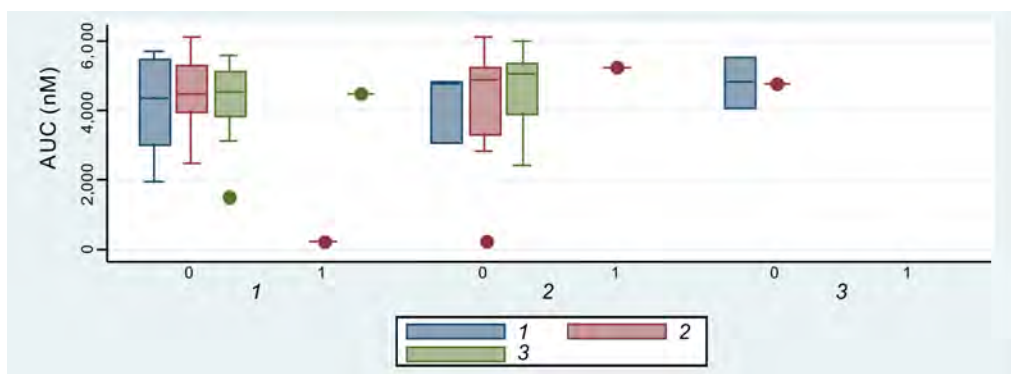


Рис. 7. Корреляционный анализ уровня эндогенного потенциала тромбина (AUC) и генотипов генов PAI-1, факторов свертывания II и I: 1 – дикий тип; 2 – гетерозиготный аллельный вариант; 3 – гомозиготный аллельный вариант

Выводы. Таким образом, полиморфизм в генах PAI-1, протромбина (FII), фибриногена (FI) определял высокий уровень тромбинемии по показателям теста кинетики тромбина (эндогенного тромбинового потенциала (AUC), пиковой концентрации тромбина (Peak thrombin), времени достижения пика генерации тромбина (tPeak), уровня фибриногена и D-димера) у пациентов с COVID-19 в течение всего периода госпитализации. Полученные результаты свидетельствуют о генетической детерминации со-

стояния протромботической готовности при наличии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией аллельных вариантов в генах PAI-1, протромбина (фактора II) и фибриногена (фактора I). Продemonстрировано, что повышенная генерация тромбина, проявляющаяся повышенным уровнем эндогенного тромбинового потенциала (AUC), может являться прогностическим признаком протромботического состояния у пациентов с генетическим полиморфизмом в генах PAI-1 и фибриногена.

Проведенное пилотное исследование показало, что молекулярно-генетическое тестирование на наличие наследственно детерминированной тромбоцитопении может рассматриваться в качестве прогностического маркера риска развития состояния тромбоцитопении – протромботической готовности у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением новой коронавирусной инфекции. Данные настоящего проспективного клинического исследования демонстрируют полезность предложенного молекулярно-генетического скрининга состояния тромбоцитопении при инфекции COVID-19. Врач-клиницист «красной» зоны ковидного госпиталя получает дополнительный объективный показатель, указывающий на возможность прогнозирования состояния тромбоцитопении на фоне остро го воспаления при инфекции COVID-19.

Скрининг наличия генетического полиморфизма в медицине критических состояний необхо-

дим при проведении патогенетически оправданной антипротромботической терапии, а также в превентивных целях. Полученные результаты указывают на возможные молекулярные механизмы состояния тромбоцитопении при инфекции COVID-19 и свидетельствуют о целесообразности широкого внедрения методов ДНК-диагностики в клиническую практику для оценки тяжести и прогнозирования протромботического состояния.

По результатам проведенного исследования получен патент на изобретение № 2789822 от 10 февраля 2023 г.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания – Рег. № НИОКТР 121030300111-7.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией статьи.

Список литературы

1. Risks of deep vein thrombosis, pulmonary embolism, and bleeding after COVID-19: nationwide self-controlled cases series and matched cohort study / I. Katsoularis, O. Fonseca-Rodríguez, P. Farrington, H. Jerndal, E. Häggström Lundevaller, M. Sund, K. Lindmark, A.-M. Fors Connolly // *BMJ*. – 2022. – Vol. 377. – P. e069590. DOI: 10.1136/bmj-2021-069590
2. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up: JACC State-of-the-Art Review / B. Bikdeli, M.V. Madhavan, D. Jimenez, T. Chuich, I. Dreyfus, E. Driggin, C. Der Nigoghossian, W. Agano [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2020. – Vol. 75, № 23. – P. 2950–2973. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.04.031
3. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China / C. Wu, X. Chen, Y. Cai, J. Xia, X. Zhou, S. Xu, H. Huang, L. Zhang [et al.] // *JAMA Intern. Med.* – 2020. – Vol. 180, № 7. – P. 934–943. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.0994
4. Soares M.P., Teixeira L., Moita L.F. Disease tolerance and immunity in host protection against infection // *Nat. Rev. Immunol.* – 2017. – Vol. 17, № 2. – P. 83–96. DOI: 10.1038/nri.2016.136
5. Kabouridis P.S., Jury E.C. Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582, № 27. – P. 3711–3718. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.10.006
6. Mannucci P.M., Franchini M. Classic thrombophilic gene variants // *Thromb. Haemost.* – 2015. – Vol. 114, № 5. – P. 885–889. DOI: 10.1160/TH15-02-0141
7. Role of functional plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism in susceptibility, severity, and outcome of meningococcal disease in Caucasian children / E. Haralambous, M.L. Hibberd, P.W.M. Hermans, N. Ninis, S. Nadel, M. Levin // *Crit. Care Med.* – 2003. – Vol. 31, № 12. – P. 2788–2793. DOI: 10.1097/01.CCM.0000100122.57249.5D
8. Receptor recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS Coronavirus / Y. Wan, J. Shang, R. Graham, R.S. Baric, F. Li // *J. Virol.* – 2020. – Vol. 94, № 7. – P. e00127-20. DOI: 10.1128/JVI.00127-20
9. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19 / Z. Varga, A.J. Flammer, P. Steiger, M. Haberecker, R. Andermatt, A.S. Zinkernagel, M.R. Mehra, R.A. Schuepbach [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395, № 10234. – P. 1417–1418. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5
10. Moore J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19 // *Science.* – 2020. – Vol. 368, № 6490. – P. 473–474. DOI: 10.1126/science.abb8925
11. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan [et al.] // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395, № 10223. – P. 497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
12. Воробьева Н.А., Недашковский Э.В. К вопросу об оптимизации интенсивной терапии острого ДВС-синдрома // *Анестезиология и реаниматология.* – 2003. – № 4. – С. 50–54.
13. Воробьева Н.А. Место генетических полиморфизмов системы гемостаза в генезе тромбофилических состояний // *Вестник Поморского университета.* – 2004. – № 2 (6). – С. 14–21
14. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome / P. Garred, J.J. Strom, L. Quist, E. Taaning, H.O. Madsen // *J. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 188, № 9. – P. 1394–1403. DOI: 10.1086/379044
15. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study / A.C. Gordon, A.L. Lagan, E. Aganna, L. Cheung, C.J. Peters, M.F. McDermott, J.L. Mollo, K.I. Welsh [et al.] // *Genes Immun.* – 2004. – Vol. 5, № 8. – P. 631–640. DOI: 10.1038/sj.gene.6364136
16. Воробьева Н.А., Капустин С.И. Роль генетического мониторинга системы гемостаза при тяжелом течении острого ДВС-синдрома // *Экология человека.* – 2005. – № 12. – С. 25–30.
17. Временные рекомендации Международного общества специалистов по тромбозу и гемостазу (ISTH) по выявлению и коррекции коагулопатии у пациентов с COVID-19: дайджест // *Атеротромбоз.* – 2020. – № 1. – С. 6–8. DOI: 10.21518/2307-1109-2020-1-6-8

18. Шатохин Ю.В., Снежко И.В., Рябикина Е.В. Нарушение гемостаза при коронавирусной инфекции // Южно-Российский журнал терапевтической практики. – 2021. – Т. 2, № 2. – С. 6–15. DOI: 10.21886/2712-8156-2021-2-2-6-15
19. Linkins L.A., Takach Lapner S. Review of D-dimer testing: good, bad, and ugly // Int. J. Lab. Hematol. – 2017. – Vol. 39, Suppl. 1. – P. 98–103. DOI: 10.1111/ijlh.12665
20. Thachil J., Lippi G., Favaloro E.J. D-dimer testing: laboratory aspects and current issues // Methods Mol. Biol. – 2017. – Vol. 1646. – P. 91–104. DOI: 10.1007/978-1-4939-7196-1_7
21. Colucci G., Tsakiris D.A. Thrombophilia screening revisited: an issue of personalized medicine // J. Thromb. Thrombolysis. – 2020. – Vol. 49, № 4. – P. 618–629. DOI: 10.1007/s11239-020-02090-y
22. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system / H.C. Hemker, R. Al Dieri, E. De Smedt, S. Béguin // Thromb. Haemost. – 2006. – Vol. 96, № 5. – P. 553–561.
23. Ex vivo thrombin generation patterns in septic patients with and without disseminated intravascular coagulation / L. Carlier, G. Hunault, N. Lerolle, L. Macchi // Thromb. Res. – 2015. – Vol. 135, № 1. – P. 192–197. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.11.001

Воробьева Н.А., Воробьева А.И., Воронцова А.С. Прогнозирование риска развития протромботической готовности при инфекции COVID-19 с использованием генетического тестирования // Анализ риска здоровью. – 2023. – № 2. – С. 130–139. DOI: 10.21668/health.risk/2023.2.12

UDC 616.13+575.1

DOI: 10.21668/health.risk/2023.2.12.eng



Research article

PREDICTING RISKS OF PROTHROMBOTIC READINESS UNDER COVID-19 USING GENETIC TESTING

N.A. Vorobyeva, A.I. Vorobyeva, A.S. Vorontsova

Northern State Medical University, 51 Troitskii Ave., Arkhangelsk, 163000, Russian Federation

COVID-19 poses a significant hazard as regards decompensation of underlying chronic diseases, specific damage to the cardiovascular system, and a high risk of negative health outcomes such as thrombotic events. The coronavirus infection pathogenesis is rather complicated and has not been studied yet; this is largely due to peculiar features of the virus and the initial state of homeostasis in a patient.

In this study, our aim was to analyze molecular-genetic markers of homeostasis in patients with the new coronavirus infection COVID-19 as a prognostic trigger of developing pro-thrombotic readiness.

Hospitalized patients with COVID-19 were chosen as study objects. We performed molecular-genetic analysis of basic genes significant for homeostasis including several factors such as V (rs6025), II (rs1799963), I (rs1800790), VII (rs6046), XIII A1 (rs5985), IGN A2 (rs1126643), IGN B3 (rs5918), and PAI-1 (rs1799889). The thrombinemia severity was identified by thrombin generation tests using the Ceveron@alpha automated coagulation analyzer with TGA-module.

Allelic variants of PAI-1, prothrombin (FII), and fibrinogen (FI) determined high thrombinemia as per the thrombin kinetics test (endogenous thrombin potential (AUC), peak thrombin concentration (peak-thrombin), time necessary to reach thrombin peak (tPeak), levels of fibrinogen and D-dimer) in COVID-19 patients during the entire hospitalization. We established that elevated thrombin generation becoming apparent through elevated levels of endogenous thrombin potential (AUC) might be a prognostic indicator of the pro-thrombotic state in patients with genetic polymorphisms of PAI-1 and fibrinogen.

The study results indicate that pro-thrombotic readiness is determined genetically in case COVID-19 patients have allelic variants in PAI-1, prothrombin (factor II) and fibrinogen (factor I) genes.

Keywords: COVID-19, genotype, risk, mutation, thrombinemia, polymorphism, thrombin, thrombosis.

© Vorobyeva N.A., Vorobyeva A.I., Vorontsova A.S., 2023

Nadezda A. Vorobyeva – Doctor of Medical Sciences, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Pharmacotherapy (e-mail: nadejdav0@gmail.com; tel.: +7 (921) 246-28-06; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6613-2485>).

Alyona I. Vorobyeva – Researcher at the Central Research Laboratory (e-mail: greenhamster@rambler.ru; tel.: +7 (911) 223-98-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4817-6884>).

Aleksandra S. Vorontsova – Junior Researcher at the Central Research Laboratory (e-mail: baklab1gkb@yandex.ru; tel.: +7 (991) 113-83-76; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3643-0515>).

References

1. Katsoularis I., Fonseca-Rodríguez O., Farrington P., Jerndal H., Häggström Lundevaller E., Sund M., Lindmark K., Fors Connolly A.-M. Risks of deep vein thrombosis, pulmonary embolism, and bleeding after COVID-19: nationwide self-controlled cases series and matched cohort study. *BMJ*, 2022, vol. 377, pp. e069590. DOI: 10.1136/bmj-2021-069590
2. Bikdeli B., Madhavan M.V., Jimenez D., Chuich T., Dreyfus I., Driggin E., Der Nigoghossian C., Agno W. [et al.]. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up: JACC State-of-the-Art Review. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2020, vol. 75, no. 23, pp. 2950–2973. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.04.031
3. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S., Huang H., Zhang L. [et al.]. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.*, 2020, vol. 180, no. 7, pp. 934–943. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.0994
4. Soares M.P., Teixeira L., Moita L.F. Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 83–96. DOI: 10.1038/nri.2016.136
5. Kabouridis P.S., Jury E.C. Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett.*, 2008, vol. 582, no. 27, pp. 3711–3718. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.10.006
6. Mannucci P.M., Franchini M. Classic thrombophilic gene variants. *Thromb. Haemost.*, 2015, vol. 114, no. 5, pp. 885–889. DOI: 10.1160/TH15-02-0141
7. Haralambous E., Hibberd M.L., Hermans P.W., Ninis N., Nadel S., Levin M. Role of functional plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism in susceptibility, severity, and outcome of meningococcal disease in Caucasian children. *Crit. Care Med.*, 2003, vol. 31, no. 12, pp. 2788–2793. DOI: 10.1097/01.CCM.0000100122.57249.5D
8. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS Coronavirus. *J. Virol.*, 2020, vol. 94, no. 7, pp. e00127-20. DOI: 10.1128/JVI.00127-20
9. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A. [et al.]. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10234, pp. 1417–1418. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5
10. Moore J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, 2020, vol. 368, no. 6490, pp. 473–474. DOI: 10.1126/science.abb8925
11. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G. [et al.]. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10223, pp. 497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
12. Vorobyova N.A., Nedashkovsky E.V. Optimization of intensive care in acute disseminated intravascular syndrome. *Anesteziologiya i reanimatologiya*, 2003, no. 4, pp. 50–54 (in Russian).
13. Vorob'eva N.A. Mesto geneticheskikh polimorfizmov sistemy gemostaza v geneze trombofilicheskikh sostoyanii [Role of genetic polymorphisms of the hemostasis system in the genesis of thrombophilic conditions]. *Arctic environmental research*, 2004, no. 2 (6), pp. 14–21 (in Russian).
14. Garred P., Strom J.J., Quist L., Taaning E., Madsen H.O. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J. Infect. Dis.*, 2003, vol. 188, no. 9, pp. 1394–1403. DOI: 10.1086/379044
15. Gordon A.C., Lagan A.L., Aganna E., Cheung L., Peters C.J., McDermott M.F., Millo J.L., Welsh K.I. [et al.]. TNF and TNFR polymorphisms in severe sepsis and septic shock: a prospective multicentre study. *Genes Immun.*, 2004, vol. 5, no. 8, pp. 631–640. DOI: 10.1038/sj.gene.6364136
16. Vorobyova N.A., Kapustin S.I. Role of hemostatic system's genetic monitoring during serious proceeding of acute syndrome of disseminated intravascular coagulation. *Ekologiya cheloveka*, 2005, no. 12, pp. 25–30 (in Russian).
17. The International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH) interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19: digest. *Aterotromboz*, 2020, no. 1, pp. 6–8. DOI: 10.21518/2307-1109-2020-1-6-8 (in Russian).
18. Shatohin Yu.V., Snezhko I.V., Ryabikina E.V. Violation of hemostasis in coronavirus infection. *Yuzhno-Rossiiskii zhurnal terapevticheskoi praktiki*, 2021, vol. 2, no. 2, pp. 6–15. DOI: 10.21886/2712-8156-2021-2-2-6-15 (in Russian).
19. Linkins L.A., Takach Lapner S. Review of D-dimer testing: good, bad, and ugly. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2017, vol. 39, suppl. 1, pp. 98–103. DOI: 10.1111/ijlh.12665
20. Thachil J., Lippi G., Favaloro E.J. D-dimer testing: laboratory aspects and current issues // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1646. – P. 91–104. DOI: 10.1007/978-1-4939-7196-1_7
21. Colucci G., Tsakiris D.A. Thrombophilia screening revisited: an issue of personalized medicine // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 2020. – Vol. 49, № 4. – P. 618–629. DOI: 10.1007/s11239-020-02090-y
22. Hemker H.C., Al Dieri R., De Smedt E., Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb. Haemost.*, 2006, vol. 96, no. 5, pp. 553–561.
23. Carlier L., Hunault G., Lerolle N., Macchi L. Ex vivo thrombin generation patterns in septic patients with and without disseminated intravascular coagulation. *Thromb. Res.*, 2015, vol. 135, no. 1, pp. 192–197. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.11.001

Vorobyeva N.A., Vorobyeva A.I., Vorontsova A.S. Predicting risks of prothrombotic readiness under COVID-19 using genetic testing. *Health Risk Analysis*, 2023, no. 2, pp. 130–139. DOI: 10.21668/health.risk/2023.2.12.eng

Получена: 02.04.2023

Одобрена: 18.05.2023

Принята к публикации: 02.06.2023