

УДК 616.92

ВЗАИМОСВЯЗЬ ГЕНОТИПА ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ КЛАССА I С ЛЕТАЛЬНОСТЬЮ COVID-19 У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

© 2022 г. М. Ю. Шкурников^{1,2,*}, Д. А. Аверинская¹, А. Г. Комаров³, И. А. Карбышев³,
Г. И. Спешилов³, И. А. Штинова³, Д. А. Дорошенко⁴,
В. И. Вечорко⁴, академик РАН О. М. Драпкина⁵

Поступило 11.08.2022 г.

После доработки 31.08.2022 г.

Принято к публикации 02.09.2022 г.

В многочисленных исследованиях было показано, что сахарный диабет (СД) повышает риск летального исхода COVID-19 в пять раз. Принято считать, что высокая летальность COVID-19 на фоне СД обусловлена основными осложнениями данного заболевания: микро- и макроангиопатиями, сердечной и почечной недостаточностью. Кроме того, показано, что острая респираторная вирусная инфекция увеличивает выработку интерферона гамма и повышает резистентность мышц к инсулину, модулирует активность эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов. Способность CD8+ Т-лимфоцитов распознавать зараженные SARS-CoV-2 клетки зависит не только от гуморальных факторов, но и от индивидуальных генетических особенностей, в том числе индивидуального набора молекул главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГС-I). В данном исследовании на выборке из 222 пациентов была изучена взаимосвязь генотипа ГКГС-I пациентов с СД в возрасте не старше 60 лет с исходом COVID-19. Показано, что летальные исходы COVID-19 у пациентов с СД связаны с низкой аффинностью взаимодействия индивидуального набора молекул ГКГС-I с пептидами SARS-CoV-2.

Ключевые слова: COVID-19, HLA, ГКГС-I, сахарный диабет

DOI: 10.31857/S2686738922060324

ВВЕДЕНИЕ

В многочисленных исследованиях было показано, что сахарный диабет (СД) повышает риск летального исхода COVID-19 в пять раз [1, 2]. Принято считать, что высокая летальность от COVID-19 на фоне СД обусловлена основными осложнениями данного заболевания: микро- и макроангиопатиями, сердечной и почечной не-

достаточностью. Кроме того, показано, что острая респираторная вирусная инфекция увеличивает выработку интерферона гамма и повышает резистентность мышц к инсулину, что осложняет течение СД. Резистентность к инсулину, в свою очередь, приводит к компенсаторной гиперинсулинемии для поддержания нормального уровня глюкозы. Следует отметить, что гиперинсулинемия может повышать противовирусный иммунитет за счет прямой стимуляции функциональной активности CD8+ эффекторных Т-клеток [3].

Эффекторные CD8+ Т-лимфоциты играют ключевую роль в противовирусном иммунитете на начальных этапах COVID-19 [4]. Молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I определяют эффективность презентации антигенов COVID-19. Сразу после попадания в клетку SARS-CoV-2 индуцирует трансляцию своих белков. Часть из них попадает в протеасому инфицированной клетки, расщепляется до пептидов длиной 8–12 аминокислотных остатков и связывается с молекулами ГКГС класса I. После связывания комплекс, состоящий из молекулы ГКГС класса I и вирусного пептида, переносится из комплекса Гольджи на поверхность клетки, где

¹ НИУ Высшая школа экономики, Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

³ ГБУЗ “Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы”, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ “Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова” Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

⁵ ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины” Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

*e-mail: mshkurnikov@hse.ru

он может быть распознан Т-клеточным рецептором CD8⁺ эффекторного Т-лимфоцита. В ответ на взаимодействие CD8⁺ Т-лимфоцит активируется и разрушает инфицированную клетку с помощью перфоринов и сериновых протеаз [5].

Молекулы ГКГС класса I кодируются генами HLA-A, HLA-B и HLA-C, каждый из которых может быть представлен в двух вариантах (аллелях). В популяции существуют десятки вариантов каждого аллеля, кодирующих молекулы ГКГС-I с индивидуальной способностью взаимодействовать с чужеродными пептидами. Индивидуальные комбинации молекул ГКГС-I существенно влияют на тяжесть многих инфекционных заболеваний [6].

Ранее нами было показано, что генотип HLA-I является значимым фактором риска тяжелого течения COVID-19 только у пациентов в возрасте не старше 60 лет [6]. Целью данного исследования была оценка вклада HLA-I генотипа у пациентов с СД в возрасте не старше 60 лет в исход COVID-19.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 36 пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа (коды МКБ E10 и E11), переболевшие COVID-19. В качестве группы сравнения была подобрана сопоставимая по возрасту группа из 186 пациентов, переболевших COVID-19 без сахарного диабета в анамнезе. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ГБУЗ ГКБ № 15 им. О.М. Филатова ДЗМ. Все пациенты подписали информированное согласие.

Оценка уровня D-димера осуществлялась на коагулометре ACL TOP 700 (IL Werfen, США) с помощью набора реагентов D-Dimer HS 500 (№ 0020500100). Уровень С-реактивного белка (СРБ) определялся с помощью набора реагентов CRP_2 (№ 06522059) на биохимическом анализаторе ADVIA 1800 (Siemens, ФРГ).

Геномную ДНК выделяли из замороженных образцов цельной крови с использованием набора реагентов ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА (ООО "НПО ДНК-Технология", Россия). Библиотеки для секвенирования 2 и 3 экзоны генов HLA-A, HLA-B и HLA-C готовили с помощью набора реагентов HLA-Эксперт (ООО "ДНК-Технологии", Москва, Россия). Секвенирование осуществляли с помощью платформы MiSeq (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) в режиме парноконцевого чтения по 250 нуклеотидов с использованием набора реагентов набора реагентов MiSeq 600 cycles v3. Аннотирование результатов секвенирования осуществлялось с использованием базы данных последовательностей основного комплекса гистосовместимости человека IMGT/HLA v3.41.0 [7].

Оценку отклонения распределений частот генотипов от канонического распределения Харди-Вайнберга проводили с помощью критерия Хи-квадрат, оценку степени различий по частоте аллелей между исследуемыми группами проводили с помощью точного критерия Фишера. Сравнение значимости различий в уровне D-димера и СРБ проводили с использованием критерия Вилкоксона. Статистический анализ результатов осуществлялся в среде R.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Была сформирована выборка из 222 пациентов, переболевших COVID-19, выполнено HLA-генотипирование и проведен анализ данных уровня D-димера и С-реактивного белка. Характеристика пациентов представлена в табл. 1. Группы сравнения значимо различались по исходу заболевания. Так, в группе пациентов с СД было отмечено 8 летальных исходов против 18 в группе сравнения (отношение шансов (ОШ) – 2.65, $p = 0.4$, 95% доверительный интервал (ДИ) 0.9–7.2). Подобная частота летальных исходов в два раза превосходит полученные ранее результаты для сопоставимой по возрасту выборки пациентов с СД [8]. Более высокая летальность может быть связана с тем, что в наше исследование вошли пациенты со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19. Необходимо отметить высокую частоту встречаемости ожирения (ОШ – 9.1, ДИ 3.8–22.3, $p = 7.4e-08$) и гипертонической болезни (ОШ – 5.1, ДИ 2.3–12.1, $p = 1.6e-05$) в группе пациентов с СД.

Анализ уровня СРБ показал, что его концентрация в плазме крови во время COVID-19 значимо выше у пациентов с СД (рис. 1а). Так, у пациентов без СД максимальный уровень СРБ составлял 60 (8–117) мг/л против 123 (62–170) мг/л у пациентов с СД ($p < 0.01$). СРБ преимущественно вырабатывается гепатоцитами в ответ на воздействие провоспалительных цитокинов, прежде всего интерлейкинов 6 и 1 [9, 10]. Принято считать, что высокий уровень СРБ характерен для бактериальных инфекций, так как он способен связываться с полисахаридами бактериальной стенки и инициировать комплекс комплемента через C1q [11]. При COVID-19 СРБ может не только подавлять сопутствующую бактериальную инфекцию, но и активизировать Т-клеточный иммунитет. Связываясь с фосфатидилхолином на поверхности апоптозных альвеоцитов, СРБ усиливает классический путь активации комплемента, что облегчает их поглощение макрофагами, имеющими рецепторы для комплемента CR3 и CR4 [12].

В группе пациентов с СД также был отмечен повышенный уровень D-димера (рис. 1б). У пациентов без СД максимальный уровень D-димера

Таблица 1. Характеристика выборки пациентов с COVID-19

Показатель	Пациенты с СД	Пациенты без СД	<i>p</i>
<i>n</i>	36	186	
Возраст, медиана [25%–75%]	50.5 [44–58]	47.5 [44–51]	0.07
Пол (муж./жен.)	23/13	106/80	0.47
Тяжесть			
Средняя	26	141	0.68
Тяжелая	10	45	
Исход			
Летальный	8	18	0.04
Выписан	28	168	
Ожирение	19	20	7.4e-08
Сердечно-сосудистые заболевания	8	19	0.053
Гипертония	24	52	1.6e-05
Заболевания органов дыхания	4	10	0.25
Онкологические заболевания в стадии ремиссии	2	8	0.67

составлял 830 (453–1578) нг/мл при максимальных значениях у пациентов с СД 1591 (1182–5014) нг/мл ($p < 0.01$). D-димер – продукт распада фибрина. Его высокий уровень при COVID-19 ассоциирован с микротромбозом капилляров и обструкцией легочных сосудов [13]. В то же время показано, что уровень D-димера не является независимым фактором риска для пациентов в возрасте до 70 лет [14].

HLA-генотипирование пациентов показало, что наиболее частыми аллелями в группе пациентов без СД были HLA-A*02:01 (частота 0.26) и HLA-A*01:01 (частота 0.14), что характерно для популяции московского региона [6]. Малый объем выборки не позволил выявить взаимосвязи отдельных аллелей HLA-I с СД (табл. 2). Тем не менее был оценен индекс риска тяжелого течения

Таблица 2. Характеристика частот аллелей ГКГС-I в выборке пациентов с COVID-19

Аллель	Частота аллели в группе		<i>p</i>	ОШ
	без СД	СД		
HLA-A*02:01	0.26	0.38	0.1	1.86
HLA-A*01:01	0.14	0.07	0.2	0.48
HLA-C*04:01	0.14	0.15	0.84	1.14
HLA-A*03:01	0.13	0.17	0.41	1.38
HLA-C*07:02	0.13	0.09	0.51	0.65
HLA-C*07:01	0.11	0.17	0.27	1.65
HLA-C*12:03	0.11	0.12	0.83	1.08
HLA-C*06:02	0.1	0.07	0.64	0.72
HLA-A*11:01	0.09	0.04	0.22	0.44
HLA-B*07:02	0.09	0.09	1	0.93

COVID-19 [6], отражающий интегральную способность индивидуального набора молекул ГКГС-I презентировать пептиды SARS-CoV-2 (рис. 2). Различия в индексе риска между пациентами без СД оказались недостоверными ($p = 0.69$). Однако в группе пациентов с СД индекс риска значительно различался между выздоровевшими пациентами и пациентами с летальным исходом ($p = 0.011$). При пороговом уровне индекса риска 53 чувствительность прогноза летального исхода составила 100%, а специфичность – 39.3% (AUC = 0.8). В группе пациентов с СД и индексом риска более 53 было отмечено 7 летальных исходов против 1 в группе с индексом риска менее 53 (ОШ – 10.2, $p = 0.4$, 95% ДИ 1.1–514). Данные результаты могут свидетельствовать о существенном вкладе способности ГКГС-I презентировать пептиды вируса SARS-CoV-2 в тяжесть течения COVID-19 у пациентов с СД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ уровня СРБ и D-димера подтверждает данные о более сильной воспалительной реакции и микротромбозе у пациентов с СД по сравнению с пациентами с нормальным гликемическим контролем.

2. Летальные исходы COVID-19 у пациентов с СД связаны с низкой аффинностью взаимодействия индивидуального набора молекул ГКГС-I с пептидами SARS-CoV-2.

3. Настоящее исследование демонстрирует дополнительные возможности в оценке риска тяжести течения COVID-19 у пациентов с СД.

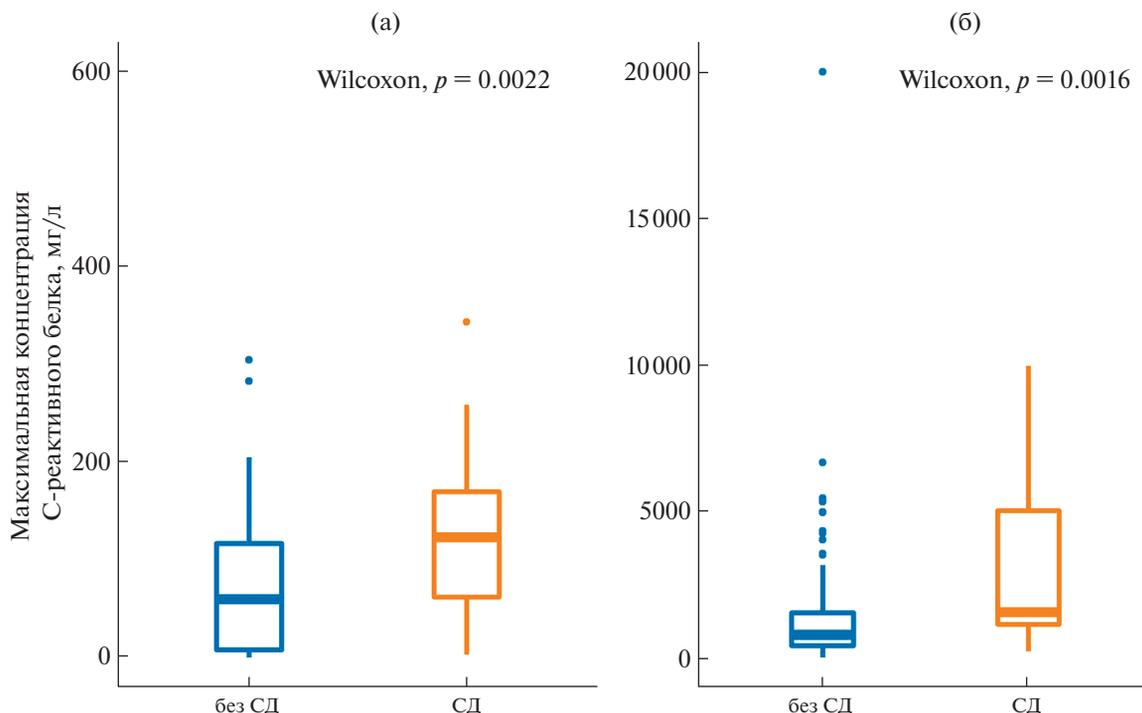


Рис. 1. Панель а – максимальная концентрация СРБ в группах сравнения. Панель б – максимальная концентрация D-димера в группах сравнения.

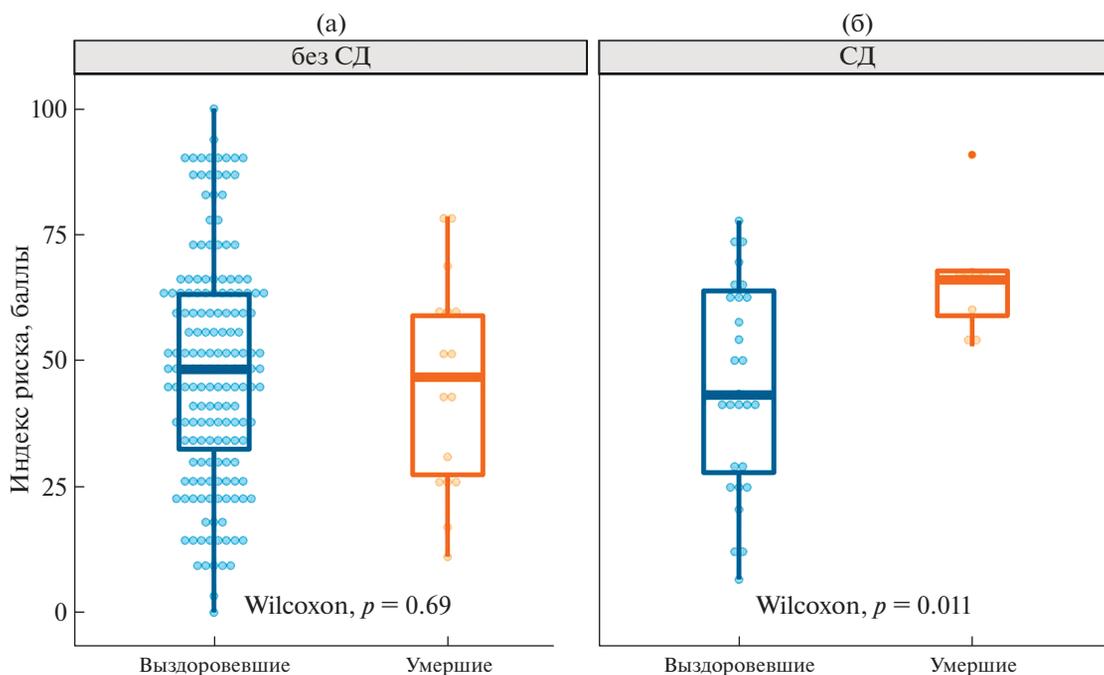


Рис. 2. Взаимосвязь индекса риска тяжелого течения COVID-19 с фактическим течением заболевания в группах сравнения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках реализации программы ДЗМ “Научное обеспечение столичного здравоохра-

нения на 2020–2022 гг.”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shafiee A., Teymouri Athar M.M., Nassar M., et al.* Comparison of COVID-19 outcomes in patients with Type 1 and Type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2022. V. 16. № 6. P. 102512.
2. *Yang J.K., Feng Y., Yuan M.Y., et al.* Plasma glucose levels and diabetes are independent predictors for mortality and morbidity in patients with SARS. // *Diabet Med*. 2006. V. 23. № 6. P. 623–628.
3. *Šestan M., Marinović S., Kavazović I., et al.* Virus-Induced Interferon- γ Causes Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Derails Glycemic Control in Obesity // *Immunity*. 2018. V. 49. № 1. P. 164–177.e6.
4. *Kusnadi A., Ramírez-Suástegui C., Fajardo V., et al.* Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells. // *Sci Immunol*. 2021. V. 6. № 55.
5. *Wherry E.J., Ahmed R.* Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. // *J Virol. American Society for Microbiology (ASM)*, 2004. V. 78. № 11. P. 5535–5545.
6. *Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevic T., et al.* Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19 // *Front Immunol. Frontiers*, 2021. V. 12. P. 641900.
7. *Robinson J., Barker D.J., Georgiou X., et al.* IPD-IMGT/HLA Database // *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48. № D1. P. D948–D955.
8. *Shestakova M.V., Vikulova O.K., Isakov M.A., et al.* Diabetes and COVID-19: analysis of the clinical outcomes according to the data of the russian diabetes registry // *Problems of Endocrinology*. 2020. V. 66. № 1. P. 35–46.
9. *du Clos T.W., Mold C.* C-Reactive Protein: An Activator of Innate Immunity and a Modulator of Adaptive Immunity // *Immunol Res*. 2004. V. 30. № 3. P. 261–278.
10. *Szalai A.J., van Ginkel F.W., Dalrymple S.A., et al.* Testosterone and IL-6 requirements for human C-reactive protein gene expression in transgenic mice. // *J Immunol*. 1998. V. 160. № 11. P. 5294–5299.
11. *Volanakis J.* Human C-reactive protein: expression, structure, and function // *Mol Immunol*. 2001. V. 38. № 2–3. P. 189–197.
12. *Pittoni V., Valesini G.* The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. // *Autoimmun Rev*. 2002. V. 1. № 3. P. 154–161.
13. *Goudot G., Chocron R., Augy J.-L., et al.* Predictive Factor for COVID-19 Worsening: Insights for High-Sensitivity Troponin and D-Dimer and Correlation With Right Ventricular Afterload // *Front Med (Lausanne)*. 2020. V. 7.
14. *Chocron R., Duceau B., Gendron N., et al.* D-dimer at hospital admission for COVID-19 are associated with in-hospital mortality, independent of venous thromboembolism: Insights from a French multicenter cohort study // *Arch Cardiovasc Dis*. 2021. V. 114. № 5. P. 381–393.

ASSOCIATION OF HLA CLASS I GENOTYPE WITH MORTALITY IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS AND COVID-19

M. Yu. Shkurnikov^{a,b,#}, D. A. Averinskaya^a, A. G. Komarov^c, I. A. Karbyshev^c, G. I. Speshilov^c, I. A. Shtinova^c, D. A. Doroshenko^d, V. I. Vechorko^d, and Academician of the RAS O. M. Drapkina^e

^a Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^c Moscow City Public Institution of Health Care Diagnostic Center (Laboratory Testing Center) of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

^d Moscow City Public Institution of Health Care O.M. Filatov City Clinical Hospital of Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation

^e National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: mshkurnikov@hse.ru

Numerous studies have shown that diabetes mellitus (DM) increases the risk of death from COVID-19 by five times. It is generally accepted that the high lethality of COVID-19 against the background of DM is due to the main complications of this disease: micro- and macroangiopathies, heart and kidney failure. In addition, it has been shown that acute respiratory viral infection increases interferon-gamma production and muscle resistance to insulin, modulating the activity of effector CD8+ T-lymphocytes. The ability of CD8+ T lymphocytes to recognize SARS-CoV-2 infected cells depends on the individual set of major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules. In this study, on a sample of 222 patients, the association of the MHC-I genotype of patients with diabetes aged less than 60 years with the outcome of COVID-19 was studied. It has been shown that lethal outcomes of COVID-19 in patients with DM are associated with the low affinity of the interaction of an individual set of MHC-I molecules with SARS-CoV-2 peptides.

Keywords: COVID-19, HLA, MHC-I, CD