

ИЗМЕНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ В СИСТЕМЕ «МАТЬ–ПЛОД» ПРИ COVID-19

Н. А. Ломова [✉], В. В. Чаговец, Е. Л. Долгополова, А. В. Новоселова, У. Л. Петрова, Р. Г. Шмаков, В. Е. Франкевич

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Вирус SARS-CoV-2 оказывает значительное влияние на организм человека, и актуален вопрос о характере этого воздействия на молекулярном уровне. COVID-19 не только оказывает влияние на мать в период беременности, но и повышает риск осложнений в раннем неонатальном периоде и может иметь отдаленные последствия для здоровья новорожденного. Целью исследования было определить влияние COVID-19 на аминокислотный состав венозной крови беременных, амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови для разработки диагностической панели, а также провести анализ возможных последствий для состояния новорожденного. Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную группу — 17 соматически здоровых женщин. На первом этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля. Обнаруженные различия в содержании аминокислот в различных биологических жидкостях позволили разработать модели логистической регрессии. По данным математического анализа задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в венозной и пуповинной плазме крови матерей и новорожденных в группе с COVID-19 обнаружено статистически значимое изменение биосинтеза и путей метаболизма ряда аминокислот, задействованных в реализации воспалительной реакции, изменений энергетического метаболизма, нарушений регуляции экспрессии и транскрипции белковых молекул и пр. Эти результаты могут быть использованы для выбора направления дальнейших исследований возможных последствий для здоровья новорожденных от матерей, перенесших COVID-19, и определения требований к лечению и медицинской помощи беременным женщинам и новорожденным после постановки диагноза COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, аминокислоты, масс-спектрометрия, плазма, пуповинная кровь, венозная кровь, амниотическая жидкость, маркеры состояния новорожденного, метаболические пути

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант рег. № 2004-60093.

Вклад авторов: Н. А. Ломова — анализ клинических данных, систематический анализ, написание рукописи; В. В. Чаговец — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, статистический анализ полученных данных, редактирование рукописи; Е. Л. Долгополова — сбор и подготовка биологических сред в условиях «красной зоны», статистический анализ результатов; А. В. Новоселова — проведение метаболомного анализа методом масс-спектрометрии, обработка масс-спектрометрических данных; У. Л. Петрова — сбор и подготовка биологических сред в условиях «красной зоны»; Р. Г. Шмаков — анализ клинических данных в условиях «красной зоны», систематический анализ, редактирование рукописи; В. Е. Франкевич — подготовка исследования, систематический анализ, написание и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 13 от 10 декабря 2020 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации, Международной конференции по гармонизации (ICH), Стандартов надлежащей клинической практики (GCP), ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» № 323-ФЗ от 21 ноября 2011 г. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Наталья Анатольевна Ломова
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; natasha-lomova@yandex.ru

Статья получена: 14.04.2022 **Статья принята к печати:** 28.04.2022 **Опубликована онлайн:** 17.05.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.025

ALTERED AMINO ACID PROFILES OF THE “MOTHER–FETUS” SYSTEM IN COVID-19

Lomova NA [✉], Chagovets VV, Dolgopolova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, Frankevich VE

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Systemic nature of the human body response to SARS-CoV-2 requires dedicated analysis at the molecular level. COVID-19 during pregnancy affects maternal health and may entail complications in the early neonatal period and possibly long-term consequences for the offspring. The aim of the study was to assess the impact of COVID-19 on amino acid profiles in maternal venous blood, amniotic fluid and umbilical cord blood in order to develop a diagnostic panel accounting for possible consequences. The main group included 29 pregnant patients with a confirmed diagnosis of COVID-19 and the control group included 17 somatically healthy pregnant women. Amino acid profiles of the biological fluids were measured by high-performance liquid chromatography combined to mass spectrometry (HPLC-MS) and assessed in logistic regression models. The analysis revealed altered content of certain amino acids, their biosynthetic precursors and metabolites in the biological fluids collected from patients with COVID-19 possibly reflecting the development of systemic inflammatory reaction and associated changes in gene expression profiles. These findings may guide further research into health outcomes for neonates born from mothers infected with SARS-CoV-2 during pregnancy. The study may help to develop advanced recommendations and differential care protocols for pregnant women and newborns diagnosed with COVID-19.

Keywords: COVID-19, amino acids, mass spectrometry, blood plasma, umbilical cord blood, venous blood, amniotic fluid, clinical neonatal markers, metabolic pathways

Funding: the study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, grant reg. number 2004-60093.

Author contribution: Lomova NA — clinical data management, manuscript writing; Chagovets VV — mass spectrometry assay, statistical analysis of the data, manuscript editing; Dolgopolova EL — collection and processing of clinical samples in “red zone”, statistical analysis of the data; Novoselova AV — mass spectrometry assay, processing of spectral data; Petrova UL — collection and processing of clinical samples in “red zone”; Shmakov RG — clinical sample collection and data management, manuscript editing; Frankevich VE — concept, data management, writing and editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review Board at the V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 13 of 10 December 2020) and carried out in compliance with Declaration of Helsinki, the International Conference on Harmonization (ICH) Good Clinical Practice (GCP) Guideline, and Federal Law № 323-FZ “On Basics of Health Protection of Citizens in the Russian Federation” of 21 November 2011. Informed consent for the study was provided by all participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia A. Lomova
Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; natasha-lomova@yandex.ru

Received: 14.04.2022 **Accepted:** 28.04.2022 **Published online:** 17.05.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.025

За последние 50 лет свыше 300 раз возникали вспышки новых или давно забытых инфекций, в том числе три коронавирусные инфекции в 2002, 2012 и 2019 г. Их появление обусловлено непосредственным контактом старого и нового биологических хозяев вируса и отсутствием соблюдения санитарно-гигиенических требований, что характерно для азиатских рынков. Коронавирусы составляют обширное семейство из 40 вирусов, семь из которых вызывают заболевания у человека. Некоторые коронавирусы, обычно заражающие животных, постепенно эволюционировали и оказались способными заражать людей. COVID-19, вероятно, является одним из таких вирусов, инфицирование которым предположительно впервые произошло на крупном оптовом рынке животных и морепродуктов в Ухане. Вспышка тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом (SARS-CoV-2), началась в 2019 г. в Китае и быстро привела к всемирной пандемии, поставившей системы здравоохранения перед необходимостью оказания интенсивной терапии огромному количеству пациентов.

По данным исследований, в случае заражения беременные подвержены более высокому риску развития тяжелых форм COVID-19 по сравнению с другими женщинами аналогичного возраста [1]. Кроме того, заболевание COVID-19 во время беременности ассоциируется с повышенным риском преждевременных родов [1, 2]. Особенно высокому риску развития серьезных осложнений в случае заражения COVID-19 подвержены беременные женщины старшего возраста, страдающие избыточным весом или сопутствующими патологическими состояниями и заболеваниями, такими как гипертензия или диабет [3].

Встречаются сообщения о единичных случаях вертикальной передачи вируса, а также о тяжелых заболеваниях в антенатальном периоде у беременных; все они требуют дальнейшего изучения [4–7]. На сегодняшний день, по данным ВОЗ, случаев обнаружения COVID-19 в пробах околоплодной жидкости или грудного молока не отмечено. Способность активного вируса передаваться от матери плоду или новорожденному во время беременности и родов пока не установлена. Очевиден факт того, что новорожденные дети от матерей, инфицированных COVID-19, могут иметь высокий риск осложнений в раннем неонатальном периоде и отдаленные последствия для здоровья.

На сегодняшний день наиболее перспективным направлением диагностики и отдаленного прогноза заболевания выступают омиксные исследования и, в частности, изучение метаболома. Они позволяют выделить маркеры, имеющие потенциально важное значение для подтверждения инфекции, определения тяжести заболевания и возможного исхода при SARS-CoV-2. В 2020 г. удалось установить корреляцию 204 метаболитов в плазме крови пациентов с COVID-19 с тяжестью заболевания [8]. Аминокислоты являются составной частью метаболома и участвуют во всех процессах жизнедеятельности человека. При нарушении содержания тех или иных аминокислот организм не может эффективно функционировать и развиваться. Именно поэтому существуют оптимальные уровни аминокислот в организме, которые обеспечивают сбалансированные обменные процессы. Так, было показано, что концентрации аминокислот изменяются при сердечно-сосудистой патологии [9], пневмонии, вызванной вирусом гриппа H1N1 [10], хронической обструктивной болезни легких [11]. Ряд

патологий в неонатологии, таких как болезни накопления и другие, выявляют путем анализа аминокислот в сухой капле крови [12]. Связанные с заболеваниями изменения метаболических профилей физиологических жидкостей человеческого организма исследуют для выяснения патофизиологии целого ряда заболеваний. Например, метаболомный анализ показал, что изменение метаболизма аминокислот коррелирует с изменением гомеостаза кислорода у пациентов с COVID-19 [13]. Еще в одном исследовании аминокислотных профилей у взрослых и детей с COVID-19 выявлены изменения, которые могут быть связаны с эндотелиальной дисфункцией и нарушением регуляции Т-лимфоцитов [14, 15].

В нашем опубликованном ранее исследовании был проведен поиск прогностических маркеров COVID-19 в амниотической жидкости и пуповинной крови [16]. Целью настоящего исследования было проанализировать аминокислотный состав венозной, пуповинной крови и амниотической жидкости, отображающих систему мать–плод, и описать метаболические пути, их возможное клиническое значение и последующие потенциальные отдаленные результаты.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова») на базе первого инфекционного отделения в период с марта по май 2020 г. была создана «красная зона», где проходили лечение и обследование пациенты с диагнозом COVID-19, в том числе беременные женщины.

В данное исследование были включены 46 беременных, которые поступили и были рожены в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова». Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную — 17 соматически здоровых женщин с беременностью без осложнений. Диагноз COVID-19 был подтвержден с помощью ПЦР-теста («ДНК-Технология»; Россия). Включение в группу происходило по мере обращения. Критерии включения в I группу: наличие COVID-19, установленной по данным молекулярно-генетического обследования (ПЦР). Критерии включения во II группу: отсутствие COVID-19 по данным клинического обследования, результатам ПЦР-исследования. Критерии исключения: многоплодная беременность, резус- и ABO-изоиммунизации, хромосомные аномалии, генетические мутации и врожденные пороки развития у плода.

Для анализа были собраны венозная плазма беременных, пуповинная плазма их новорожденных детей и амниотическая жидкость. Транспортировку и последующий анализ осуществляли на территории ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» в помещениях, сертифицированных для работы с образцами II степени опасности. В работе использовали стандартный набор и модифицированный протокол компании-производителя (JASEM; Турция) для приготовления и последующего анализа 31 аминокислоты в физиологических жидкостях. Анализ образцов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1260 Infinity II (Agilent; США) с детектированием на масс-спектрометре (MC) 6460 Triple Quad (Agilent; США). Транзитные переходы между родительскими ионами и дочерними фрагментами для анализируемых аминокислот, соответствующее им хроматографическое время удерживания, концентрации

Таблица 1. Клиническая характеристика беременных женщин, заболевших COVID-19

Клиническая характеристика	COVID-19, n = 29 (%)
Наличие симптомов	21 (71,41)
Повышенная температура (> 37 °C)	12 (41,38)
Потеря обоняния	7 (24,14)
Боль в горле	3 (10,34)
Одышка	4 (13,79)
Кашель	12 (41,38)
Утомляемость	4 (13,79)
Легкая степень тяжести	22 (75,86)
Средняя степень тяжести	6 (20,69)
Тяжелая степень тяжести	1 (3,45)

внутренних стандартов, а также сведения о чувствительности и воспроизводимости анализа приведены в руководстве JASEM.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью скриптов, написанных на языке R (R Core Team; Австрия) в RStudio (R. RStudio, Inc.; США). Нормальность распределения количественных данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для описания данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое и стандартное отклонение. При распределении, отличающемся от нормального, данные представляли медианой (Me) и квантилями Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3). Статистический анализ проводился с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента для нормально распределенных данных и непараметрического критерия Манна–Уитни, если распределение было отличным от нормального. Величину порогового уровня значимости *p*-value принимали равной 0,05. Если значение *p* было меньше 0,001, то *p*-value указывали в формате *p*-value < 0,001. Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании аминокислотного профиля были разработаны модели логистической регрессии. В качестве независимых переменных в моделях рассматривали все возможные комбинации аминокислот. В качестве зависимой переменной выступала принадлежность пациентки к одной из исследуемых групп. Из всех разработанных моделей выбрали четыре с наибольшей величиной площади под ROC-кривой (AUC). Для каждой модели были определены критерий Уальда, 95% доверительный интервал (ДИ), отношение шансов (ОШ) и его доверительный интервал. Качество разработанных моделей оценивали с помощью

ROC-анализа, а также расчета чувствительности и специфичности. В работе использовали возможности ресурса Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) с подключенной библиотекой путей и соединений KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Статистическую значимость метаболического пути определяли исходя из гипергеометрического теста с коррекцией по Бенджамини–Хохбергу. Влияние метаболического пути определяли оценкой вклада маркера в путь, исходя из топологического анализа и меры относительного посредничества. К путям, связанным с развитием заболевания статистически значимо, относили пути с вероятностью ложного открытия (false discovery rate, FDR) меньше 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 46 женщин, из которых 29 пациенток находились в стационаре с подтвержденным диагнозом COVID-19, и 17 условно здоровых женщин, не болевших данной вирусной инфекцией (группа контроля). Клинические характеристики беременных женщин, заболевших COVID-19, представлены в табл. 1, а беременных женщин, включенных в исследование, — в табл. 2.

Случаев COVID-19 у новорожденных зарегистрировано не было. Все новорожденные были протестированы на SARS-CoV-2 сразу после рождения, а также на третий и 10-й дни после рождения. Полученные отрицательные результаты анализов всех новорожденных могут свидетельствовать об отсутствии вертикальной передачи инфекции. Случаев перинатальной смерти не зарегистрировано.

На лабораторном этапе работы был применен метод целевой метаболомики с использованием набора для количественного определения 31 аминокислоты методом

Таблица 2. Клиническая характеристика беременных женщин, включенных в исследование

Параметр	COVID-19, n = 29	Контроль, n = 17	<i>p</i> -value
Возраст	29,9 (± 5,03)	32,0 (± 5,03)	0,16
Рост	166,62 (± 7,37)	165,76 (± 7,34)	0,71
Вес	77,64 (± 11,58)	71,87 (± 9,75)	0,10
ИМТ	27,85 (± 4,52)	26,12 (± 3,16)	0,18
Срок родоразрешения	38 (± 1,52)	39,42 (± 1,14)	0,001
Масса новорожденного	3332 (± 484)	3585 (± 424)	0,08
Рост новорожденного	52,4 (± 2,66)	53,1 (± 2,29)	0,35
Апгар 1-я минута	8 (8; 8)	9 (9; 9)	0,69
Апгар 5-я минута	8 (8; 8)	9 (9; 9)	0,83

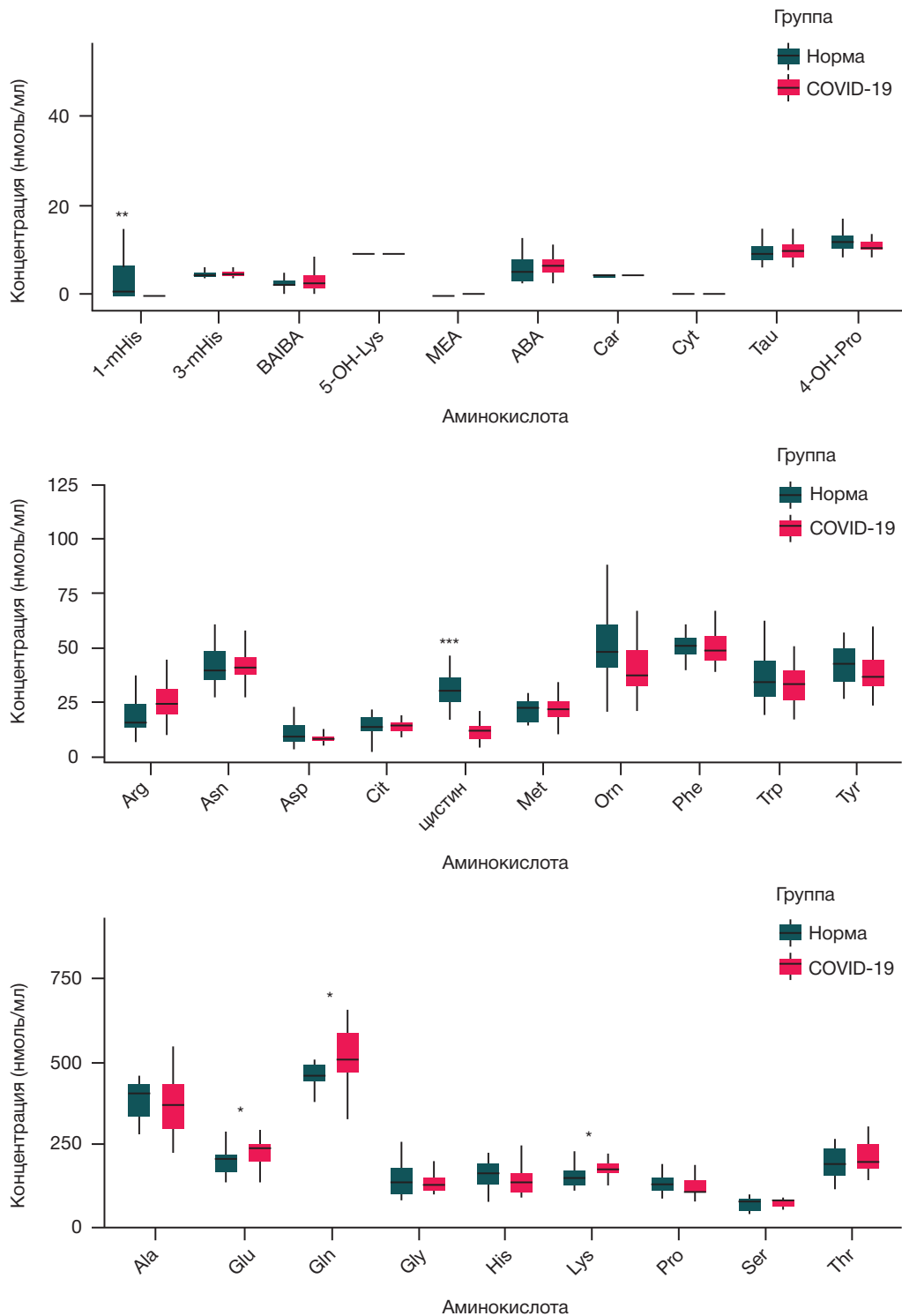


Рис. 1. Диаграмма размаха концентрации аминокислот в венозной плазме в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — p -value $\leq 0,05$; ** — p -value $\leq 0,01$; *** — p -value $\leq 0,001$. 1-mHis — 1-метил-L-гистидин; 3-mHis — 3-метил-L-гистидин; bAla — β -аланин; BAIBA — 3-аминоизомаляновая кислота; 5-OH-Lys — DL-5-гидроксилизин; MEA — этаноламин; ABA — L-2-аминомасляная кислота; AAD — L-2-аминоадипиновая кислота; Ala — L-аланин; Arg — L-аргинин; Asn — L-аспарагин; Asp — L-аспарагиновая кислота; Car — L-карнозин; Cit — L-цитруллин; Cyt — L-цистатинин; цистин — L-цистин; Glu — L-глутаминовая кислота; Gln — L-глутамин; Gly — L-глицин; His — L-гистидин; Lys — L-лизин; Met — L-метионин; Orn — Лорнитин; Phe — L-фенилаланин; Pro — L-пролин; Ser — L-серин; Thr — L-треонин; Trp — L-триптофан; Tyr — L-тирозин; Val — L-валин; Tau — таурин; 4-OH-Pro — транс-4-гидрокси L-пролин

ВЭЖХ-МС в образцах венозной плазмы беременных, амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови новорожденных детей, собранных в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова».

На первом этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля венозной плазмы беременных

в двух группах. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить пять аминокислот, концентрации которых статистически значимо отличались при COVID-19 (табл. П1, рис. 1): 1-метилгистидин, лизин, цистин, глутаминовая кислота и глутамин.

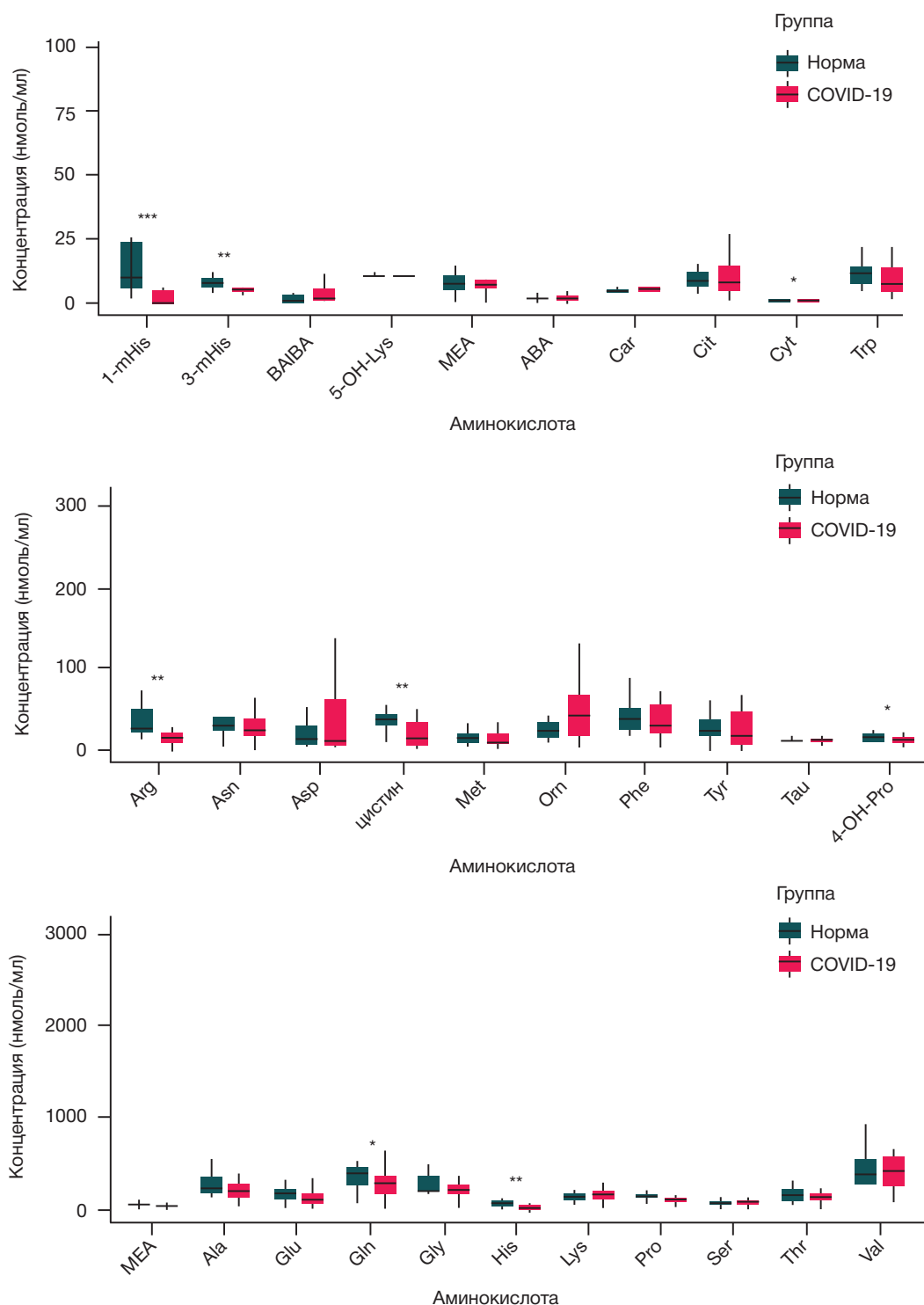


Рис. 2. Диаграмма размаха концентрации аминокислот в амниотической жидкости в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — p -value $\leq 0,05$; ** — p -value $\leq 0,01$; *** — p -value $\leq 0,001$. 1-mHis — 1-метилгистидин; 3-mHis — 3-метилгистидин; BAIBA — 3-аминоизомаасляная кислота; 5-OH-Lys — 5-гидроксилизин; MEA — этаноламин; ABA — 2-аминомасляная кислота; AAD — 2-аминоадипиновая кислота; Car — карнозин; Cit — цитруллин; Cyt — цистатионин; 4-OH-Pro — *транс*-4-гидроксипролин

В связи с полученными результатами ВЭЖХ-МС-анализа было интересно разработать математическую модель, позволяющую различить образцы венозной плазмы пациентов группы COVID-19 и группы контроля. Для этого были построены модели логистической регрессии на базе концентраций аминокислот. Для построения моделей использовали все возможные комбинации аминокислот. Для каждой из моделей выполнили ROC-анализ и выбрали четыре модели,

характеризующиеся наибольшей площадью под ROC-кривой (AUC) (рис. П1, табл. П2).

Наибольшее значение AUC (0,78) было у модели, построенной на базе метилгистидина и цистина (табл. П3). Эта модель характеризуется чувствительностью 0,93 и специфичностью 0,94.

При анализе амниотической жидкости была определена концентрация 31 аминокислоты. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить

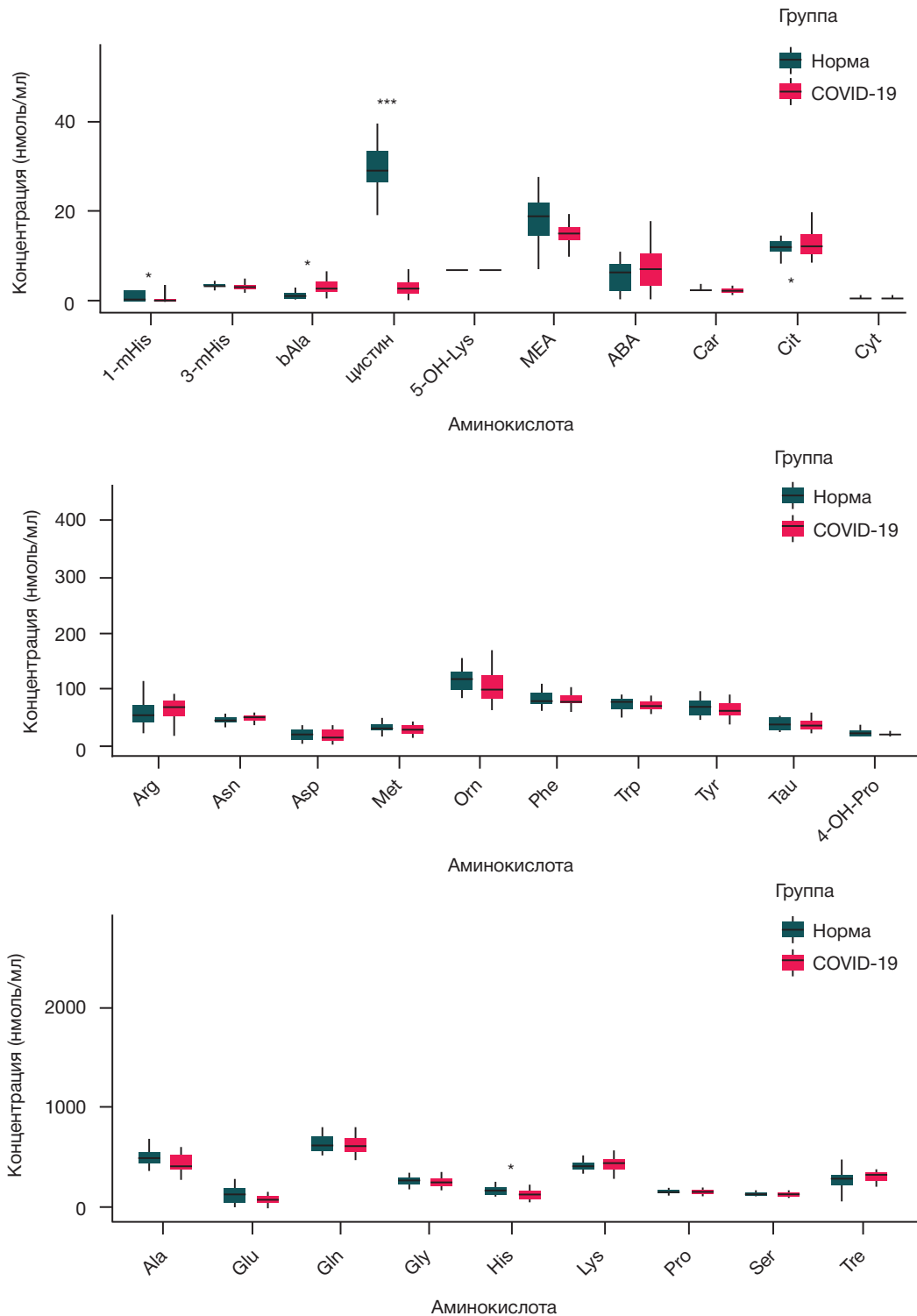


Рис. 3. Диаграмма размаха концентрации аминокислот в пуповинной плазме в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния; * — p -value $\leq 0,05$; ** — p -value $\leq 0,01$; *** — p -value $\leq 0,001$. 1-mHis — 1-метилгистидин; 3-mHis — 3-метилгистидин; β -Ala; BAIBA — 3-аминоизомасляная кислота; 5-OH-Lys — 5-гидроксиллизин; MEA — этаноламин; ABA — 2-аминомасляная кислота; AAD — 2-аминоадипиновая кислота; Car — карнозин; Cit — цитруллин; Cyt — цистатионин; 4-OH-Pro — *транс*-4-гидроксипролин

восемь аминокислот, концентрации которых статистически значимо различались при COVID-19 (рис. 2, табл. П4): 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатионин, цистин, глутамин, гистидин, *транс*-4-гидроксипролин.

Результаты построения моделей логистической регрессии, позволяющих отличить амниотическую жидкость пациентов группы COVID-19 от таковой у группы контроля, представлены на рис. П2 и в табл. П5, П6.

Построение моделей для амниотической жидкости было аналогичным построению моделей для венозной плазмы. Наибольшее значение AUC (0,89) получено для модели, построенной на базе аргинина, цистина, гистидина и *транс*-4-гидроксипролина (табл. П6). Эта модель характеризуется чувствительностью 0,84 и специфичностью 0,93. Несколько более высокие значения чувствительности и специфичности (0,84 и 1 соответственно) были у модели,

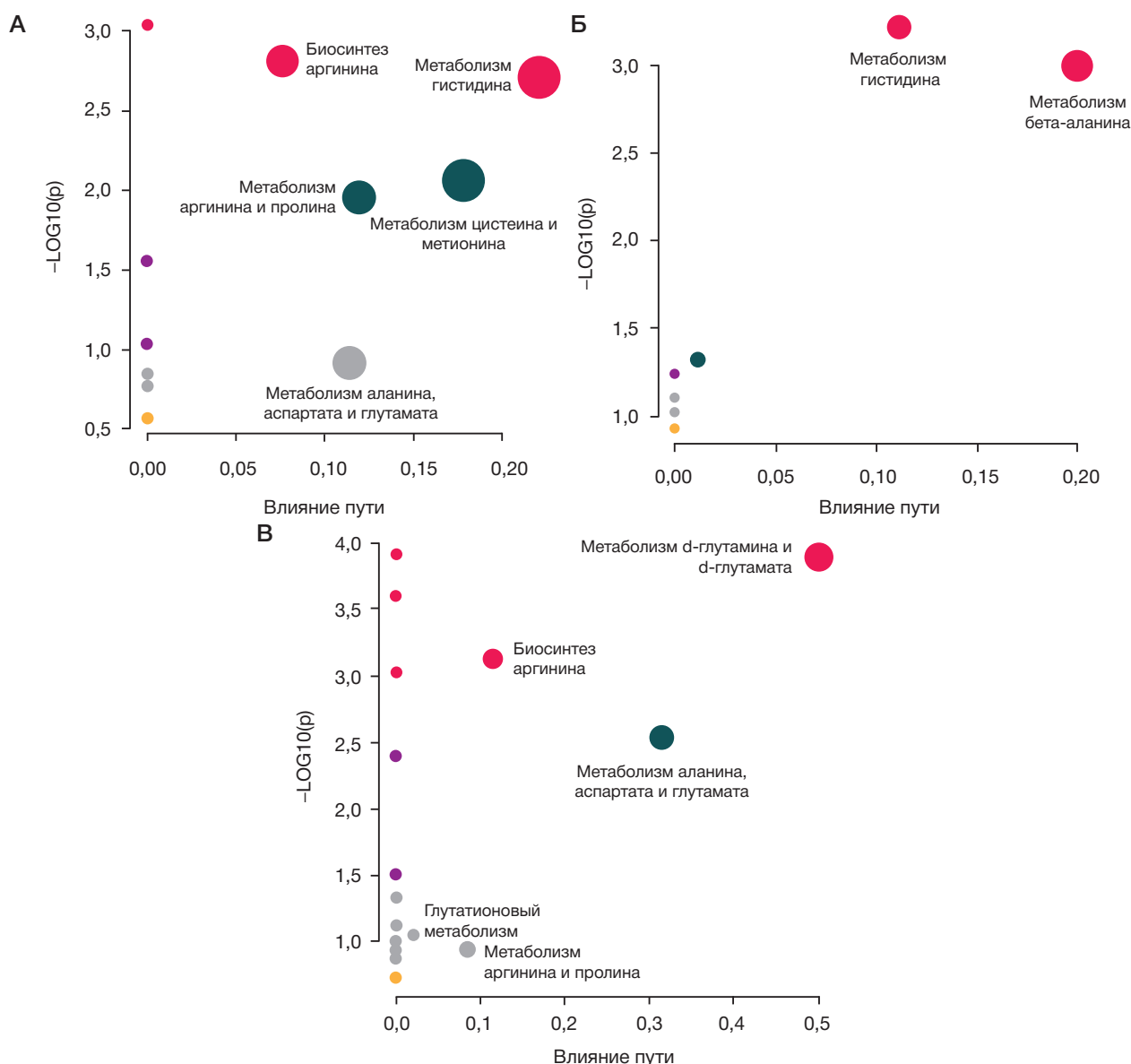


Рис. 4. Карта задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в исследованных образцах: амниотической жидкости (А); плазме пуповинной крови (Б); плазме венозной крови (В)

построенной на базе 1-метилгистидина, цистина, транс-4-гидроксипролина (табл. П6).

На следующем этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля пуповинной плазмы в двух группах. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить четыре аминокислоты, концентрации которых статистически значимо различались при COVID-19 (рис. 3, табл. П7): 1-метилгистидин, бета-аланин, цистин, гистидин.

Для пуповинной плазмы были также построены модели логистической регрессии аналогично описанным ранее (рис. П3 и в табл. П8, П9). Во все построенные модели вошел цистин — очевидно, как аминокислота, содержание которой наиболее различалось между группами. Для всех моделей $AUC = 1$, чувствительность и специфичность равны 1 (табл. П9).

Особый интерес представляло сравнение аминокислот в амниотической жидкости, венозной и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. В трех точках (амниотическая жидкость, венозная и пуповинная плазма), комплексно отображающих метаболом системы мать– плод,

статистически значимо различались при COVID-19 концентрации двух аминокислот: 1-метилгистидина и цистеина. В двух точках (пуповинная и венозная плазма) статистически значимо отличалась одна аминокислота — глутамин (табл. П10).

Принимая во внимание выявление ряда повторяющихся аминокислот в трех биологических средах, отображающих комплекс мать–плод, подтвержденное статистически, для углубленного понимания данных результатов был осуществлен математический анализ включения данных аминокислот в метаболические пути и их возможное клиническое значение для беременной, плода и последующих потенциальных отдаленных результатов.

В работе использовали возможности ресурса MetabolAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) с подключенной библиотекой путей и соединений KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Аминокислоты, концентрации которых в амниотической жидкости статистически значимо различаются у пациенток с COVID-19 и без, не приводили к статистически значимой задействованности какого-либо метаболического пути (рис. 4А, табл. П11). Аминокислоты с различающимися

концентрациями в плазме пуповинной крови у пациенток с COVID-19 и без оказывают значимое влияние на метаболизм гистидина и β -аланина (рис. 4Б, табл. П12). Аминокислоты, концентрации которых различаются в плазме венозной крови, могут оказывать влияние на метаболизм *d*-глутамина и *d*-глутамата, биосинтез аргинина и метаболизм аланина, аспарата и глутамата (рис. 4В, табл. П13).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о статистически значимом различии концентраций восьми аминокислот в амниотической жидкости, пяти в венозной плазме и четырех в пуповинной плазме между пациентами с COVID-19 и в группе контроля. Стоит отметить, что концентрации восьми аминокислот были снижены у пациентов с COVID-19. Схожие изменения концентраций аминокислот были обнаружены при исследовании плазмы крови взрослых и детей с COVID-19 [14]. Авторы этой работы искали подтверждение своей гипотезе о возможном снижении концентрации аргинина при COVID-19. Известно, что эндотелиальная дисфункция играет роль в развитии повреждения легких при COVID-19 как у взрослых, так и у детей [17, 18], а низкая биодоступность аргинина связана с развитием эндотелиальной дисфункции и дисрегуляции Т-клеток [19, 20] и вносит вклад в патофизиологию множества заболеваний [21]. Действительно, у больных COVID-19 было обнаружено изменение концентрации аргинина. Кроме того, были значимо изменены и концентрации цитруллина, глутамина, аланина, глицина, гистидина, пролина и нескольких других аминокислот, однако авторы статьи затрудняются объяснить механизмы такого эффекта [14]. Снижение концентрации аминокислот было выявлено и при некоторых других патологиях [9, 11, 12, 14, 22, 23]. В нашей работе по данным анализа задействованности метаболических путей маркеров аминокислот в венозной плазме крови матерей с COVID-19 обнаружены статистически значимое изменение биосинтеза аргинина, значимое изменение путей метаболизма *d*-глутамина и *d*-глутамата и метаболизма аланина, аспарата и глутамата. Полузаменимая или условно незаменимая для человека аминокислота аргинин является одной из наиболее метаболически универсальных аминокислот и служит предшественником для синтеза мочевины, оксида азота, полиаминов, пролина, глутамата, креатина и агматина. Аргинин метаболизируется через сложный и строго регулируемый набор путей, которые остаются не до конца изученными как на уровне всего организма, так и на клеточном. Снижение концентрации аргинина в результате изменений активности аргиназы может избирательно изменять экспрессию определенных генов [24]. Нарушение экспрессии, ассоциированное с нарушением уровня аргинина в культивируемых клетках, известно уже более 40 лет [25].

На сегодняшний день установлено влияние аргинина на процессы регуляции и инициации экспрессии и транскрипции [26–29].

Особый интерес в нашем исследовании представляло сравнение аминокислот в амниотической жидкости, венозной и пуповинной плазме (трех средах), которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. Значимо различались концентрации двух аминокислот: 1-метилгистидина и цистина. Одной из двух аминокислот, для которых были выявлены

различия сразу в трех средах, и обладающей высокой дифференцирующей значимостью, был L-цистин. Это некодируемая аминокислота, представляющая собой продукт окислительной димеризации цистеина. В ходе посттрансляционной модификации белков она играет крайне важную роль в формировании и поддержании третичной структуры белков и пептидов и, соответственно, их биологической активности. Например, такие гормоны, как вазопрессин, окситоцин, инсулин и соматостатин приобретают биологическую активность после образования внутримолекулярных дисульфидных мостиков.

Статистически значимая разница концентрации в амниотической жидкости и плазме венозной крови матери и пуповинной крови новорожденных от матерей с COVID-19 была выявлена для L-гистидина и его производного 1-метилгистидина.

Особый интерес представляет тот факт, что в результате нашего исследования анализ задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в плазме пуповинной крови новорожденных от матерей с COVID-19 также продемонстрировал статистически значимое изменение путей метаболизма гистидина и дополнительно β -аланина.

Встречающаяся в природе β -аминокислота β -аланин образуется путем деградации дигидроурацила и карнозина. Карнозин β -аланин и родственные дипептиды предотвращают перекисное окисление в мембранных системах, что позволяет считать их водорастворимым компонентом защитной системы клетки от окислительного повреждения наравне с жирорастворимыми мембраносвязанными антиоксидантами. Установлена их роль в деактивации активных форм кислорода и ненасыщенных альдегидов в реакциях пероксидации жирных кислот, входящих в состав мембран [30]. Пролиферативное действие данных аминокислот реализуется, скорее всего, только в мышечной и нервной тканях, состоящих из неделящихся клеток, и для них характерен самый сильный окислительный метаболизм. Можно предположить, что в добавление к известным активностям по отношению к мышечной ткани данные аминокислоты могут способствовать регенеративному ответу и стимулируют пролиферацию нормальных (неопухолевых) клеток человека.

Статистически значимая возможность влияния аминокислот с различающимися между исследуемыми группами концентрациями на метаболизм гистидина может демонстрировать связь между путем превращения гистидина с его декарбоксилированием и образованием гистамина и COVID-19 во время беременности.

Одна из 20 протеиногенных аминокислот, гетероциклическая α -аминокислота L-гистидин является одной из двух условно незаменимых аминокислот (наряду с аргинином). Первоначально считалось, что она незаменима только для детей. Остаток гистидина входит в состав активных центров множества ферментов. Гистидин является предшественником в биосинтезе гистамина. Гистамин играет важную роль в процессе воспаления и развития некоторых аллергических реакций. Гистидин способствует росту и восстановлению тканей, участвует в синтезе эритроцитов и лейкоцитов и в формировании миелиновых оболочек нервных клеток. Нехватка гистидина может ослабить слух, вызвать дегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона и Альцгеймера.

Наши результаты показали, что вирус может вызывать выраженные изменения в метаболизме амниотической

жидкости и плазме пуповинной и венозной крови, что чревато риском нарушения программирования производства белковых молекул на всех уровнях системы мать–плод. При этом COVID-19 может никак не проявлять себя при рождении. Изменения метаболических процессов путем нарушения необходимого соотношения аминокислот на территории плода могут быть связаны с репликацией вируса, воспалительной реакцией хозяина и изменениями энергетического метаболизма, нарушением регуляции экспрессии и транскрипции белковых молекул. Оценка отдаленных последствий внутриутробного опосредованного воздействия COVID-19 на ребенка является важной задачей и приоритетным направлением последующих научных исследований.

ВЫВОДЫ

В данном исследовании мы использовали методы целевой метаболомики для обнаружения изменений концентрации аминокислот беременных, инфицированных COVID-19 в момент госпитализации. Обнаружено, что концентрации восьми аминокислот в амниотической жидкости (1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатионин, цистин, глутамин, гистидин, транс-4-гидроксипролин), пяти аминокислот в венозной плазме матерей (1-метилгистидин, лизин, цистин, глутаминадид и глутамин) и четырех аминокислот в пуповинной плазме (1-метилгистидин, β-аланин, цистин, гистидин) статистически значимо

различаются между группой пациентов, инфицированных COVID-19, и контрольной группой. Нарушение метаболизма выявленных аминокислот проявляется при ряде серьезных патологий, таких как острый респираторный дистресс-синдром у пациентов с тяжелым сепсисом, пневмония при гриппе H1N1, бактериальная пневмония, серповидноклеточная анемия, талассемия, малярия, острая астма, муковисцидоз, легочная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, некоторые виды рака и др. По данным анализа задействованности метаболических путей маркеров-аминокислот в венозной и пуповинной плазме крови матерей и новорожденных в группе с COVID-19 обнаружено статистически значимое изменение биосинтеза и путей метаболизма ряда аминокислот, задействованных в реализации воспалительной реакции, изменений энергетического метаболизма, нарушений регуляции экспрессии и транскрипции белковых молекул и пр. Эти результаты могут быть использованы для дальнейших исследований возможных последствий для здоровья новорожденных COVID-19 у их матерей и определения требований к лечению и медицинской помощи беременным женщинам и новорожденным после постановки диагноза COVID-19, так как отдаленные последствия для здоровья данной когорты новорожденных могут включать в себя эндокринные, нервные и аллергические расстройства, обусловленные метаболомными нарушениями программирования производства белковых молекул в антенатальном периоде.

Литература

1. Chiu-Lin Wang, Yi-Yin liu, Chin-Hu Wu, Chun-Yu Wang, Chun-Hung Wang, Cheng-Yu Long. Impact of COVID-19 on Pregnancy. *International Journal of Medical Sciences*. 2021; 18 (3): 763–7. DOI: 10.7150/ijms.49923.
2. Schwartz DA, Graham AL. Potential Maternal and Infant Outcomes from (Wuhan) Coronavirus 2019-nCoV Infecting Pregnant Women: Lessons from SARS, MERS, and Other Human Coronavirus Infections. *Viruses*. 2020; 12 (4): 194.
3. Zaigham M, Andersson O. Maternal and perinatal outcomes with COVID-19: A systematic review of 108 pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020; 99 (7): 823–9.
4. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
5. Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingin K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI:10.3390/v13030447.
6. Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–5.
7. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467020-17436-6.
8. Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59–72.
9. McGarrah RW, Crown SB, Zhang G, Shah SH, M.H.S., Newgard CB. Cardiovascular Metabolomics. *Circ Res*. 2018; 122 (9): 1238–58. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311002.
10. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15.
11. Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
12. Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
13. Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
14. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
15. Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
16. Lomova NA, Chagovets VV, Dolgoplova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, et al. Changes in amino acid profile of cord blood plasma and amniotic fluid of mothers with COVID-19. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2021; (3): 12–22. DOI: 10.24075/BRSMU.2021.032
17. Diorio C, McNerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
18. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
19. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicines*.

- 2020; 8 (8): 277.
20. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
 21. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M, Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc., 2017; 30S–47S.
 22. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17.
 23. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2013; 17 (1): 1–8.
 24. Morris SM Jr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83: 508S–12S.
 25. Schimke RT. Repression of enzymes of arginine biosynthesis in mammalian tissue culture. *Biochim Biophys Acta*. 1962; 62: 599–601.
 26. Jackson MJ, Allen SJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Metabolite regulation of argininosuccinate synthetase in cultured human cells. *J Biol Chem*. 1988; 263: 16388–94.
 27. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4843–8.
 28. Taheri F, Ochoa JB, Faghiri Z, Culotta K, Park HJ, Lan MS, et al. L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 958s–65s.
 29. Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, Yaman I, et al. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50000–9.
 30. Cheng J, Wang F, Yu DF, Wu PF, Chen JG. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650, 184–94.
- References**
1. Chiu-Lin Wang, Yi-Yin Iiu, Chin-Hu Wu, Chun-Yu Wang, Chun-Hung Wang, Cheng-Yu Long. Impact of COVID-19 on Pregnancy. *International Journal of Medical Sciences*. 2021; 18 (3): 763–7. DOI: 10.7150/ijms.49923.
 2. Schwartz DA, Graham AL. Potential Maternal and Infant Outcomes from (Wuhan) Coronavirus 2019-nCoV Infecting Pregnant Women: Lessons from SARS, MERS, and Other Human Coronavirus Infections. *Viruses*. 2020; 12 (4): 194.
 3. Zaigham M, Andersson O. Maternal and perinatal outcomes with COVID-19: A systematic review of 108 pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2020; 99 (7): 823–9.
 4. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
 5. Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingina K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI:10.3390/v13030447.
 6. Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–5.
 7. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467020-17436-6.
 8. Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59–72.
 9. McGarrah RW, Crown SB, Zhang G, Shah SH, M.H.S., Newgard CB. Cardiovascular Metabolomics. *Circ Res*. 2018; 122 (9): 1238–58. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311002.
 10. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15.
 11. Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
 12. Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
 13. Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
 14. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
 15. Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
 16. Lomova NA, Chagovets VV, Dolgoplova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, et al. Changes in amino acid profile of cord blood plasma and amniotic fluid of mothers with COVID-19. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2021; (3): 12–22. DOI: 10.24075/BRSMU.2021.032
 17. Diorio C, McNeerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
 18. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
 19. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicines*. 2020; 8 (8): 277.
 20. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
 21. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M, Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc., 2017; 30S–47S.
 22. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17.
 23. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2013; 17 (1): 1–8.
 24. Morris SM Jr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83: 508S–12S.
 25. Schimke RT. Repression of enzymes of arginine biosynthesis in mammalian tissue culture. *Biochim Biophys Acta*. 1962; 62: 599–601.
 26. Jackson MJ, Allen SJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Metabolite regulation of argininosuccinate synthetase in cultured human cells. *J Biol Chem*. 1988; 263: 16388–94.
 27. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4843–8.
 28. Taheri F, Ochoa JB, Faghiri Z, Culotta K, Park HJ, Lan MS, et al. L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 958s–65s.

29. Fernandez J, Lopez AB, Wang C, Mishra R, Zhou L, Yaman I, et al. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, cat-1, by physiological stress. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50000–9.
30. Cheng J, Wang F, Yu DF, Wu PF, Chen JG. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650, 184–94.