

*На правах рукописи*



**ВЛАСОВ ИВАН НИКОЛАЕВИЧ**

**ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ МОНОНУКЛЕАРНЫХ  
ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С  
ЛЕТАЛЬНЫМИ И НЕЛЕТАЛЬНЫМИ ИСХОДАМИ COVID-19 ПРИ  
ИНФИЦИРОВАНИИ 20В И ДЕЛЬТА ВАРИАНТАМИ SARS-COV-2**

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней отдела генетических основ патологических процессов Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт».

**Научный руководитель:** **Сломинский Петр Андреевич**  
доктор биологических наук, профессор, начальник лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней отдела генетических основ патологических процессов Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва.

**Официальные оппоненты:** **Брага Элеонора Александровна**  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», г. Москва;

**Федорова Ирина Михайловна**  
кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии Федерального государственного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Москва.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Архангельск.

Защита диссертации состоится 28 мая 2026 года, начало в 14:00, на заседании диссертационного совета 02.1.003.06 на базе НИЦ «Курчатовский институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский институт» и на сайте [www.nrcki.ru](http://www.nrcki.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 02.1.003.06,  
кандидат биологических наук



А.С. Жирник

# 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность темы исследования

COVID-19 — это инфекционное заболевание, вызываемое заражением коронавирусом SARS-CoV-2. В декабре 2019 года в Ухане, провинции Hubei, Китай произошло несколько случаев заболевания ранее неизвестной респираторной инфекцией. Инфекция быстро распространилась сначала по всей провинции, а затем и по всей стране. Вирусом, вызывающим эту инфекцию, оказался новый коронавирус, имеющий последовательность, на 79.6 % совпадающую с выявленным ранее вирусом атипичной пневмонии, также известным как **Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV)**. За 6 лет в мире произошло более 700 миллионов подтвержденных случаев заражения SARS-CoV-2, при этом более 7 миллионов случаев закончились гибелью зараженных пациентов.

За время пандемии COVID-19 вирус претерпел значительное число мутаций, приведших к возникновению множества функционально различных вариантов вируса. Многие из возникших вариантов были более трансмиссивны, более вирулентны и более способны к избеганию ответа иммунной системы, чем оригинальный вариант «Ухань». Кроме того, многие вновь возникшие варианты также проявляли устойчивость к нейтрализации антителами к ранним вариантам и распространенным вакцинам, в связи с чем возникновение новых вариантов сопровождалось новыми волнами заболевания.

Одним из современных, широко используемых методов исследования является масштабное параллельное транскриптомное секвенирование, позволяющее идентифицировать изменения в экспрессии генов между различными биологическими состояниями. Выявление дифференциально экспрессирующихся генов в тканях пациентов, заболевание у которых привело к различным исходам, позволяет пролить свет на факторы, определяющие течение заболевания. Помимо этого, дифференциально экспрессирующиеся гены также представляют собой потенциальные мишени для терапевтического вмешательства.

В связи с этим **целью** настоящей работы было изучение изменения экспрессии генов на уровне транскриптома в тканях пациентов с летальными и нелетальными исходами COVID-19, вызванного двумя различными вариантами вируса SARS-CoV-2 – вариантами 20B и Дельта. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

### **Задачи исследования**

1. Провести сравнение профилей экспрессии генов в периферической крови пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии с летальными и нелетальными исходами COVID-19, вызванного заражением 20B вариантом SARS-CoV-2.
2. Провести сравнение профилей экспрессии генов в периферической крови между группами пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии с летальными и нелетальными исходами COVID-19, вызванного заражением Дельта вариантом SARS-CoV-2.
3. Исследовать роль дислипидемии в определении исхода заболевания на независимых выборках пациентов с COVID-19, вызванного заражением вариантами 20B и Дельта SARS-CoV-2.

### **Научная новизна работы**

В настоящей работе был проведен полнотранскриптомный анализ экспрессии в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови двух групп пациентов с COVID-19, и выявлены гены, дифференциально экспрессирующиеся между группами пациентов с летальными и нелетальными исходами. В группе пациентов с 20B вариантом SARS-CoV-2 была показана дифференциальная экспрессия генов, ассоциированных с процессами активации рецепторов липопротеинов низкой плотности и метаболизмом липидов. В группе пациентов с Дельта вариантом SARS-CoV-2 была показана дифференциальная экспрессия генов, ассоциированных с негативной регуляцией иммунного ответа, системой комплемента и негативной регуляцией вирусных процессов. Исследование на независимых выборках подтвердило значимую роль обмена липидов для определения исходов заболевания COVID-19, вызванного заражением 20B вариантом, но не Дельта вариантом SARS-CoV-2. На основании анализа обогащения терминами Gene Ontology Biological Processes были выявлены группы ключевых дифференциально экспрессирующихся генов – *PPARG*, *CD36*, *STAB1*, *ITGAV* и *ANXA2* в случае 20B варианта, и *ISG15*, *SERPING1*, *CIQA*, *CIQB*, и *VSIG4* в случае Дельта варианта.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Разработан биоинформатический подход, позволяющий выявить ключевые процессы, определяющие исход инфекции SARS-CoV-2.
2. Полнотранскриптомный анализ мононуклеарных лейкоцитов периферической крови между группами пациентов ОРИТ с летальными и нелетальными исходами COVID-19, вызванного заражением 20B вариантом SARS-CoV-2 показал значимость метаболизма липидов для определения исхода заболевания, вызванного этим вариантом SARS-CoV-2.
3. Полнотранскриптомный анализ мононуклеарных лейкоцитов периферической крови между группами пациентов ОРИТ с летальными и нелетальными исходами COVID-19, вызванного заражением Дельта вариантом SARS-CoV-2, подчеркнул важную роль баланса негативной и позитивной регуляции иммунной системы в определении исхода заболевания, вызванного этим вариантом SARS-CoV-2.
4. Различия между профилями экспрессии в случае двух различных вариантов SARS-CoV-2 подчеркнуло значимость исследований специфических вариантов вируса и продемонстрировало вариант-обусловленную природу процессов, влияющих на определение исхода заболевания в различных случаях.

## **Методология и методы исследования**

В ходе выполнения работы были использованы стандартные молекулярно-биологические и биоинформатические методы исследований. Было проведено секвенирование РНК, отбор дифференциально экспрессирующихся генов с дальнейшим анализом обогащения. Были построены и проанализированы сети генов и терминов, и на их основании были отобраны ключевые гены. Также было проведено исследование уровней липидов на независимых выборках пациентов с COVID-19.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Используемый в работе подход позволяет выявлять ключевые значимо изменённые биологические процессы при совместном применении разных алгоритмов выявления дифференциальной экспрессии.
2. У пациентов с тяжелой формой COVID-19, вызванной 20B вариантом вируса SARS-CoV-2, в определении исхода заболевания играют роль процессы, связанные с активностью рецепторов липопротеинов низкой плотности.
3. Увеличение экспрессии генов *PPARG*, *CD36*, *STAB1*, *ITGAV* и *ANXA2* характерно для больных с тяжелой формой COVID-19, вызванной 20B вариантом вируса SARS-CoV-2.
4. При летальном и нелетальном исходе заболевания COVID-19, вызванного Дельта вариантом вируса SARS-CoV-2, различаются механизмы, связанные с регуляцией активации системы комплемента и ряда иммунных процессов. Понижение экспрессии генов *ISG15*, *SERPING1*, *CIQA*, *CIQB*, и *VSIG4* имеет место при летальных исходах.
5. Метаболизм липопротеинов низкой плотности может играть роль в определении исхода тяжелых случаев заболевания COVID-19, вызванным 20B вариантом, но не Дельта вариантом SARS-CoV-2.

### **Личный вклад соискателя**

Основные результаты работы получены автором лично или при его непосредственном участии.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Работа выполнена в соответствии с общепринятыми этическими и научными принципами. Выводы и основные положения, выносимые на защиту, обоснованы фактическим материалом, полученным в результате проведения экспериментов с использованием надежных методов исследования, а также анализа и интерпретации данных.

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы представлены в 7 публикациях, в том числе в 3 статьях в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами данных Web of Science, Scopus, РИНЦ, и в 4 тезисах докладов научных мероприятий.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений» и «Список литературы», который включает 299 источников. Работа изложена на 174 страницах, содержит 15 рисунков, 8 таблиц.

## **2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **2.1 Материалы и методы исследования**

#### **2.1.1 Описание выборок пациентов**

##### **2.1.1.1 Группа пациентов с COVID-19, вызванным заражением 20B вариантом SARS-CoV-2**

С первого ноября 2020 года по 25 февраля 2021 200 пациентов были госпитализированы в ОРИТ клиники первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова с диагнозом COVID-19 по критерию NEWS и NEWS2. Пациенты наблюдались в течении 30 дней: 14 пациентов погибли и 30 выжили в течении этого периода. Пациенты для RNA-seq были отобраны по дополнительным критериям: возраст от 55 до 80 лет и мужской пол. В результате 8 (3 погибших, 5 выживших) пациентов с тяжелым COVID-19 были отобраны для исследования. Материал для секвенирования был отобран на момент госпитализации в ОРИТ. Все исследуемые лица дали информированное согласие в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации. Исследование было одобрено этическим комитетом первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Исходя из опубликованного анализа данных GISAID, на период сбора образцов основным вариантом, распространенным в северо-западном регионе России был вариант 20B (20B – Nextclade, B.1.1 – *Pango* Lineage) – вариант, приходящийся непосредственным предком вариантам Альфа, Бета и Омикрон. Исходя из этого, в дальнейшем в работе эта группа пациентов рассматривается как зараженная 20B вариантом SARS-CoV-2.

##### **2.1.1.2 Группа пациентов с COVID-19, вызванным заражением Дельта вариантом SARS-CoV-2**

С 25 июня 2021 года по 12 августа 2021 66 пациентов были госпитализированы в ОРИТ с диагнозом COVID-19, вызванным штаммом «Дельта» SARS-CoV-2. Пациенты наблюдались в течении 30 дней, и в течении этого периода 10 пациентов погибли, а 10 выжили. В результате 10 пациентов (5 погибших и 5 выживших) были отобраны для исследования. Материал для секвенирования был отобран на момент госпитализации в ОРИТ.

#### **2.1.2 Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови**

Мононуклеарные лейкоциты периферической крови (МПК) выделяли из 8 мл венозной крови с добавлением антикоагулянта ЭДТА при помощи метода Ficoll-Paque (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Чикаго, США). После центрифугирования МПК были собраны и дважды промыты при помощи фосфатного буфера (pH 7.4) для того, чтобы удалить богатую тромбоцитами фракцию плазмы.

#### **2.1.3. Выделение и секвенирование РНК**

Тотальная РНК была получена из МПК при помощи Тризола (TRIzol Reagent, Thermo Fisher Scientific, Волтам, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Полученная РНК была немедленно заморожена при -80 °С.

Работы по секвенированию проводились при участии компании «Геноаналитика». Количество и качество РНК были оценены при помощи спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Волтам, США) и системы для автоматизированного капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer с набором RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA) в соответствии с протоколом изготовителя. Индекс целостности РНК (RIN) во всех образцах составлял более 8. Поли-А фракция была получена из тотальной РНК при помощи олиго-Т магнитных

частиц Dynabeads® mRNA Purification Kit (Ambion, USA) в соответствии с протоколом изготовителя. Библиотеки для секвенирования были получены поли-А фракции РНК при помощи кита NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep Kit (NEB, USA) и NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Index Primers Set 1) в соответствии с протоколом изготовителя. Концентрация библиотек для секвенирования была оценена при помощи кита Qubit dsDNA HS Assay Kit на флюорометре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Распределение длинны полученных фрагментов было определено при помощи кита the Agilent High Sensitivity DNA Kit на Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Непарные риды длиной 50 п.н. были отсекуены из полученных библиотек при помощи кита TruSeq SBS Kit V3 на платформе Illumina HiSeq1500 (Illumina, San Diego, CA, USA). Результаты секвенирования доступны для скачивания в Gene Expression Omnibus по идентификаторам GSE185863 (сет 1) и GSE272392 (сет 2).

#### **2.1.4 Обработка и биоинформатический анализ данных**

Для определения списка дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) полученные данные секвенирования были обработаны при помощи трех различных методов обработки данных секвенирования (Далее – метод обработки данных секвенирования - пайплайн). Сравнительный обзор пайплайнов представлен на рис. 1. Для дальнейшего анализа были отобраны дифференциально экспрессирующиеся гены, выявленные во всех трех пайплайнах одновременно.

#### **2.1.5 Обогащение терминами Gene Ontology**

Обогащение терминами Биологические процессы из онтологии терминов Gene Ontology (GO enrichment) производился при помощи аппов ClueGO v. 2.5.5 и Cluepedia v. 1.5.5 для Cytoscape v. 3.6.1. Значимо обогащенные термины были выявлены при помощи правостороннего гипергеометрического теста с поправкой на множественное тестирование «FDR» ( $p\text{-value} < 0.01$ ).

#### **2.1.6 Дополнительные выборки пациентов для подтверждения полученных результатов**

Для подтверждения полученных результатов были собраны дополнительные выборки пациентов клиники ОРИТ ПСПбГМУ с диагнозом COVID-19. Были собраны две группы пациентов – первая в период наибольшей распространенности варианта 20В (с 1 ноября 2020 по 25 февраля 2021), а вторая в период наибольшей распространенности варианта Дельта (с 1 июля 2021 по 31 августа 2021). Образцы (плазма крови и МПК) были собраны в день поступления пациентов в ОРИТ, а также через 7 дней после этого. В общей сложности, с учетом исходов – пациенты были подразделены на подгруппы – 28 пациентов, зараженных 20В вариантом SARS-CoV-2, из которых 13 погибли и 15 выжили по истечении 30 дней; а также 39 пациентов, зараженных Дельта вариантом SARS-CoV-2, из которых 21 погибли и 18 выжили по истечении 30 дней. Все пациенты удовлетворяли следующим критериям включения – возраст между 40 и 80 годами, отсутствие хронических коморбидностей, таких как рак, цереброваскулярные заболевания, сердечная или почечная недостаточность.

#### **2.1.7 Сбор плазмы крови**

Плазма крови была получена из периферической венозной крови в вакуумные контейнеры с ЭДТА при помощи центрифугирования в течение 20 мин при 3000 g. Центрифугирование было проведено не более чем через 20 минут после забора крови. Образцы плазмы хранились при – 80°С.

### 2.1.8 Липидный профиль плазмы

Концентрации общего холестерина (ТС), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и триглицеридов в плазме крови были определены при помощи биохимического анализатора OLYMPUS AU400.

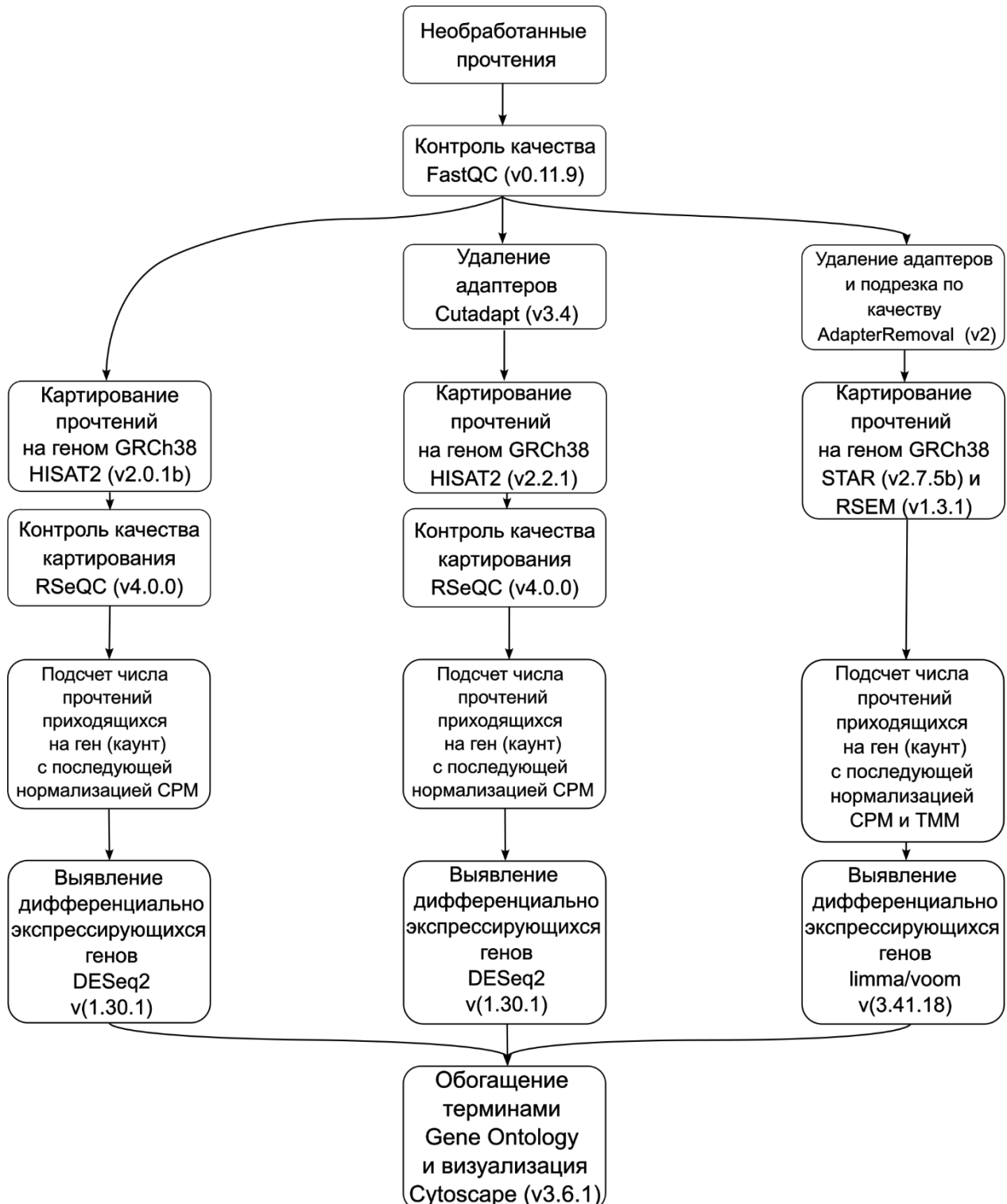


Рисунок 1. Схема трех использованных методов обработки данных секвенирования.

## **2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

В рамках работы было проведено транскриптомное профилирование на двух группах пациентов – группа пациентов, госпитализированных в ОРИТ с первого ноября 2020 года по 25 февраля 2021 года, и группа пациентов, госпитализированных в ОРИТ с 25 июня 2021 года по 12 августа 2021 года.

### **2.2.1 Транскриптомное профилирование в группе зараженных вариантом 20В SARS-CoV-2**

#### **2.2.1.1 Секвенирование РНК**

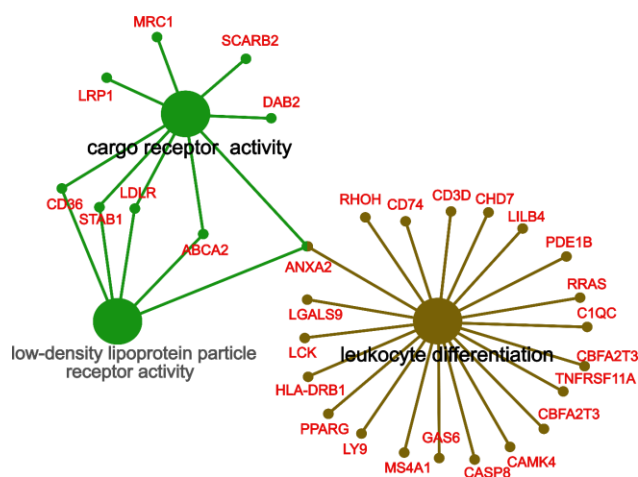
В процессе исследования были получены образцы крови от 200 пациентов ОРИТ с SARS-CoV-2. Из 200 образцов, для транскриптомного секвенирования согласно критериям, описанным в разделе Материалы и Методы, были отобраны 8. По исходу 30 дней 5 пациентов из отобранных выжили и 3 пациента погибли. Из отобранных образцов были получены МПК. Из МПК была выделена мРНК, и проведено широкомасштабное параллельное секвенирование кДНК в двух технических повторах на пациента.

#### **2.2.1.2 Выявление дифференциальной экспрессии генов между группами при помощи DESeq2 и limma/voom**

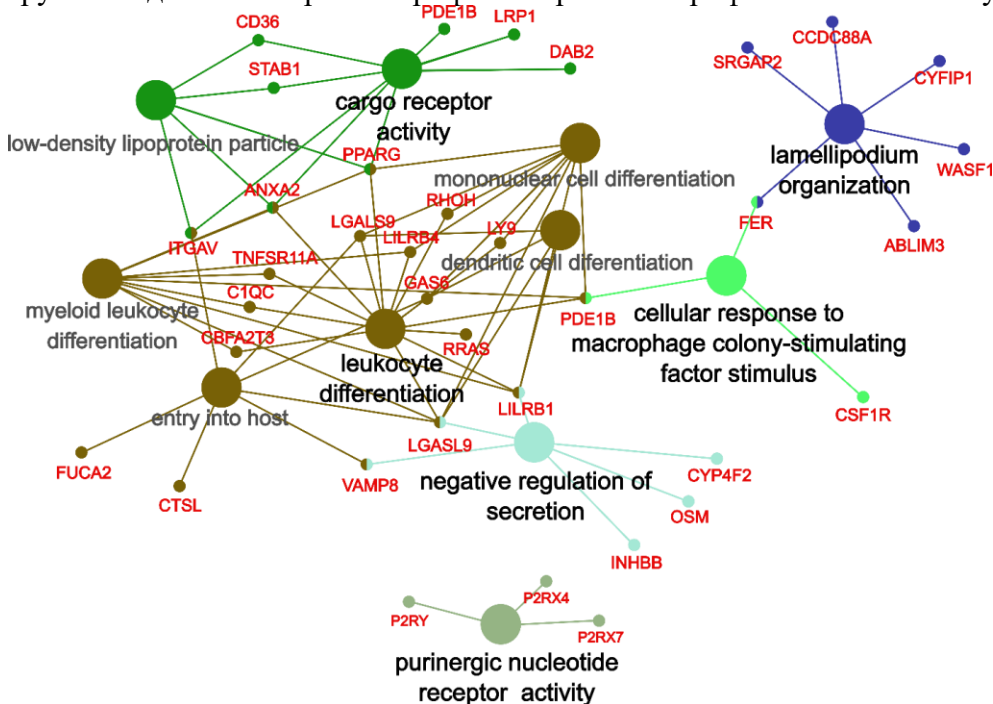
Полученные данные секвенирования были обработаны при помощи трех различных пайплайнов, подробное описание которых находится в разделе “материалы и методы”. В процессе анализа описанные далее шаги были реализованы в каждом из пайплайнов с использованием различных биоинформатических инструментов. Значимо дифференциально экспрессированными считались гены, для которых значение модуля кратного изменения (FC) составляло более 1.5 и значение  $p.value$  с поправкой на множественное тестирование составляло  $< 0.05$ . В общей сложности, в Пайплайне 1 было выявлено 1038 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) (488 с повышенной и 550 с пониженной экспрессией в группе погибших по сравнению с выжившими); в Пайплайне 2 было выявлено 866 ДЭГ (399 с повышенной и 516 с пониженной экспрессией в группе погибших по сравнению с выжившими); в Пайплайне 3 было выявлено 516 ДЭГ (188 с повышенной и 328 с пониженной экспрессией в группе погибших по сравнению с выжившими). Стоит отметить, что в двух экспериментах были использованы разные критерии для отбора ДЭГ – в группе зараженных вариантом 20В использовалась поправка на множественное тестирование (FDR), а в группе зараженных вариантом Дельта нет.

### 2.2.1.3 Анализ обогащения терминов Gene Ontology

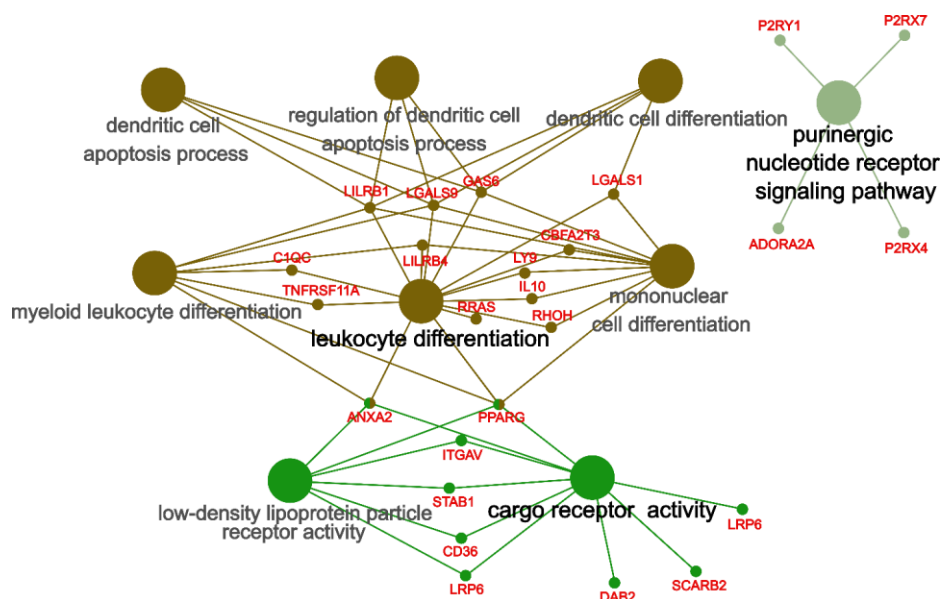
Для того, чтобы систематически выявить биологические процессы, влияющие на определение течения COVID-19, было проведено обогащение терминов Gene Ontology. Затем значимо обогащенные термины были определены в группы на основании общих ДЭГ. Сети генов и терминов для обогащений ДЭГ, полученных в каждом из пайплайнов представлены на рис. 2, 3 и 4.



**Рисунок 2.** Сеть генов и терминов, построенная на основании обогащения терминов Gene Ontology в группе пациентов, инфицированных вариантом 20B SARS-CoV-2, при использовании ДЭГ, полученных в Пайплайне 1. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим p.value в каждой группе выделяется черным шрифтом. Красный шрифт обозначает что узел является геном



**Рисунок 3.** Сеть генов и терминов, построенная на основании обогащения терминов Gene Ontology в группе пациентов, инфицированных 20B вариантом SARS-CoV-2, при использовании ДЭГ, полученных в Пайплайне 2. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим p.value в каждой группе выделяется черным шрифтом. Красный шрифт обозначает что узел является геном.

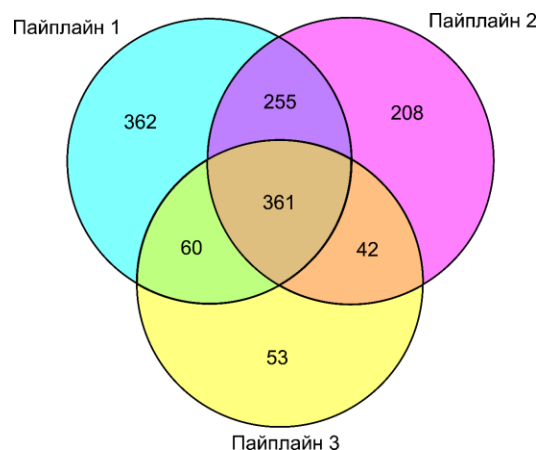


**Рисунок 4.** Сеть генов и терминов, построенная на основании обогащения терминов Gene Ontology в группе пациентов, инфицированных 20B вариантом SARS-CoV-2, при использовании ДЭГ, полученные в Пайплайне 3. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим *p*.value в каждой группе выделяется черным шрифтом. Красный шрифт обозначает что узел является геном.

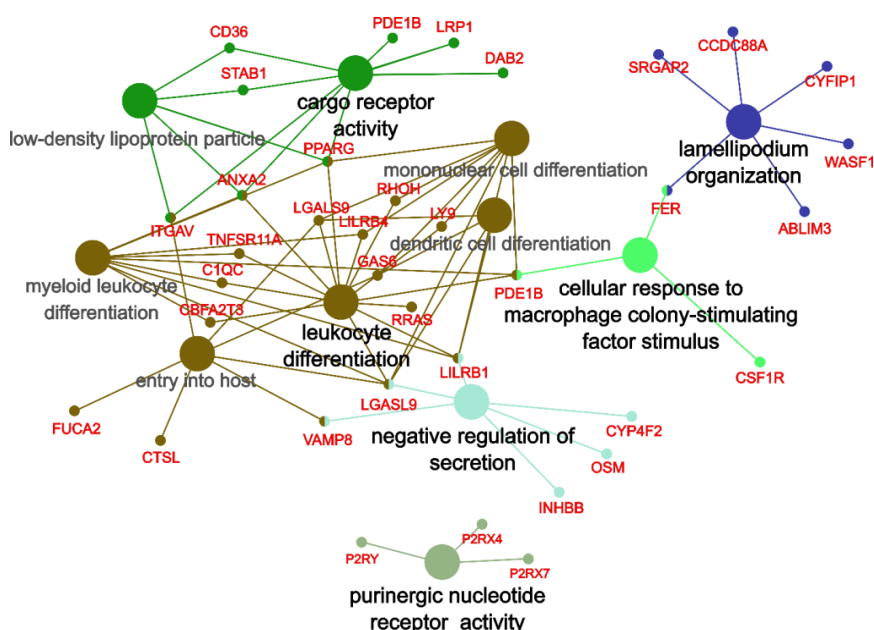
Сравнение терминов, выявленных при использовании разных пайплайнов показало, что термины low-density lipoprotein particle receptor activity (GO:0005041), leukocyte differentiation (GO:0002521), cargo receptor activity (GO:0038024) выявляются как обогащенные ДЭГ вне зависимости от используемых биоинформатических инструментов.

#### 2.2.1.4 Выявление общих ДЭГ между тремя пайпланами и обогащение терминами Gene Ontology

Используя гены, выявленные как дифференциально экспрессирующиеся во всех трех пайплайнах, была построена диаграмма Венна с учетом направления изменения экспрессии (рис. 5). В общей сложности был выявлен 361 общий ДЭГ, из которых 248 имели повышенную экспрессию, а 113 - пониженную у выживших пациентов по сравнению с погибшими. Далее было проведено обогащение терминами Gene Ontology с использованием этих генов (рис. 6). Используя построенную сеть генов и терминов, были выявлены ключевые гены, определенные как гены, связанные с не менее чем тремя различными значимо обогащенными терминами. Такими генами оказались *STAB1*, *PPARG*, *CD36*, *ITGAV* и *ANXA2* (Таблица 1).



**Рисунок 5.** Диаграмма Венна для дифференциально экспрессирующихся генов между группой выживших пациентов и группой погибших пациентов, зараженных вариантом 20B SARS-CoV-2 для всех трех использованных пайплайнов.



**Рисунок 6.** Сеть генов и терминов, построенная на основании обогащения терминов Gene Ontology при использовании ДЭГ, общих между всеми пайплайнами. Цвет обозначает принадлежность терминов к одной группе на основании общих ДЭГ. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим  $p$ .value в каждой группе выделяется черным шрифтом. Красный шрифт обозначает что узел является геном.

**Таблица 1.** Ключевые ДЭГ, выявленные между группами погибших и выживших пациентов, инфицированных 20B вариантом SARS-CoV-2

Ген	Предполагаемая роль в патогенезе	Процессы GO:BP	У выживших в сравнении с погибшими
<i>CD36</i>	Рецептор модифицированных липопротеидов низкой плотности, презентация липидных антигенов тканевыми макрофагами	Активность рецептора липопротеинов низкой плотности, активность транспортных рецепторов	Пониженная экспрессия
<i>STAB1</i>			
<i>ITGAV</i>	Осуществление ACE2 зависимого входа SARS-CoV-2 в клетку	Активность рецептора липопротеинов низкой плотности, активность транспортных рецепторов, проникновение в клетку	
<i>PPARG</i>	Регуляция метаболизма липидов в иммунных клетках, презентация липидных антигенов	Активность рецептора липопротеинов низкой плотности, дифференцировка лейкоцитов, дифференцировка миелодных лейкоцитов, активность транспортных рецепторов	
<i>ANXA2</i>	Гомеостаз сосудов, регуляция воспаления и активации иммунной системы, повреждение и восстановление тканей, метаболизм холестерина		

## 2.2.2 Транскриптомное профилирование в группе зараженных вариантом Дельта

### 2.2.2.1 Секвенирование РНК

В процессе исследования были получены образцы крови от 66 пациентов ОПИТ с SARS-CoV-2. У всех пациентов при помощи RT-PCR было подтверждено заражение штаммом коронавируса SARS-CoV-2 Дельта. Из 66 образцов для транскриптомного секвенирования, согласно критериям, описанным в разделе Материалы и Методы, были отобраны 10. По исходу 30 дней 5 пациентов из отобранных выжили и 5 пациентов погибли. Из отобранных образцов были получены МПК, из которых была выделена мРНК, и проведено широкомасштабное параллельное секвенирование кДНК.

### 2.2.2.2 Выявление дифференциальной экспрессии между группами при помощи DESeq2 и limma/voom

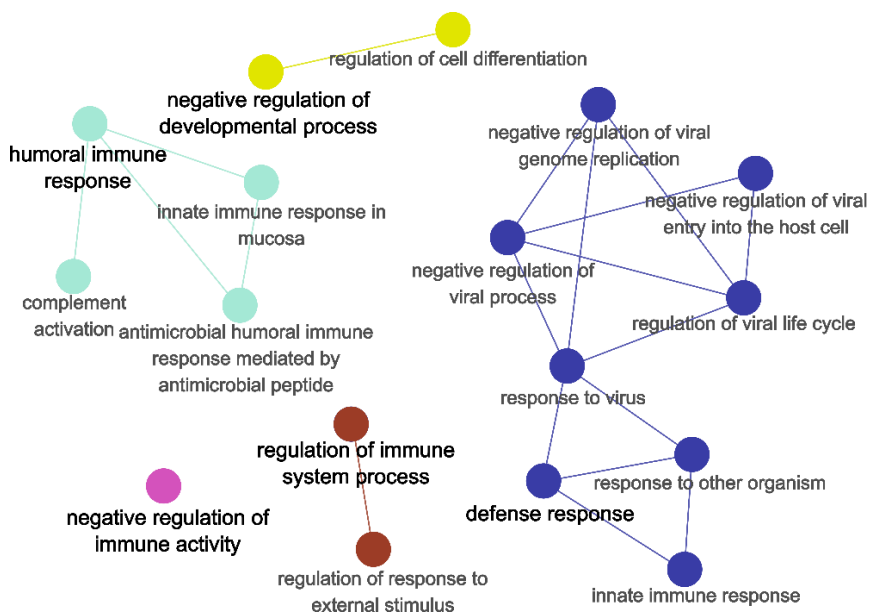
Полученные данные секвенирования были обработаны при помощи трех различных пайплайнов, подробное описание которых приведено в разделе “материалы и методы”. В Пайплайне 1 было выявлено 429 ДЭГ (292 с повышенной и 156 с пониженной экспрессией в группе погибших по сравнению с выжившими). В Пайплайне 2 было выявлено 345 ДЭГ (266 с повышенной и 79 с пониженной экспрессией в группе погибших по сравнению с выжившими). В Пайплайне 3 было выявлено 306 ДЭГ (191 с повышенной и 115 с пониженной экспрессией в группе погибших по сравнению с выжившими).

### 2.2.2.3 Анализ обогащения терминов Gene Ontology

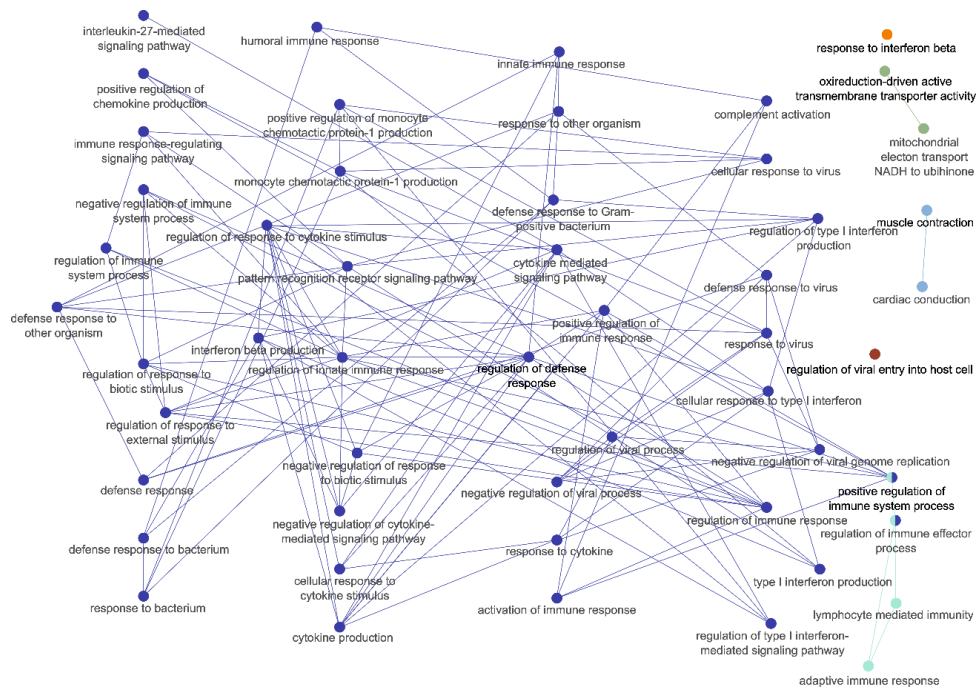
Было проведено обогащение терминами Gene Ontology, термины были сгруппированы на основании общих ДЭГ, и были построены сети генов и терминов (рис. 7, 8, 9). Термины считались значимо обогащенными по результатам одностороннего гипергеометрического теста с  $p$ -value с поправкой Бонферрони на множественное тестирование  $< 0.05$ . Большинство значимо обогащенных терминов во всех трех пайплайнах относились к процессам воспаления, врожденного иммунитета и вирусной репликации.

### 2.2.2.4 Выявление общих ДЭГ между тремя пайплайнами и обогащение терминами Gene Ontology

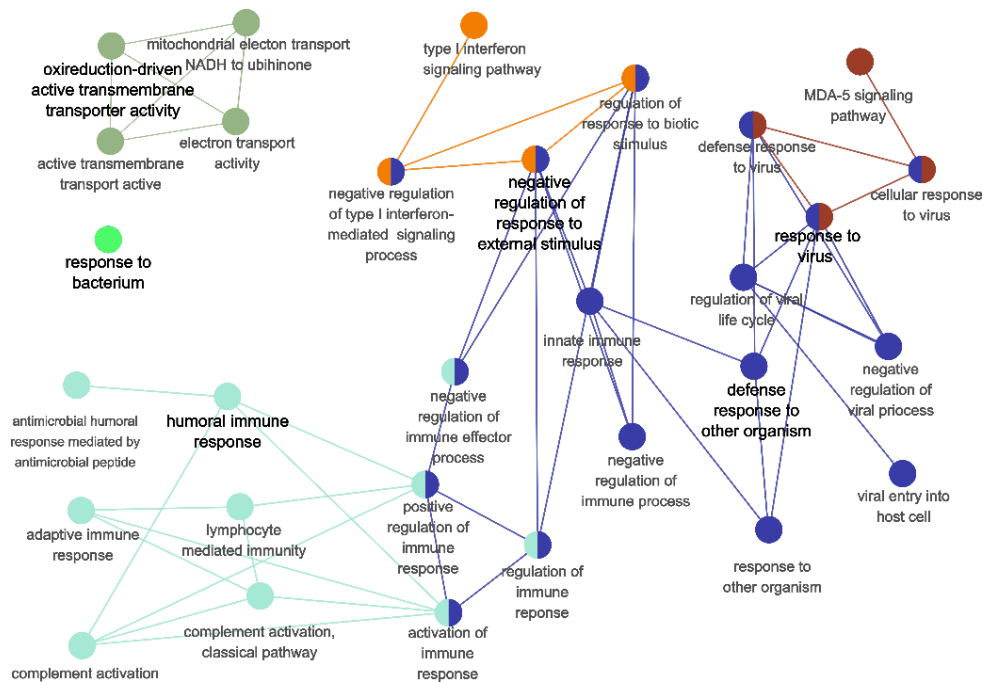
Используя гены, выявленные как дифференциально экспрессирующиеся во всех трех пайплайнах, была построена диаграмма Венна с учетом направления изменения экспрессии (рис. 10). Был идентифицирован набор из 75 генов (59 с повышенной и 16 с пониженной экспрессией в группе погибших по сравнению с выжившими), выявленных как дифференциально экспрессированные во всех трех пайплайнах с учетом направления изменения экспрессии. Далее было проведено обогащение терминами Gene Ontology с использованием этих генов. В общей сложности было идентифицировано 14 значимо обогащенных терминов, 13 из которых связаны с иммунной системой.



**Рисунок 7.** Сеть генов и терминов, построенная на основании обогащения терминов Gene Ontology в группе пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 Дельта, при использовании ДЭГ, полученных в Пайплайне 1. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим  $p$ -value в каждой группе выделяется черным шрифтом.



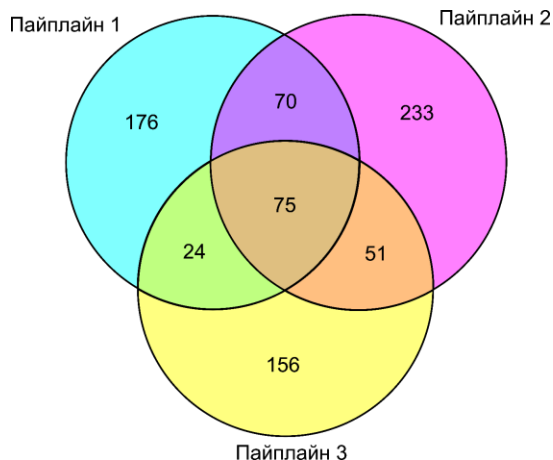
**Рисунок 8.** Сеть генов и терминов, построенная на основании обогащения терминов Gene Ontology в группе пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 Дельта, при использовании ДЭГ, полученных в Пайплайне 2. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим p.value в каждой группе выделяется черным шрифтом.



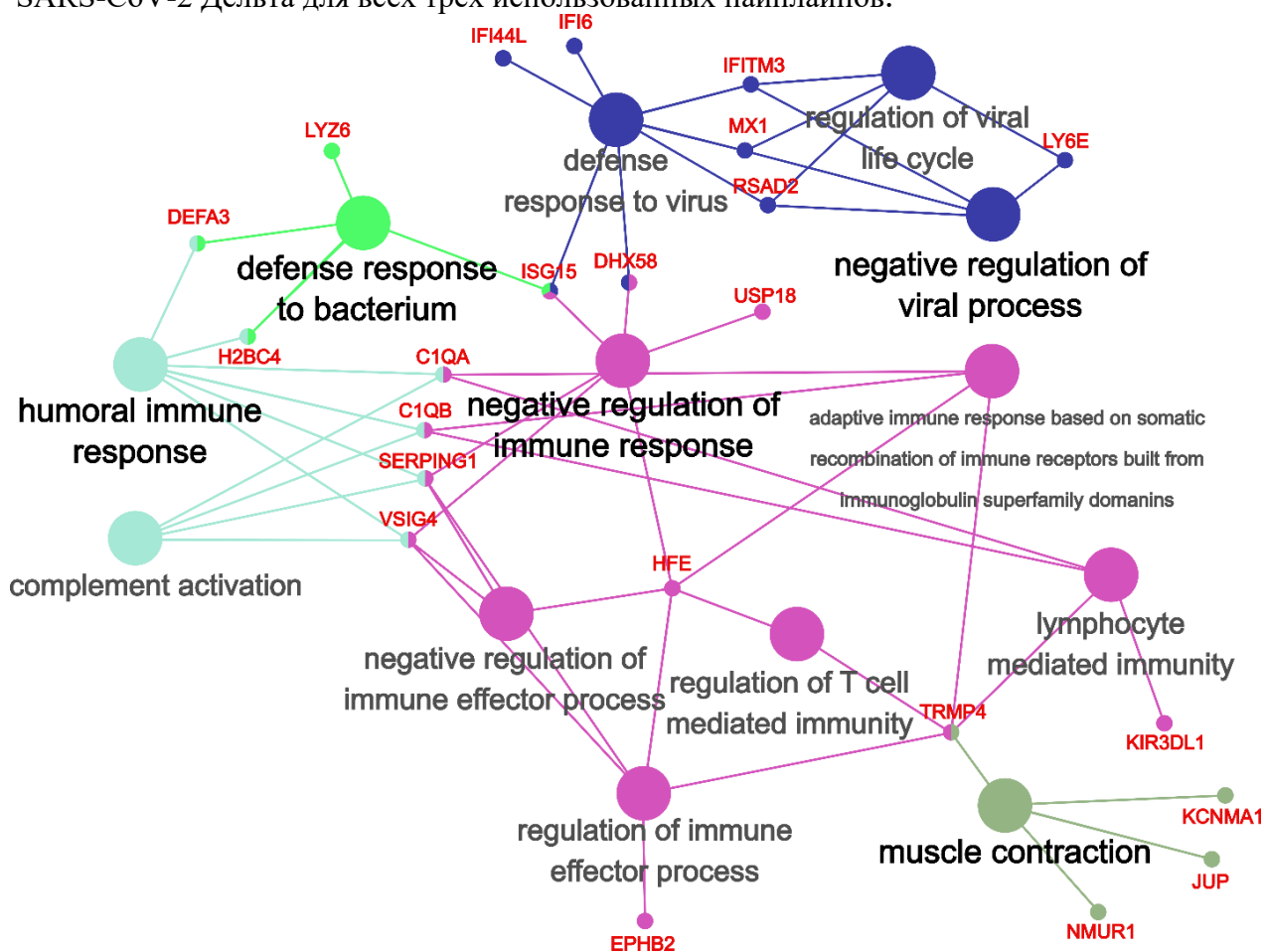
**Рисунок 9.** Сеть генов и терминов, построенная на основании обогащения терминов Gene Ontology в группе пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 Дельта, при использовании ДЭГ, полученных в Пайплайне 3. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим p.value в каждой группе выделяется черным шрифтом.

На основании обогащения было выделено 7 генов, относящихся одновременно к 3 и более значимо обогащенным терминам - *CIQB*, *CIQA*, *ISG15*, *SERPING1*, *VSIG4*, *TRPM4*, и *HFE*. Среди этих 7 генов в свою очередь можно выделить гены *CIQB*, *CIQA*, *ISG15*, *SERPING1* и *VSIG4* как гены, относящиеся к 2 и

более различным группам связанных с иммунной системой терминов (табл. 2). Ген ISG15 также примечателен тем, что это единственный ген, который относится к 3 разным группам терминов одновременно.



**Рисунок 10.** Диаграмма Венна для дифференциально экспрессирующихся генов между группой выживших пациентов и группой погибших пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 Дельта для всех трех использованных пайплайнов.



**Рисунок 11.** Сеть генов и терминов, построенных на основании обогащения терминов Gene Ontology при использовании ДЭГ, общих между всеми пайплайнами. Дифференциальная экспрессия определялась между группами выживших и погибших пациентов, зараженных вариантов SARS-CoV-2 Дельта. Цвет термина означает принадлежность группе, сформированной на основании общих ДЭГ. Термин с наибольшим p.value в каждой группе выделяется черным шрифтом. Красный шрифт обозначает что узел является геном.

### 2.2.3 Исследование липидных профилей в крови пациентов ОРПТ с COVID-19, инфицированных вариантами 20B и Дельта SARS-CoV-2

Для того чтобы выяснить, сопровождаются ли изменения в экспрессии рецепторов на уровне транскриптома изменениями на уровне липидома, нами было проведено исследование липидного профиля плазмы крови в группах пациентов ОРПТ с COVID-19, вызванным заражением вариантами SARS-CoV-2 20B и Дельта. Концентрации липидов между группами с летальными и нелетальными исходами были сравнены при помощи U-теста Манна-Уитни. Значимые различия между группами выживших и погибших не были выявлены, однако, в группе пациентов, инфицированных вариантом 20B SARS-CoV-2, была выявлена тенденция ( $0.1 > p > 0.05$ ) к снижению уровня ЛПНП и общего холестерина в группе погибших по сравнению с выжившими (табл. 3). Подобные тенденции не были выявлены ни в каких других сравнениях, будь то в группе инфицированных Дельта вариантом SARS-CoV-2, или в концентрации липопротеинов высокой плотности и триглицеридов.

**Таблица 2.** Ключевые ДЭГ, выявленные между группами погибших и выживших пациентов, инфицированных Дельта вариантом SARS-CoV-2

Ген	Предполагаемая роль в патогенезе	Процессы GO:BP	У выживших в сравнении с погибшими
<i>ISG15</i>	Кодирует интерферон-индуцируемый убиквитин-подобный белок, потенциально связывается с P1pro SARS-CoV-2	Защитный ответ на вирус, негативная регуляция вирусного процесса, негативная регуляция иммунного процесса	Повышенная экспрессия
<i>SERPING1</i>	Играют роль в активации системы комплемента, которая, в свою очередь, играет значимую роль в защите от SARS-CoV-2	Гуморальный ответ, система комплемента, негативная регуляция иммунного процесса	
<i>VSIG4</i>			
<i>CQ1B</i>			
<i>CQ1A</i>			

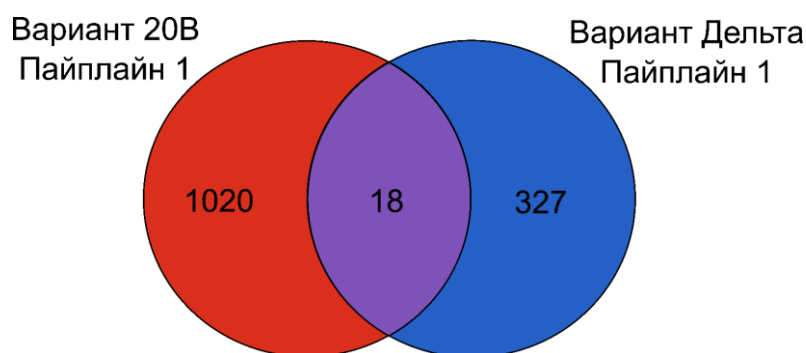
**Таблица 3.** Концентрации различных компонентов липидного профиля в группах пациентов ОРИТ с COVID-19 вызванным заражением 20В и Дельта вариантами SARS-CoV-2 с летальными и нелетальными исходами. ОХ – общий холестерол, ТГ – триглицериды, ЛПНП – липопротеины низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности

Компонент липидного профиля	20В		Дельта	
	Летальный исход (N=21)	Не летальный исход (N=18)	Летальный исход (N=13)	Не летальный исход (N=15)
ОХ, mmol/l	<b>3.4 (2.4-4.8)</b> <b>(p=0.054)</b>	<b>4.0 (2.6-5.9)</b>	3.5 (2.1-5.8)	4.2 (2.5-6.7)
ЛПНП, mmol/l	<b>1.8 (1.0-2.9)</b> <b>(p=0.087)</b>	<b>2.4 (1.5-3.7)</b>	1.8 (0.1-3.5)	2.2 (0.9-4.3)
ЛПВП, mmol/l	0.8 (0.4-1.6)	1.0 (0.43-1.4)	0.8 (0.3-1.4)	0.9 (0.6-1.5)
ТГ, mmol/l	1.5 (1.0-5.4)	1.5 (1.9-3.0)	2.1 (0.9-4.3)	1.7 (0.9-4.5)

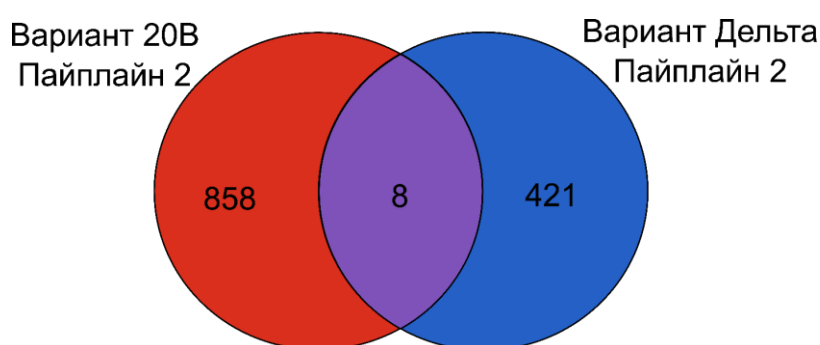
#### 2.2.4 Сравнительный анализ ДЭГ, выявленных в группах инфицированных 20В вариантом и Дельта вариантом SARS-CoV-2

Доля общих ДЭГ в группах пациентов с вариантами 20В и Дельта не достигает даже 5% ни в одном из случаев (рис. 12-15). Исходя из этого, можно заключить что различия между погибшими и выжившими в группе пациентов с вариантом 20В SARS-CoV-2 преимущественно связаны с генами, которые связаны с обменом липидов. В том числе среди них выявлены ДЭГ, которые можно в целом отнести к функционированию иммунной системы (как, например, *CD36* и *STAB1*). В то же время ДЭГ, различающиеся между группами погибших и выживших, инфицированных вариантом Дельта, в первую очередь связаны с регуляцией иммунных процессов, и, в особенности, с негативной регуляцией иммунных процессов и регуляцией активации системы комплемента. Идея о значимости обмена липидов, и в частности, о даунрегуляции сигнального пути рецепторов липопротеинов низкой плотности для исхода COVID-19 была многократно подтверждена в независимых исследованиях, включая метаанализ 22 опубликованных статей. Полученные нами результаты исследования профиля липидов также говорят в пользу значимости обмена липидов, и, в частности, обмена липопротеинов низкой плотности для определения исходов заболевания в случае варианта 20В, но не варианта Дельта.

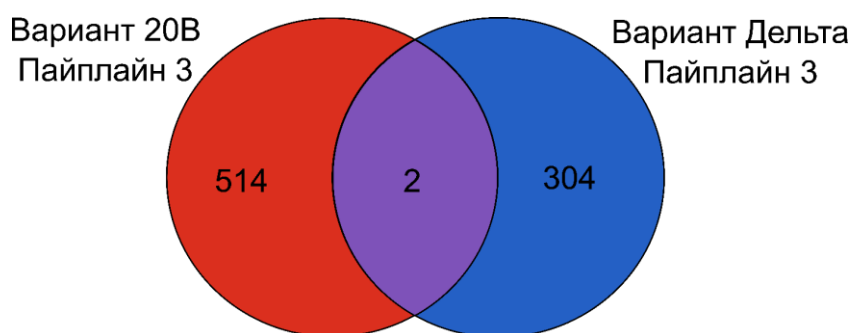
Варианты 20В и Дельта различаются наборами мутаций, в особенности в шиповидном гликопротеине S. Вариант B20 характеризуется двумя не синонимичными заменами в белке N SARS-Cov-2, R203K, G204R, и не несет никаких не синонимичных замен в шиповидном гликопротеине. по сравнению с оригинальным вариантом «Ухань». Дельта вариант характеризуется другим набором 7 миссенс мутаций (R158G, T478K, D950N в белке шиповидного гликопротеина, I82T в белке М, D63G в белке N, T120I в ORF7a, T60A в белке ORF9b) и делецией (156-157дел в белке S), и несколько из этих мутаций могут влиять на взаимодействие шиповидного гликопротеина с ACE2 и белками иммунной системы. Однако роль этих мутаций не до конца понятна на данный момент. Например, не выявлено отличающих варианты Дельта и 20В мутаций, влияющих на структуру PLpro. Однако несмотря на то, что основным субстратом PLpro SARS-CoV-2 является ISG15, в группе зараженных 20В вариантом SARS-CoV-2 не выявляется дифференциальная экспрессия ISG15 между группами выживших и погибших.



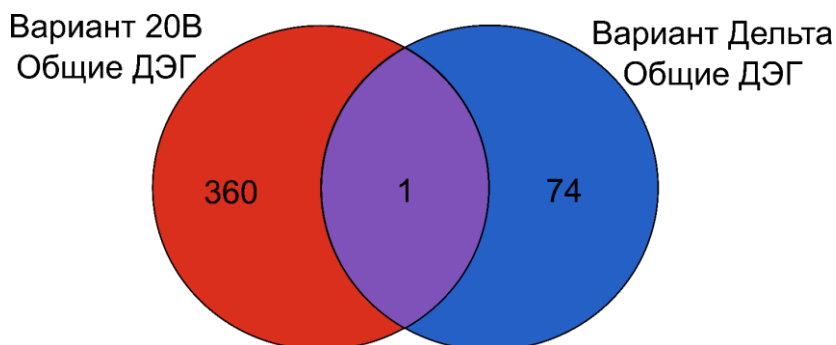
**Рисунок 12.** Диаграмма Венна по дифференциально экспрессирующимся генам между группами пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 20B и Дельта полученных в пайплайне 1.



**Рисунок 13.** Диаграмма Венна по дифференциально экспрессирующимся генам между группами пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 20B и Дельта полученных в пайплайне 2.



**Рисунок 14.** Диаграмма Венна по дифференциально экспрессирующимся генам между группами пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 20B и Дельта полученных в пайплайне 3.



**Рисунок 15.** Диаграмма Венна по дифференциально экспрессирующимся генам между группами пациентов, зараженных вариантом SARS-CoV-2 20B и Дельта по генам, идентифицированным как дифференциально экспрессирующиеся во всех 3 пайплайнах.

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кратко подводя итоги исследования, можно обобщить, что различия между погибшими и выжившими в группе пациентов с вариантом 20B SARS-CoV-2 преимущественно связаны с обменом липидов, а в группе пациентов с вариантом Дельта – с регуляцией иммунных процессов, и в особенности негативной регуляции иммунных процессов и регуляции активации системы комплемента. Идея о значимости обмена липидов, и в частности, о даунрегуляции сигнального пути рецепторов липопротеинов низкой плотности для исхода COVID-19 была многократно подтверждена в независимых исследованиях, включая метаанализ 22 опубликованных статей. Полученные нами результаты исследования профиля липидов также говорят в пользу значимости обмена липидов, и, в частности, обмена липопротеинов низкой плотности для определения исходов заболевания в случае варианта 20B, но не варианта Дельта. Одной из ключевых особенностей варианта Дельта, которые могут объяснить смещение ДЭГ от связанных с метаболизмом липидов генов к генам, связанным с иммунной системой, представляется улучшенное (по сравнению с вариантом 20B и Уханьским вариантом) иммунное избегание, характеризующее более поздние варианты SARS-CoV-2, в том числе вариант Дельта. Логично предположить, что с улучшением способности к иммунному избеганию у вируса, влияние различий в тонкой регуляции иммунной системы хозяина, тоже будет расти. Для того, чтобы лучше понять, какую роль мутации SARS-CoV-2 играют в патогенезе и определении исхода COVID-19, необходимо проводить серийные исследования постоянно эволюционирующего вируса в реплицируемых обстоятельствах, таких как характеристики пациента (пол, возраст, вес и др.), получаемое лечение, статус по вакцинации. Безусловно, всегда будут существовать переменные, находящиеся вне контроля исследователей (в особенности учитывая, что новые варианты сменяют друг друга, и зачастую достаточно недолго сосуществуют в один и тот же временной период), однако, тем не менее, необходимо прилагать усилия для воспроизведения дизайнов эксперимента так, чтобы минимизировать влияние этих запутывающих факторов. В современном мире, где доминируют более заразные и менее вирулентные подварианты варианта Омикрон, и с улучшением стандартов и возможностей систем здравоохранения, использованный в данной работе дизайн (выживших против погибших) становится все труднее и труднее воспроизвести.

Однако, учитывая, что COVID-19 стал неотъемлемой частью современной жизни, другие дизайны, как, например, сравнение тяжелых случаев с легкими, все еще доступны, и поэтому необходимо продолжать подобные исследования, чтобы уровень понимания механизмов патогенеза COVID-19 успевал за бесконечно эволюционирующим вирусом.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. Использование трех различных наборов биоинформатических инструментов для транскриптомного анализа позволяет выявлять высоко сходные между различными наборами инструментов значимо обогащенные термины Gene Ontology: Biological Processes и общие для разных алгоритмов дифференциально экспрессирующиеся гены для дальнейшего анализа.
2. Сравнительный полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови пациентов с COVID-19, вызванным 20B вариантом вируса SARS-CoV-2, показал, что у пациентов с летальными и нелетальными исходами отличается экспрессия генов, связанных с активностью рецепторов липопротеинов низкой плотности по аннотации Gene Ontology.
3. Детальный анализ обогащения группы генов, связанных с активностью рецепторов липопротеинов низкой плотности по аннотации Gene Ontology, выявил следующие ключевые гены *PPARG*, *CD36*, *STAB1*, *ITGAV* и *ANXA2*, ассоциированные не менее, чем с 3 различными значимо обогащенными терминами Gene Ontology.
4. Сравнительный полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови пациентов с COVID-19, вызванным Дельта вариантом вируса SARS-CoV-2, показал, что у выживших и умерших пациентов отличается экспрессия генов, связанных с регуляцией иммунных процессов и системы комплемента по аннотации Gene Ontology.
5. Детальный анализ обогащения группы генов, связанных с регуляцией иммунных процессов и системы комплемента по аннотации Gene Ontology выявил следующие ключевые гены *ISG15*, *SERPING1*, *CIQA*, *CIQB*, и *VSIG4*, ассоциированные не менее чем с 4 различными значимо обогащенными терминами Gene Ontology.
6. Анализ концентрации липидов в плазме крови пациентов с летальными и нелетальными исходами COVID-19, вызванного вариантами 20B и Дельта SARS-CoV-2, выявил тенденцию в различии концентрации липопротеинов низкой плотности в случае варианта 20B, но не варианта Дельта.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в рецензируемых журналах

- 1) **Vlasov, I.**, Panteleeva, A., Usenko, T., Nikolaev, M., Izumchenko, A., Gavrilova, E., Shlyk, I., Miroshnikova, V., Shadrina, M., Polushin, Y., Pchelina, S., & Slonimsky, P. (2021). Transcriptomic Profiles Reveal Downregulation of Low-Density Lipoprotein Particle Receptor Pathway Activity in Patients Surviving Severe COVID-19. *Cells*, 10(12), 3495. doi: 10.3390/cells10123495.
- 2) Usenko, T., Miroshnikova, V., Bezrukova, A., Basharova, K., Landa, S., Korobova, Z., Liubimova, N., **Vlasov, I.**, Nikolaev, M., Izyumchenko, A., Gavrilova, E., Shlyk, I., Chernitskaya, E., Kovalchuk, Y., Slominsky, P., Totolian, A., Polushin, Y., & Pchelina, S. (2023). Fraction of plasma exomeres and low-density lipoprotein cholesterol as a predictor of fatal outcome of COVID-19. *PloS One*, 18(2), e0278083. doi: 10.1371/journal.pone.0278083.
- 3) **Vlasov, I.**, Usenko, T., Panteleeva, A., Mikhail, N., Izumchenko, A., Panafidina, V., Gavrilova, E., Shlyk, I., Miroshnikova, V., Shadrina, M., Polushin, Y., Pchelina, S., & Slominsky, P. (2025). Transcriptomic analysis of differential expression between surviving and nonsurviving patients infected by the SARS-CoV-2 Delta variant. *Scientific Reports*, 15(1), 16844. doi: 10.1038/s41598-025-00280-3.

### Материалы научных конференций

- 1) **Власов И.Н.**, Усенко Т. С., Пантелеева А. А., Николаев М. А., Изюмченко А. Д., Гаврилова Е. Г., Шлык И. В., Полушин Ю. С., Пчелина С. Н., Шадрина М. И., Сломинский П. А. «Транскриптомный анализ образцов первичных моноцитов крови, полученных от больных COVID-19 с летальными и нелетальными исходами». Международный Конгресс «VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы», г. Саратов, Россия, 14–19 июня 2024 года.
- 2) **Власов И.Н.**, Усенко Т.С., Пантелеева А.А., Николаев М.А., Изюмченко А.Д., Гаврилова Е.Г., Шлык И.В., Полушин Ю.С., Пчелина С.Н., Шадрина М.И., Сломинский П.А. «Транскриптомное профилирование моноцитов крови, полученных от больных COVID-19, инфицированных штаммом SARS-CoV-2 Delta». Курчатовский геномный форум, Международный форум природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва, Россия, 21–22 октября 2024 года.
- 3) **Власов И.Н.**, Усенко Т.С., Пантелеева А.А., Николаев М.А., Изюмченко А.Д., Гаврилова Е.Г., Шлык И.В., Полушин Ю.С., Пчелина С.Н., Шадрина М.И., Сломинский П.А. Транскриптомный анализ образцов первичных моноцитов крови, полученных от больных с тяжелым протеканием COVID-19, стратифицированных по заражению штаммом коронавируса «дельта». II Конгресс Международного общества клинической физиологии и патологии ISCPP2024, г. Москва, Россия, 13-15 мая 2024 года.
- 4) **Власов И.Н.**, Усенко Т.С., Пантелеева А.А., Николаев М.А., Изюмченко А.Д., Гаврилова Е.Г., Шлык И.В., Полушин Ю.С., Пчелина С.Н., Шадрина М.И., Сломинский П.А. Транскриптомное профилирование образцов первичных моноцитов крови, полученных от больных с тяжелым течением COVID-19. Молекулярная генетика и генетические технологии НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва, Россия, 19 мая 2024 года.