

АНАЛІЗ ВІДНОСНОЇ СЕРЕДНЬОЇ ДОВЖИНИ ТЕЛОМЕР В ЛЕЙКОЦИТАХ ЖІНОК, ЯКІ ХВОРИЛИ НА COVID-19

Д.С. КРАСНЄНКОВ¹, О.В. ГОРОДНА², Т.М. КАМІНСЬКА³, В.В. ПОДОЛЬСЬКИЙ⁴, Вл.В. ПОДОЛЬСЬКИЙ⁴, М.В. НЕЧИПОРЕНКО², Ю.Г. АНТИПКІН⁴, Л.А. ЛІВШИЦЬ²

¹ ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

³ КМП «Київська міська дитяча клінічна інфекційна лікарня»

⁴ ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України»

E-mail: livshits@edu.imbg.org.ua

Коронавірусна хвороба (COVID-19) – це гостре інфекційне захворювання дихальних шляхів, збудником якої є новий коронавірус SARS-CoV-2. Глобальна програма вакцинації проти SARS-CoV-2 ще триває, і захворюваність на COVID-19 у всьому світі значно зменшується. Тим не менш, серед мільйонів тих, хто пережив COVID-19, чисельні групи будуть потребувати допомоги через посилення клінічних наслідків після COVID-19. Наразі, існує необхідність пошуку молекулярних біомаркерів для моніторингу виникнення та прогресування пост-ковідного синдрому. З цієї метою досліджували відносну середню довжину ділянок хромосом в групах жінок репродуктивного віку: в групі пацієнтів ($n = 64$), що перехворіли на COVID-19 та в контрольній групі ($n = 42$) жінок такого ж віку. Аналіз проводили з використанням методу мультиплексної монохромної кількісної ПЛР в реальному часі на зразках ДНК виділених з лейкоцитів периферійної крові. За результатами проведеного дослідження встановлено, що відносна середня довжина хромосом в лейкоцитах периферійної крові, в групі хворих на COVID-19 була статистично вірогідно меншою ніж в контрольній групі ($p < 0,05$). Отримані результати дозволяють стверджувати, що спостережуване вкорочення відносної середньої довжини теломер у групі пацієнтів, які перехворіли на COVID-19, може бути свідченням того, що інфекція SARS-CoV-2 може безпосередньо спричинювати ерозію теломер в клітинах крові, зокрема, в лейкоцитах. Таким чином, визначення відносної середньої довжини теломер може бути інформативним прогностичним маркером для оцінки ризику тяжкості перебігу захворювання на COVID-19 та розвитку пост-ковідного синдрому.

Ключові слова: COVID-19, біомаркер, відносна середня довжина теломер, жінки репродуктивного віку.

Вступ. Коронавірусна хвороба (COVID-19) – це гостре інфекційне захворювання дихальних

шляхів, збудником якої являється новий корона вірус (SARS-CoV-2) і зараз, відповідно до наказу Міжнародного комітету з таксономії вірусів має назву важкий гострий респіраторний синдром коронавірус 2 (Velavan et al, 2020). Про дану хворобу стало відомо спершу 31 грудня 2019 р., коли ВОЗ була проінформована про випадки пневмоній невизначеної мікробної етіології в місті Ухань, провінції Хубей, Китай. Після першого зафіксованого випадку цієї хвороби в Китаї, вірус швидко поширився по інших країнах Азії, Центральної та Північної Європи, Америки. За лічені тижні локальний спалах набув загрозливих обрисів і переріс в світову проблему. 30 січня 2020 р. ВОЗ оголосила спалах COVID-19 масштабною надзвичайною ситуацією у галузі охорони здоров'я (Ren et al, 2020). Станом на 1 травня 2021 р. кількість інфікованих SARS-CoV-2 по всьому світу досягла майже 170 млн. та 3,5 млн. летальних випадків.

Глобальна програма вакцинації проти SARS-CoV-2 ще триває, і захворюваність на COVID-19 у всьому світі значно зменшується. Тим не менш, серед мільйонів тих, хто пережив COVID-19, чисельні групи будуть потребувати допомоги через посилення клінічних наслідків після COVID-19, визначених як пост-ковідний синдром (Oronsky, 2021; Walitt, 2021). Незважаючи на низку проявів, пов'язаних з пост-ковідним синдромом, існує брак потенційно значущих молекулярних біомаркерів для моніторингу виникнення та прогресування пост-ковідного синдрому.

В попередніх дослідженнях були отримані дані про вплив вірусних та бактеріальних інфекцій на оцінку біологічного віку визначеного як DNAmAge, яка здійснюється з використанням аналізу довжини теломерних діля-

© Д.С. КРАСНЄНКОВ, О.В. ГОРОДНА, Т.М. КАМІНСЬКА, В.В. ПОДОЛЬСЬКИЙ, Вл.В. ПОДОЛЬСЬКИЙ, М.В. НЕЧИПОРЕНКО, Ю.Г. АНТИПКІН, Л.А. ЛІВШИЦЬ, 2022

нок хромосом (Horvath, Levine, 2015; Kananen et al, 2015; Sabry et al, 2016). Встановлено, що коротші теломери асоційовані з ризиком розвитку більш тяжких симптомів COVID-19 (Froidure et al, 2020). Важливо зазначити, що в групі пацієнтів з пост-ковідним синдромом спостерігали суттєве вкорочення теломерних ділянок хромосом у порівнянні з таким показником у контрольній групі. Необхідно зазначити, що найбільш суттєвими відмінності були серед населення молодше 60 років (Mongelli et al, 2021).

Обговорюється можливість того, що зміни у довжині теломер, які характеризують високий ризик розвитку тяжкого перебігу захворювання на COVID-19 можуть перекриватися з тими, які асоційовані зі старінням (Mongelli et al, 2021). Тому, метою нашого дослідження був аналіз асоціації між довжиною теломерних ділянок хромосом лейкоцитів периферійної крові та перенесеною інфекцією SARS-CoV-2 у жінок репродуктивного віку з України.

Матеріали і методи. Аналіз клінічних даних та формування вибірок. В рамках даної роботи проведено відбір біологічних зразків периферійної крові. Групу обстеження 1 (64 пацієнтів) складала жінки репродуктивного віку, які перебували на лікуванні в інфекційному відділенні лікарні (Київ, Україна). Діагноз COVID-19 було підтверджено за допомогою ПЛР-тесту. Контрольна група складалася із здорових жінок (42 особи) з негативним результатом ПЛР-тесту на COVID-19. Всі індивіди даної групи є мешканцями міста Києва (Україна).

Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об'єкту дослідження, нами була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків периферійної крові, яка включала числовий код.

Зразки ДНК. Зразки геномної ДНК виділяли з венозної крові за допомогою комплексу реагентів для виділення нуклеїнових кислот DNA-TECHNOLOGY «ПРОБА-НК-ПЛЮС» за протоколом виробника.

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками, використовуюва-

ли прилад ND-1000 Spectrophotometer («Nano-Drop», США) у діапазоні λ 220– λ 300.

Визначення довжини теломер лейкоцитів за допомогою методу мультиплексної монохромної кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Для оцінки відносної середньої довжини теломер проводили кількісну монохромну мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі за методом запропонованим R.Cawthon (Cawthon, 2009).

Для проведення даної реакції використовували «Набір для проведення ПЛР-РЧ» у присутності інтеркалюючого барвника EvaGreen (виробництво – Solis BioDyne) відповідно до рекомендацій фірми-виробника на ампліфікаторі Bio-Rad Chromo4. На один зразок в 18 мкл реакційної суміші вносили 10 нг ДНК, а також пару праймерів telg і telc (кінцева концентрація – по 450 нмоль кожного), а також пару альбумінових праймерів albu і albd (кінцева концентрація кожного з 250 нмоль) для ампліфікації *in vitro* референсного гена альбуміну. Склад реакційної суміші та температурно-часові режими проведення мультиплексної монохромної кількісної ПЛР для оцінки відносної середньої довжини теломерних ділянок хромосом детально описані в наших попередніх дослідженнях (Khalangot et al, 2020).

Після завершення термоциклювання за допомогою програми Opticon Monitor 3 було отримано дані флуоресценції на кожному циклі ПЛР. Для кожної лунки/епендорфа було вирівнянно функцію Річардсона з подальшим обрахунком $Cy0$ (Guescini et al, 2008). Це безпороговий метод, що дозволяє значно підвищити точність кількісної ПЛР, за рахунок врахування кінетики реакції у кожній пробірці. Далі було побудовано стандартні криві: одна крива – для теломерного сигналу (T) та інша – для сигналу від однокопійного гена (S). За $Cy0$ за допомогою калібрувальної прямої було визначено кількість теломерної ДНК щодо референсної ДНК, аналогічно були отримані дані для кількості альбумінової ДНК. Значення ВСДТ отримували за допомогою співвідношення T/S.

Статистичний аналіз. Для перевірки нормальності розподілу отриманих показників ви-

користували тест Шапіро-Вілка. Для оцінки відмінності розподілу показників використовували непараметричний тест Манна-Уїтні (U-тест). Статистичну обробку проводили у програмному забезпеченні STATISTICA 10 (StatSoft).

Результати та їх обговорення. За результатами молекулярно-генетичного аналізу показники відносної середньої довжини хромосом (значення співвідношення T/S) були отримані з групи обстеження 1 і групи обстеження 2 для кожного з індивідів. Необхідно зазначити, що дані показники в групі жінок, які перехворіли на COVID-19 (група обстеження 1), коливались в межах 0,01–8,2 (T/S), в той час як в контрольній групі спостерігали значення 0,14–4,65 (T/S) відповідно. Нами було проведено оцінку розподілу відносної середньої довжини теломер в обох досліджуваних групах. За результатами перевірки нормальності розподілу змінних при використанні тесту Шапіро-Вілка отримали свідчення на користь того, що розподіл довжини теломер у досліджуваних групах (таблиця) не відповідає нормальному ($p < 0,000001$).

Порівняльний аналіз відносної середньої довжини теломер в групі жінок, що перехворіли на COVID-19 та індивідів жіночої статі з контрольної групи проводили з використанням критерію U тесту Манна-Уїтні. Було встановлено, що жінки, які перехворіли на COVID-19 мали статистично достовірно коротші теломери у порівнянні з індивідами контрольної групи ($p < 0,01$). Характеристики розподілу T/S (відносна середня довжина теломер лейкоцитів) у жінок, що перехворіли на COVID-19 та контрольній групі наведені на рисунку.

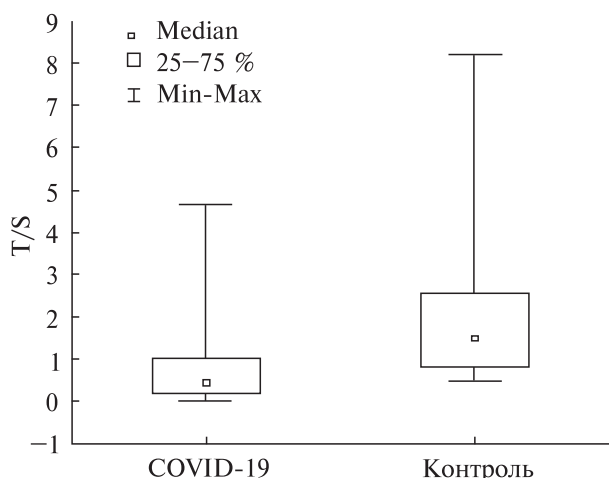
Наші спостереження узгоджуються з попередніми даними, які вказують на збільшення ризику виникнення ускладнень при COVID-19

у пацієнтів з короткими теломерами, що може бути викликано зниженим регенеративним потенціалом (Sanchez-Vazquez et al, 2021). Важливо зазначити, що більш коротші теломери також спостерігали і серед пацієнтів з респіраторним дистрес-синдромом. Було показано, що коротші теломери в лейкоцитах преферійної крові спостерігали у пацієнтів з вищою смертністю (Albrecht et al, 2014; Dos Santos et al, 2021).

В дослідженнях проведених групою авторів було висловлено припущення, що вирішальним фактором в асоціації більш коротших теломер з регенеративним потенціалом індивіда є не генетична компонента, а експозом (Jiang et al, 2022). При цьому низка дослідників відзначали, що довжина теломер за своєю природою має бути більш потужним інформативним маркером ускладнень при COVID-19 ніж стать або наявність гіпертензії у хворих на COVID-19. Також, важливо зазначити цікаві результати отримані стосовно теломерозалежної лімфопенії у пацієнтів літнього віку що збільшує вірогідність ускладнень при інфікуванні SARS-CoV-2 (Benetos et al, 2021). Стрімке зменшення здатності до клональної експансії лейкоцитів у пацієнтів після 60 років було зумовлене короткою довжиною теломер, що визначала зниження ефективності клональної експансії T-лімфоцитів в 10 разів у віковому діапазоні 60–70 років. Клональна експансія має вирішальне значення для ефективної боротьби з інфекційними захворюваннями, відповідно, очевидна значущість оцінки довжини теломер для стратифікації хворих відносно цього показника при COVID-19 та інших вірусних захворюваннях (Anderson et al, 2022). Відзначене нами зменшення відносної середньої довжини теломер у пацієток, що

Параметри закономірностей розподілу показників T/S (відносна середня довжина теломер лейкоцитів) серед жінок, які перенесли захворювання на COVID-19 та здорових індивідів жіночої статі з контрольної групи

Група обстеження	N	Співвідношення T/S (відносна середня довжина теломер)				
		мінімум	Q1 (квартиль)	медіана	Q3 (квартиль)	максимум
1	64	0,01	0,19	0,46	1,03	4,65
2 (контроль)	42	0,47	0,8	1,49	2,55	8,2



Характеристики розподілу T/S (відносна середня довжина теломер лейкоцитів) у жінок, що перехворіли на COVID-19 та контрольній групі

перехворіли на COVID-19 узгоджується з результатами про збільшення біологічного віку у пацієнтів, що перехворіли на COVID-19, на основі даних метилювання промоторних ділянок низки генів (Mongelli et al, 2021).

Наявність більш коротших за довжиною теломер у індивідів може також бути молекулярним біомаркером формування антиген-специфічних/ефекторних Т-клітин пам'яті SARS-CoV-2, які виводять вірусні частинки з організму (Aviv, 2021). Таким чином Т-клітини з короткими теломерами можуть спричинювати обмеження адаптивного імунітету проти SARS-CoV-2.

Результати, отримані в нашому дослідженні, дозволяють стверджувати, що спостережуване вкорочення відносної середньої довжини теломер у групі пацієнтів, які перехворіли на COVID-19, може бути свідченням того, що інфекція на SARS-CoV-2 може безпосередньо спричинювати ерозію (зміну просторової структури теломер) в клітинах крові, зокрема в лейкоцитах, і, відповідно, впливати на епігенетичну регуляцію експресії низки генів, завдяки зміні активності білків ремоделювання хроматину, які локалізовані в теломерних ділянках хромосом (Tuagi et al, 2016; Magaca-Acosta, Valadez-Graham, 2020). Таким чином, за результатами проведених досліджень можна зробити висновок про те, що відносна середня довжина теломер може бу-

ти інформативним прогностичним маркером для оцінки ризику тяжкості перебігу захворювання на COVID-19 та розвитку пост-ковідного синдрому та можливої причини передчасного старіння у жінок репродуктивного віку.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Дотримання етичних стандартів. Етичне схвалення дослідження було отримано від комітету з біоетики ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України», протокол №28 від 15.10.2020р. Інформована згода була отримана від обстежених.

Фінансування. Дана робота фінансувалася в рамках НДР «Дослідити значення медико-біологічних та соціологічних факторів в поширенні коронавірусного інфікування серед жінок та дітей в Україні» з державним реєстраційним номером 0120U104508.

ANALYSIS OF THE RELATIVE AVERAGE LONG TELOMERE OF WOMEN'S LEUKOCYTES, WHO WERE SICK WITH COVID-19

D.S. Krasnienkov, O.V. Gorodna, T.M. Kaminska, V.V. Podolskiy, V.I. Podolskiy, M.V. Nechyporenko, Yu.G. Antypkin, L.A. Livshits

State Institution «Institute of Gerontology named after Dmitry F. Chebotarev, National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv City Children's Clinical Hospital of Infectious Diseases

State Institution «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician O.M. Lukyanova, National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

E-mail: livshits@edu.imbg.org.ua

Coronavirus disease (COVID-19) is an acute infectious disease of the respiratory tract, the causative agent of which is the new coronavirus SARS-CoV-2. The global vaccination program against SARS-CoV-2 is still ongoing, and the incidence of COVID-19 worldwide is significantly decreasing. However, among the millions of survivors of COVID-19, large groups will require assistance due to increased clinical consequences following COVID-19. Currently, there is a need to find molecular biomarkers to monitor the occurrence and progression of the post-covid syndrome. For this purpose, we were measuring the relative average length

of telomeres in groups of women of reproductive age: in a group of patients ($n = 64$) who contracted COVID-19 and in a control group ($n = 42$) of women of the same age. The analysis was performed by monochrome quantitative PCR in real time on DNA samples isolated from peripheral blood leukocytes. According to the study's results, it was established that the relative average length of telomeres in peripheral blood leukocytes in the group of patients with COVID-19 was lower than in the control group ($p < 0.05$). Our results suggest that the observed shortening of the relative average length of telomeres in a group of patients infected with COVID-19 may be evidence in favor of the fact that SARS-CoV-2 infection, may directly cause erosion of telomeres in blood cells, in particular, in leukocytes. Accordingly, the determination of the relative average length of telomeres can be an informative prognostic marker for assessing the risk of the severity of the course of the disease in COVID-19 and the development of the post-covid syndrome.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Albrecht E, Sillanpää E, Karrasch S, Alves AC, Codd V, Hovatta I, Buxton JL, Nelson CP, Broer L, Hägg S, Mangino M, Willemsen G, Surakka I, Ferreira MA, Amin N, Oostra BA, Bäckmand HM, Peltonen M, Sarna S, Rantanen T, Sipilä S, Korhonen T, Madden PA, Gieger C, Jörres RA, Heinrich J, Behr J, Huber RM, Peters A, Strauch K, Wichmann HE, Waldenberger M, Blakemore AI, de Geus EJ, Nyholt DR, Henders AK, Piirilä PL, Rissanen A, Magnusson PK, Vieucla A, Pietiläinen KH, Martin NG, Pedersen NL, Boomsma DI, Spector TD, van Duijn CM, Kaprio J, Samani NJ, Jarvelin MR, Schulz H (2014) Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur Respir J* 43(4):983–992. <https://doi.org/10.1183/09031936.00046213>.
- Anderson J J, Susser E, Arbeevev KG, Yashin AI, Levy D, Verhulst S, Aviv A. (2022). Telomere length dependent T-cell clonal expansion: A model linking ageing to COVID-19 T-cell lymphopenia and mortality. *EbioMedicine*, 78:103978. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103978>.
- Aviv A (2021) Short telomeres and severe COVID-19: The connection conundrum. *EbioMedicine*. 70:103513.
- Benetos A, Lai T-P, Toupance S, Labat C, Verhulst S, Gautier S, Ungeheuer M-N, Perret-Guillaume Ch, Levy D, Susser E, Aviv A (2021) The Nexus Between Telomere Length and Lymphocyte Count in Seniors Hospitalized With COVID-19. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 76(8):e97–e101. <https://doi.org/10.1093/gerona/glab026>.
- Cawthon RM (2009) Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucl Acids Res* 37; 21.
- Dos Santos GA, Pimenta R, Viana NI, Guimarras VR, Romro P, Candido P, de Camargo JA, Hatanaka DM, Queiroz PG, Teruya A, Leite KRM, Srougi V, Srougi M, Reis ST. (2021) Shorter leukocyte telomere length is associated with severity of COVID-19 infection. *Biochem Biophys Res* 27: 101056. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101056>.
- Froidure A, Mahieu M, Hoton D, Laterre P-F, Yombi JC, Koenig S, Ghaye B, Defour J-P, Decottignies A (2020) Short telomeres increase the risk of severe COVID-19. *Aging* 12:19911–19922.
- Guescini M, Sisti D, Rocchi MB, Stocchi L, Stocchi V (2008) A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. *BMC Bioinformatics* 30(9): 326. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-326>.
- Horvath S, Levine AJ (2015) HIV-1 Infection accelerates age according to the epigenetic clock. *J Infect Dis* 212:1563–1573.
- Jiang L, Tang BS, Guo JF, Li JC (2022) Telomere Length and COVID-19 Outcomes: A Two-Sample Bidirectional Mendelian Randomization Study. *Front Genet* 23(13):805903. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.805903>.
- Kananen L, Nevalainen T, Jylhävä J, Marttila S, Hervonen A, Jylhä M, Hurme M (2015) Cytomegalovirus infection accelerates epigenetic aging. *Exp Gerontol* 72:227–229.
- Khalangot MD, Krasniakov DS, Vaiserman AM (2020) Telomere length in different metabolic categories: Clinical associations and modification potential. *Experimental Biol Med*. 245(13):1115–1121.
- Magaca-Acosta M, Valadez-Graham V (2020) Chromatin Remodelers in the 3D Nuclear Compartment. *Front Genet* 11:600615. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.600615>.
- Mongelli A, Barbi V, Zamperla MG et al (2021) Evidence for Biological Age Acceleration and Telomere Shortening in COVID-19 Survivors. *Int . Mo. Sc.* 22:6151. <https://doi.org/10.3390/ijms22116151>.
- Oronsky B, Larson C, Hammond TC, Oronsky A, Kesari S, Lybeck M, Reid TR (2021) A Review of Persistent Post-COVID Syndrome (PPCS). *Clin Rev Allergy Immunol* 20:1–9. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08848-3>.
- Ren LL, Wang YM, Wu ZQ et al (2020) Identification of novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chine Med J* 133(9): 1015–1024. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000722>.
- Sabry D, Ahmed R, Abdalla S, Fathy W, Eldemery A,

- Elamir A (2016) Braf, Kras and Helicobacter pylori epigenetic changes associated chronic gastritis in Egyptian patients with and without gastric cancer. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32:1–8.
- Sanchez-Vazquez R, Guío-Carriyn A, Zapatero-Gaviria A, Martínez P, Blasco MA (2021) Shorter telomere lengths in patients with severe COVID-19 disease. *Aging (Albany NY)*. 13(1):1–15. <https://doi.org/10.18632/aging.202463>.
- Tyagi M, Imam N, Verma K, Patel A.K. (2016) Chromatin remodelers: We are the drivers!! *Nucleus* 7(4):388–404. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1211217>.
- Velavan TP, Meyer CG (2020) The COVID-19 epidemic. *Tropical Medicine and International Health*. 25(3). <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>.
- Walitt B, Bartrum E (2021) A clinical primer for the expected and potential post-COVID-19 syndromes. *Pain Rep* 6:1–7.

Надійшла в редакцію 05.07.22
Після доопрацювання 13.07.22
Прийнята до друку 18.11.22