ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК [575:616.155.303]:[616.98:578.834.1]-06
https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-4-332-343

Поступила в редакцию 20.08.2026
Received 20.08.2026

А. С. Шафорост, Е. В. Воропаев, Н. В. Галиновская, А. А. Зятьков, О. В. Осипкина, А. А. Барбарович

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С СОСТОЯНИЕМ ПОСЛЕ COVID-19 НА ОСНОВЕ ДАННЫХ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Аннотация. По данным ВОЗ, вероятность развития осложнений после коронавирусной инфекции составляет 10–20 %. Состояние после COVID-19 снижает качество жизни пациентов, важную роль в его развитии играет изменение реактивности иммунной системы. Пилотное исследование транскриптома мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) пациентов с состоянием после COVID-19 с применением нанопорового секвенирования позволяет получить предварительные данные для характеристики функционального статуса МНК и выявления потенциальных мишеней для разработки новых эффективных средств персонализированной терапии данного заболевания.

В исследовании участвовали 5 пациентов с симптомами состояния после COVID-19 длительностью 3–6 месяцев. В качестве контроля использовали данные секвенирования транскриптома МНК 6 здоровых добровольцев. Секвенирование транскриптома производили на секвенаторе PromethION 2 Solo (ячейки FLO-PRO114M (R10.4.1), применяли набор для пробоподготовки Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24). Анализ дифференциальной экспрессии (ДЭ) генов осуществляли с помощью DESeq2. Для анализа обогащения в терминах генной онтологии (Gene Ontology, GO) использовали R-пакет clusterProfiler (4.14.6). Для определения семантического сходства терминов GO – REViGO, построение функциональных сетей в виде сети GO-терминов (биологические процессы) выполняли в CytoScape 3.10.4.

Выявлено 41 164 экспрессируемых гена, в том числе 5 309 генов имели значимо различающуюся экспрессию (log_2FoldChange > |1|, padj < 0,05); 2 102 гена ассоциированы с 163 биологическими процессами в терминах GO: 146 из них характеризовались снижением экспрессии генов, 17 – повышенной. Наблюдаются изменения, ассоциированные со снижением показателей, характерных для пролиферативной активности МНК, ослаблением интенсивности процессов, связанных с врожденным и адаптивным иммунитетом, и перестройкой метаболических процессов в сторону стабилизации состояния клеток на фоне активации биогенеза рибосом, окислительного фосфорилирования и подавления протеолиза.

Ключевые слова: состояние после COVID-19, транскриптом, мононуклеарные клетки периферической крови человека, нанопоровое секвенирование, дифференциальная экспрессия генов, биологический процесс, системный анализ

Для цитирования: Анализ транскриптома мононуклеарных клеток периферической крови у пациентов с состоянием после COVID-19 на основе данных нанопорового секвенирования / А. С. Шафорост, Е. В. Воропаев, Н. В. Галиновская [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2026. – Т. 71, № 4. – С. 332–343. https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-4-332-343

Alexander S. Shaforost, Evgenii V. Voropaev, Natallia V. Halinouskaya, Aliaksei A. Ziatskov, Olga V. Osipkina, Anastasia A. Barbarovich

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

PBMC TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN LONG COVID PATIENTS BASED ON NANOPORE SEQUENCING DATA

Abstract. According to the WHO, the risk of developing complications after SARS-CoV-2 infection is 10–20 %. Long COVID leads to a decrease in patients' quality of life, and changes in immune system reactivity play a significant role in this. This pilot study of the PBMC transcriptome in patients with long COVID using nanopore sequencing aims to provide preliminary data on the functional status of PBMC and identify potential targets for the development of new effective personalized therapies for this disease.

The transcriptome analysis protocol included RNA extraction (GeneJET RNA Purification Kit), DNA removal (DNase I), double-stranded cDNA synthesis (Mint kit-2), sequencing library preparation (SQK-NBD114.24), nanopore sequencing (PromethION 2 Solo, FLO-PRO114M (R10.4.1) cells), basecalling (Dorado), read quality assessment (nanoQC/FastQC), adapter trimming and length/quality filtering (Cutadapt (5.2)/seqkit(2.12.0)), and data preparation for differential gene expression assessment (minimap2 in map-ont mode, samtools (1.10.2), Picard tools (CollectRnaSeqMetrics), featureCounts (2.1.1), biomaRt

(2.62.1)), differential expression analysis (RStudio 2025.05.0 Build 418, DESeq2 (1.46.0), pheatmap (1.0.13), dplyr (1.1.4), RColorBrewer (1.1.-3), ggplot2 (3.5.2), ggrepel (0.9.6), apeglm (1.28.0) packages), GSEA-analysis (clusterProfiler (4.14.6), org.Hs.eg.db (3.20.0), enrichplot (1.26.6), DOSE (4.0.1), igraph (2.2.1)), semantic similarity of GO terms (biological process (BP) analysis (REViGO)), BP functional network creation (Cytoscape 3.10.4).

A pilot study of the peripheral blood leukocyte transcriptome in patients with long COVID using nanopore sequencing revealed significant differences in gene expression (n = 2,102) involved in 163 biological processes. Analysis of these changes in activity indicated a significant decrease in the overall functional activity of leukocytes, accompanied by a decrease in proliferative activity, weakening of innate and adaptive immunity, and a restructuring of metabolic processes toward cellular stabilization against the background of increased ribosome biogenesis, activation of oxidative phosphorylation and suppression of proteolysis.

Keywords: long COVID syndrome, transcriptome, human leukocytes, nanopore sequencing, differential gene expression, biological process, systemic analysis

For citation: Shaforost A. S., Voropaev E. V., Halinouskaya N. V., Ziatskov A. A., Osipkina O. V., Barbarovich A. A. PBMC transcriptome analysis in long COVID patients based on nanopore sequencing data. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2026, vol. 71, no. 4, pp. 332–343 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-4-332-343

Введение. Исследование триады «дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)−рибонуклеиновая кислота (РНК)–белок» («ДНК–РНК–белок») является важным элементом в понимании механизмов функционирования организма на клеточном и тканевом уровнях. Изучение транскриптома (набора последовательностей РНК (транскриптов)) позволяет оценивать динамические изменения экспрессии генов в ответ на воздействие различных факторов, в том числе инфекционных агентов, и тем самым раскрывает молекулярные механизмы развития и персистенции патологических состояний, что особенно важно при исследовании патогенеза воспалительных процессов, иммунного ответа и прогнозировании развития постинфекционных осложнений [1, 2].

Одной из первых технологий изучения транскриптома был серийный анализ экспрессии генов (SAGE), реализуемый секвенированием по Сэнгеру соединенных фрагментов случайных транскриптов [3]. Количество транскриптов оценивалось по числу совпадений с фрагментами известных генов. К концу XX в. методы SAGE и определение экспрессии генов с помощью микрочипов были наиболее распространенными [4].

Появление технологий секвенирования 2-го поколения (Next-generation sequencing, NGS) – 454 LifeSciences (2005), Illumina (2006), SOLiD (2008) и IonTorrent (2010) – привело к кратному увеличению объема получаемой при исследовании транскриптома информации [5], как количества анализируемых транскриптов, так и глубины покрытия, а также к существенному снижению стоимости секвенирования 1 образца. Описанные технологии позволяют секвенировать короткие фрагменты длинной от 50–300 нуклеотидов, чего достаточно для определения экспрессии генов и сборки транскриптов, однако не позволяют выявлять сложные изоформы, исследовать альтернативный сплайсинг и модификации РНК.

Использование технологий секвенирования 3-го поколения, в частности нанопорового секвенирования (НС) (Oxford Nanopore Technologies) [6], дает возможность исследовать структуру нативной РНК, увеличивает длину прочтения по сравнению с решениями 2-го поколения и позволяет снизить затраты на получение 1 Гб данных. В настоящее время исследование транскриптома с применением НС используется для исследования иммунного ответа, персонализации, диагностики и лечения новообразований [7], разработки методов терапии наследственных [8], неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний [9]. При инфекционных заболеваниях транскриптомный анализ позволяет выявлять молекулярные маркеры активации врожденного и адаптивного иммунитета, оценивать выраженность воспаления, а также определять патогенетические особенности хронического течения болезни.

Особый интерес в этом отношении представляет состояние после COVID-19 (long COVID), которое характеризуется длительно сохраняющимися клиническими симптомами и мультисистемными нарушениями. В связи с этим транскриптомный анализ является перспективным инструментом для изучения молекулярных механизмов данного состояния, поиска диагностических биомаркеров и определения потенциальных терапевтических мишеней. Для исследования транскриптома у пациентов с состоянием после COVID-19 метод НС используется несколько лет, в связи с чем количество опубликованных научных работ по данной теме незначительно.

Выполненное нами исследование транскриптома человека с использованием НС проведено в Республике Беларусь впервые.

Целью настоящего исследования является анализ транскриптомных профилей МНК у пациентов с состоянием после COVID-19 на основании данных НС.

Объекты и методы исследования. Дизайн исследования: пилотное, единовременное, поперечное, случай-контроль. Исследование проведено на базе кафедры неврологии и нейрохирургии с курсами медицинской реабилитации, ФПКиП, научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского университета в период с 2023 по 2025 г. Обследуемые заполняли информированное согласие на участие в исследовании, одобренное этическим комитетом университета (протокол № 1 от 03.01.2023).

Исследован биологический материал 5 пациентов (мужчины – 2 человека, женщины – 3) с состоянием после COVID-19, медиана возраста – 44 [44; 48] года. Включенным в исследование пациентам выполнялась оценка общесоматического и неврологического статуса, после чего они заполняли разработанный ранее чек-лист для объективизации диагноза состояния после COVID-19 [10]. Критерии включения в исследование: пациенты старше 18 лет, перенесшие подтвержденную инфекцию COVID-19 и имеющие проявления состояния после COVID-19. Критерии исключения: возраст до 18 и старше 65 лет; соматические заболевания в стадии декомпенсации; острый и подострый инфаркт миокарда; инсульт с неврологическим дефицитом или максимальным размером более 2 см; аневризма левого желудочка сердца или аорты; недостаточность кровообращения выше НIIА; выраженные нарушения сердечного ритма и проводимости; атеросклероз сосудов нижних конечностей с декомпенсацией; тромбоэмболия легочных артерий; демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы; заболевания, сопровождающиеся выраженным когнитивным дефицитом, диагностированные до перенесенной инфекции COVID-19; детский церебральный паралич; деменция; тяжелая депрессия; обсессивно-компульсивное, диссоциативно-конверсионное расстройство; шизофрения; биполярное расстройство; последствия черепно-мозговой травмы, инфекционных повреждений головного мозга.

При опросе пациенты предъявляли жалобы преимущественно на нарушение внимания, сна, памяти, туман в голове. Длительность жалоб на момент взятия крови составляла от 3 до 6 месяцев. Из сопутствующих заболеваний у пациентов имела место артериальная гипертензия I степени. Средний балл чек-листа составил 10 баллов, что соответствовало выраженной степени нарушений.

Выделение МНК из цельной крови производили с использованием градиентной среды для выделения лимфоцитов Lymphosep (Biowest). Экстракцию общей РНК выполняли с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию и качество РНК измеряли на флюориметре Qubit4 при помощи набора Qubit™ RNA Broad Range Assay Kit и спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Для удаления ДНК из образцов общей РНК использовали ДНКазу I (набор DNase I RNase-free (Thermo Fisher Scientific)). Для синтеза дц кДНК, необходимой при пробоподготовки к НС, применяли набор Mint kit-2 (Евроген, Россия), для синтеза первой цепи кДНК – адаптеры PlugOligo-3M и CDS-4M. Очистка дц кДНК выполнена с помощью набора Illumina Beads (Illumina, США). Концентрацию дц кДНК измеряли на флюориметре Qubit4 с использованием набора Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit. Пробоподготовку образцов дц кДНК для НС выполняли согласно протоколу Ligation sequencing amplicons 2025 – Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24).

НС транскриптома МНК периферической крови 5 пациентов с симптомами состояния после COVID-19 выполняли на секвенаторе PromethION 2 Solo (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания) с использованием ячеек FLO-PRO114M (R10.4.1).

В качестве группы сравнения (контроль) были взяты данные секвенирования (файлы в формате FASTQ.gz) транскриптома здоровых добровольцев (мужчины – 3 человека, женщины – 3; номера образцов в NCBI – SRR33963238, SRR33963237, SRR33963236, SRR33963235, SRR33963234, SRR33963233). Участники контрольной группы (средний возраст 31,7 ± 3,1 года) не имели сопутствующих заболеваний. Процедура пробоподготовки и секвенирования образцов для исследования транскриптома выполнялась с применением технологий, схожих с используемыми нами, включая набор для получения библиотек для НС (SQK-NBD114.96), прибор PromethION 2 Solo (Oxford Nanopore Technologies), ячейки FLO-PRO114M.

В качестве референсного генома использовали GRCh38.p14_GENCODE_version 48 (дата выпуска – май 2025 г.). Для биоинформатического анализа данных экспериментальной и контрольной групп применяли программное обеспечение (ПО), указанное в таблице.

ПО для обработки данных секвенирования транскриптома

Software for transcriptome sequencing data processing

Функция ПО	Название ПО (версия)
Бейсколлинг	Dorado
Удаление адаптеров	Cutadapt (5.2)
Оценка качества прочтений	FastQC (0.12.1) / nanoQC
Фильтрация прочтений по длине и качеству	Seqkit (2.12.0)
Выравнивание прочтений на референсный геном человека	minimap2 в режиме map-ont
Фильтрация прочтений, выровненных на референсный геном, и их сортировка	samtools (1.10.2)
Оценка качества выравнивания	Picard tools (CollectRnaSeqMetrics)
Подсчет количества прочтений на транскрипт	featureCounts (2.1.1)
Превращение номеров транскриптов из формата Ensembl ID в Gene symbols	biomaRt (2.62.1)
Расчет дифференциальной экспрессии (ДЭ) генов и визуализация результатов	RStudio 2025.05.0 Build 418, пакеты DESeq2 (1.46.0), pheatmap (1.0.13), dplyr (1.1.4), RColorBrewer (1.1.-3), ggplot2 (3.5.2), ggrepel (0.9.6), apeglm (1.28.0)
Анализ обогащения дифференциально экспрессирующихся генов по функциональной принадлежности	clusterProfiler (4.14.6)

Удаление адаптеров и удаление прочтений короче 200 нуклеотидов и с качеством меньше Q10 позволило снизить уровень шума и повысить качество анализа. Для выравнивания прочтений, полученных с помощью НС, на референсный геном человека использовали ПО minimap2, в качестве альтернативы которому можно применять STAR, GraphMap2. Контроль качества выравнивания осуществляли с использованием команды CollectRnaSeqMetrics утилиты Picard, которая позволяет оценить долю рРНК и мРНК в полученных образцах. Для подсчета количества прочтений на транскрипт использовали featureCounts, однако можно применять NanoCount, StringTie2 и TALON. Оценку ДЭ проводили по генам. Для этого конвертировали данные с преобразованием имен транскриптов в названия соответствующих им генов с помощью пакета biomaRt в RStudio 2025.05.0 Build 418. Анализ ДЭ выполняли с помощью пакета DESeq2: используемая статистическая модель ДЭ основана на отрицательном биномиальном распределении, нормализация количества прочтений между образцами – на расчете медианного отношения геометрического среднего для каждого образца, фактором сравнения являлось наличие или отсутствие состояния после COVID-19.

Для дальнейшего анализа ДЭ использовали гены, для которых различия в величине экспрессии были значимы (padj < 0,05) и отличались более чем в 2 раза (log2FoldChange > 1).

Для функциональной интерпретации дифференциально экспрессирующихся генов проводили анализ обогащения по функциональной принадлежности (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) с использованием пакета clusterProfiler (4.14.6). Для анализа семантического сходства терминов генной онтологии (Gene Ontology, GO) использовали REViGO, после чего формировали функциональные сети и визуализировали их в виде ген–GO-сети и сети GO-терминов в CytoScape 3.10.4.

Результаты и их обсуждение. В ходе анализа полученных данных выявлено 41 164 экспрессируемых гена, из них 5 309 генов имели значимо различающуюся экспрессию в сравниваемых группах (log2FoldChange > |1|, padj < 0,05) и 2 102 – были соотнесены с биологическими процессами в терминах генной онтологии GO.

Для визуализации различий в величине ДЭ 100 наиболее значимо отличающихся генов между контрольной и экспериментальной группами выполнена кластеризация, результаты которой представлены в виде тепловой карты на рис. 1.

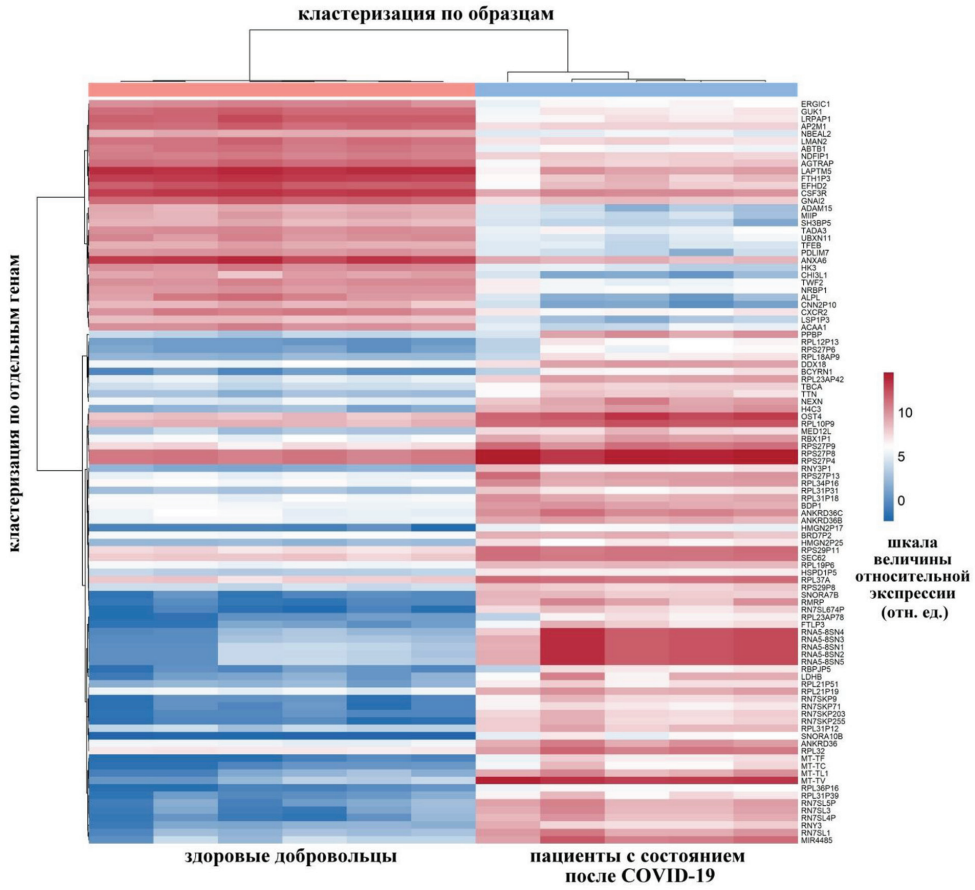


Рис. 1. Кластеризация образцов здоровых добровольцев и пациентов с состоянием после COVID-19 по величине ДЭ 100 наиболее значимо различающихся генов

Fig. 1. Clustering of samples of control group and group of long COVID patients by expression of 100 significantly different genes

Обзорный рис. 1 отображает степень различия в величине экспрессии 100 выбранных генов как между отдельными образцами, так и между двумя рассматриваемыми группами. Для контрольной и экспериментальной групп характерны незначительные различия между образцами, что приводит к образованию визуально различимых паттернов. В частности, для большинства из 100 рассматриваемых генов характерно увеличение экспрессии в МНК периферической крови пациентов с состоянием после COVID-19 по сравнению с контрольной группой. Более детальный анализ различий в экспрессии 100 наиболее значимо различающихся генов у пациентов с состоянием после COVID-19 представлен на рис. 2.

На рис. 2 гены сгруппированы в соответствии с величиной изменения их экспрессии, что отражает показатель log2 FoldChange (0 – отсутствие различий, 2 – увеличение в 4 (22) раза, –2 – уменьшение в 4 раза), и значимости выявленных различий (модуль десятичного логарифма скорректированного значения показателя уровня значимости (p-adjusted)).

Из 100 наиболее отличающихся генов между группами 44 гена ответственны за кодирование белков, включая ферменты гуанилаткиназу, металлопротеиназу, щелочную фосфатазу и лактатдегидрогеназу; 4 гена кодируют митохондриальные транспортные РНК для транспортировки валина, лейцина, фенилаланина и цистеина, 13 – малые некодирующие РНК; 39 генов представляют собой псевдогены. Следует отметить, что гены могут иметь несколько выполняемых функций.

Информация о функциях отдельных генов позволяет объединить их в группы на основе сходства выполняемых функций, что повышает качество анализа данных.

Установлено значимое снижение ДЭ у пациентов с состоянием после COVID-19 (log2FoldChange – от –3,41 до –10,79, log10(p-adjusted) – от –9,2 до –13,3) для 31 гена, из них

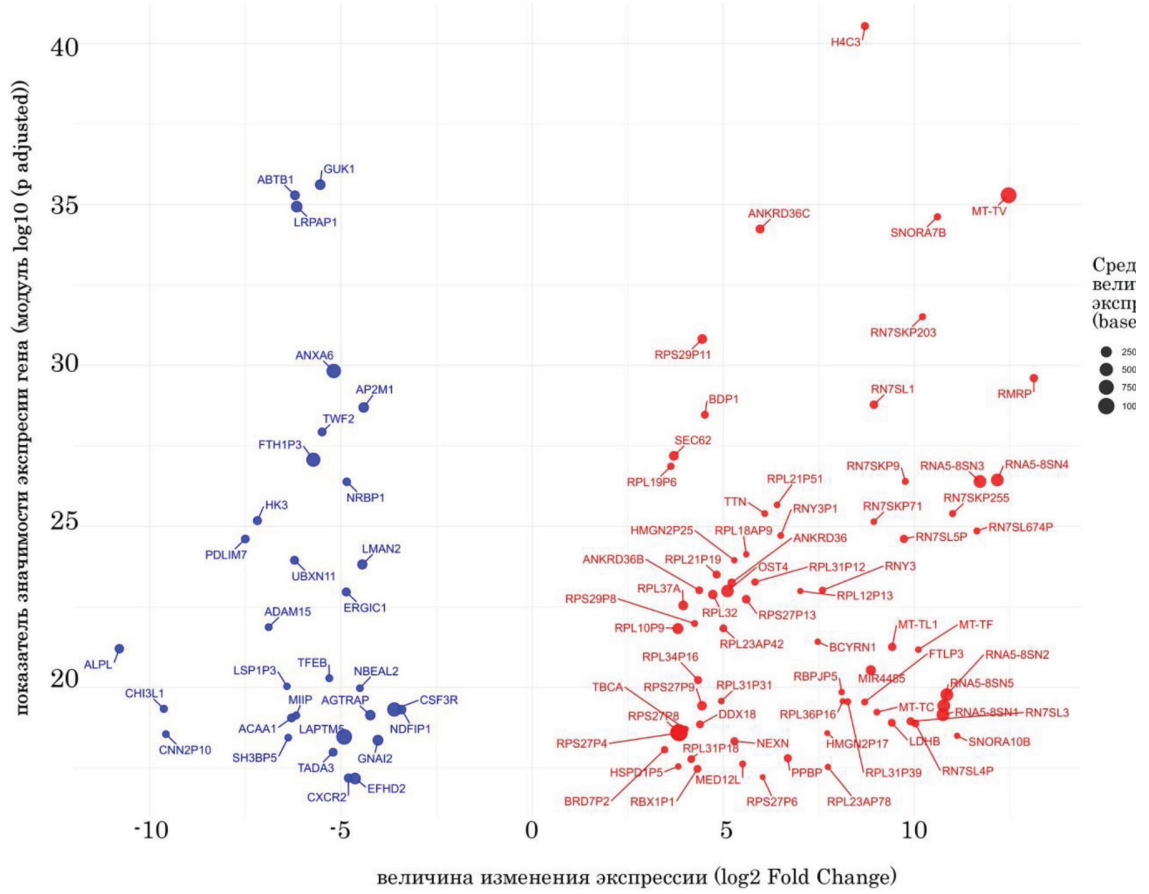


Рис. 2. Визуализация ДЭ 100 значимо различающихся генов у пациентов с состоянием после COVID-19: точки слева – гены со сниженной экспрессией, точки справа – гены с повышенной экспрессией; размер точек пропорционален базовому уровню экспрессии гена (baseMean)

Fig. 2. Visualization of differential expression of 100 significantly different genes in long COVID patients: points (left) – genes with decreased expression, points (right) – genes with increased expression; the size of the dots is proportional to the baseline gene expression level (baseMean)

28 относят к генам, кодирующим белки, которые связаны с внутриклеточным транспортом, эндоцитозом, фагоцитозом (*AP2M1*, *LAPTM5*, *LMAN2*, *LRPAP1*, *TFEB*, *ERGIC1*, *NRBP1*, *ANXA6*), адгезией, миграцией и хемотаксисом лейкоцитов (*ADAM15*, *CSF3R*, *CXCR2*, *PDLIM7*, *MIIP*, *EFHD2*), автофагией и протеолизом (*LAPTM5*, *GNAI2*, *NDFIP1, TFEB*, *UBXN11*, *TWF2*), иммунным ответом, пролиферацией и активацией лейкоцитов (*LAPTM5*, *NDFIP1*, *ABTB1*, *CHI3L1*), метаболизмом нуклеотидов, и жирных кислот (*GUK1*, *ACAA1*, *HK3*), метаболизмом белков (*LAPTM5*, *SH3BP5*, *TADA3*, *TWF2*, *NDFIP1*, *NBEAL2*) и индуцированным холодом термогенезом (*ALPL*).

Повышенный уровень ДЭ (log2FoldChange – от 3,47 до 13,12, log10(p-adjusted) – от 9,2 до 14,2) отмечен для 69 генов из 100: 16 генов кодируют белки, участвующие в метаболизме белков (*RPL32*, *RPL37A*, *BDP1*, *H4C3*, *TTN*, *DDX18*, *SEC62*, *TBCA*, *OST4*), сборке рибосом (*DDX18*), метаболизме нуклеотидов (*LDHB*), миграции и хемотаксисе лейкоцитов (*PPBP*, *NEXN*), транскрипционной коактивации генов (*MED12L*) и ингибировании активности ионных каналов (*ANKRD36*, *ANKRD36B*, *ANKRD36C*).

Помимо этого отмечается снижение уровня ДЭ псевдогенов *FTH1P3*, *CNN2P10*, *LSP1P3* и ее повышение для митохондриальных тРНК (*MT-TV*, *MT-TL1*, *MT-TF*, *MT-TC*), 13 генов малых некодирующих РНК (*SNORA7B*, *SNORA10B*, *RMRP*, *RN7SL1*, *RN7SL3*, *RNA5-8SN1*, *RNA5-8SN2*, *RNA5-8SN3*, *RNA5-8SN4*, *RNA5-8SN5, RNY3*, *BCYRN1*, *MIR4485*) и 36 псевдогенов (*RN7SKP203*, *RN7SKP9*, *RN7SKP255*, *RN7SKP71*, *RN7SL674P*, *RN7SL4P*, *RN7SL5P*, *RNY3P1*, *RPS29P11*, *RPS29P8*, *RPL19P6*, *RPL21P51*, *RPL21P19*, *RPL31P12*, *RPL31P18*, *RPL31P31*, *RPL31P39*, *RPL12P13*, *RPS27P13*, *RPS27P9*,

RPS27P8, *RPS27P6*, *RPS27P4*, *RPL23AP42*, *RPL23AP78*, *RPL10P9*, *RPL18AP9*, *RPL34P16*, *RPL36P16*, *FTLP3*, *HMGN2P25*, *HMGN2P17*, *BRD7P2*, *HSPD1P5*, *RBX1P1*, *RBPJP5*).

Следует отметить, что полученные значения величины изменения экспрессии (log2FoldChange) для рассматриваемых генов не связаны с наличием экстремально высокого или низкого числа прочтений для одного из образцов в экспериментальной или контрольной группах.

Анализ ДЭ генов с последующей группировкой в соответствии с их функциями позволяет определить общее направление изменения активности выявленных функций рассматриваемых генов, что особенно актуально при относительно невысоком количестве дифференциально экспрессирующихся генов, что возможно в случае низкого выхода данных при секвенировании транскриптома или анализе данных экспрессии относительно небольшого числа генов.

При работе с большим количеством дифференциально экспрессирующихся генов, имеющих различные функции, описанный выше подход перестает работать вследствие увеличения числа параметров для анализа, что требует упрощения структуры анализируемых данных в соответствии с участием отдельных генов в выполнении биологических процессов (БП).

Использование пакета clusterProfiler позволяет провести анализ обогащения дифференциально экспрессирующихся генов по функциональной принадлежности (GSEA-анализ), что дает возможность оценить направление изменения активности процессов в рассматриваемых клетках. Общее направление изменения активности БП определяли как отношение количества генов с повышенной ДЭ к количеству генов со сниженной ДЭ: результат >1 трактовали как активацию БП, а <1 – как снижение активности БП. В результате установлено участие 2 102 из 5 309 дифференциально экспрессирующихся генов в 163 БП в терминах Gene Ontology: из них 146 процессов характеризуются сниженной ДЭ генов, а 17 – повышенной ДЭ генов. Выявленные в результате GSEA-анализа БП содержат от 7 до 147 генов (60,14 ± 2,56 гена/процесс). Визуализация результатов GSEA-анализа для БП, содержащих более 70 генов, представлена на рис. 3.

Среди 65 БП, отображенных на рис. 3, у 61 наблюдается снижение ДЭ генов, что подтверждает угнетение выявленных БП у пациентов с состоянием после COVID-19. Для более детального анализа выполнена группировка БП с помощью онлайн-ресурса REViGO, полученные данные были использованы для создания функциональной сети БП в CytoScape (рис. 4).

Представленная на рис. 4 сеть позволяет выделить 12 групп БП, связанных с энергетическим обменом, врожденным и адаптивным иммунитетом, автофагией, протеолизом, апоптозом, вирусными процессами (включая проникновение вирусов в клетки и репликацию вирусов), биосинтезом нуклеотидов, репарацией повреждений ДНК, модификацией РНК, процессингом РНК и сборкой рибосом, регуляцией сборки, модификации и стабильности белков, а также регуляцией локализации белков и органелл.

К группам БП, связанным с процессингом РНК и сборкой рибосом (4 БП), производством энергии (4 БП) и регуляцией протеолиза (3 БП), принадлежали 11 из 17 БП с повышенной ДЭ генов, оставшиеся БП ассоциированы с процессами трансляции в цитоплазме (GO:0002181), транспортом белков в ядро (GO:0006607), формированием ДНК-белковых комплексов (GO:0071824) и нуклеосом (GO:0034728), и расслаблением сердечной мускулатуры (GO:0055119).

Анализируя изменение активности метаболических и энергетических процессов, можно сделать вывод об их десинхронизации: МНК исследуемых пациентов с состоянием после COVID-19 потенциально могут производить больше обычного энергии (за счет активации окислительного фосфорилирования в митохондриях), активно формировать рибосомы и синтезировать белок на фоне снижения активности процессов протеолиза. Аналогичное повышение активности процессов биогенеза рибосом и окислительного фосфорилирования в транскриптоме МНК обнаружено у пациентов с состоянием после COVID-19 и интерстициальной болезнью лёгких [11]. Изменение активности биогенеза рибосом оказывает влияние на процесс врожденного иммунного ответа на вирусные инфекции, в частности увеличение количества активно работающих рибосом может способствовать ускорению синтеза интерферона и дальнейшему образованию антител.

Наблюдаемое снижение биосинтеза нуклеотидов, пролиферативной активности клеток, репарации повреждений ДНК и активации апоптоза может указывать на возможную связь с замедлением клеточного цикла и потенциальным переходом клеток в дифференцированное

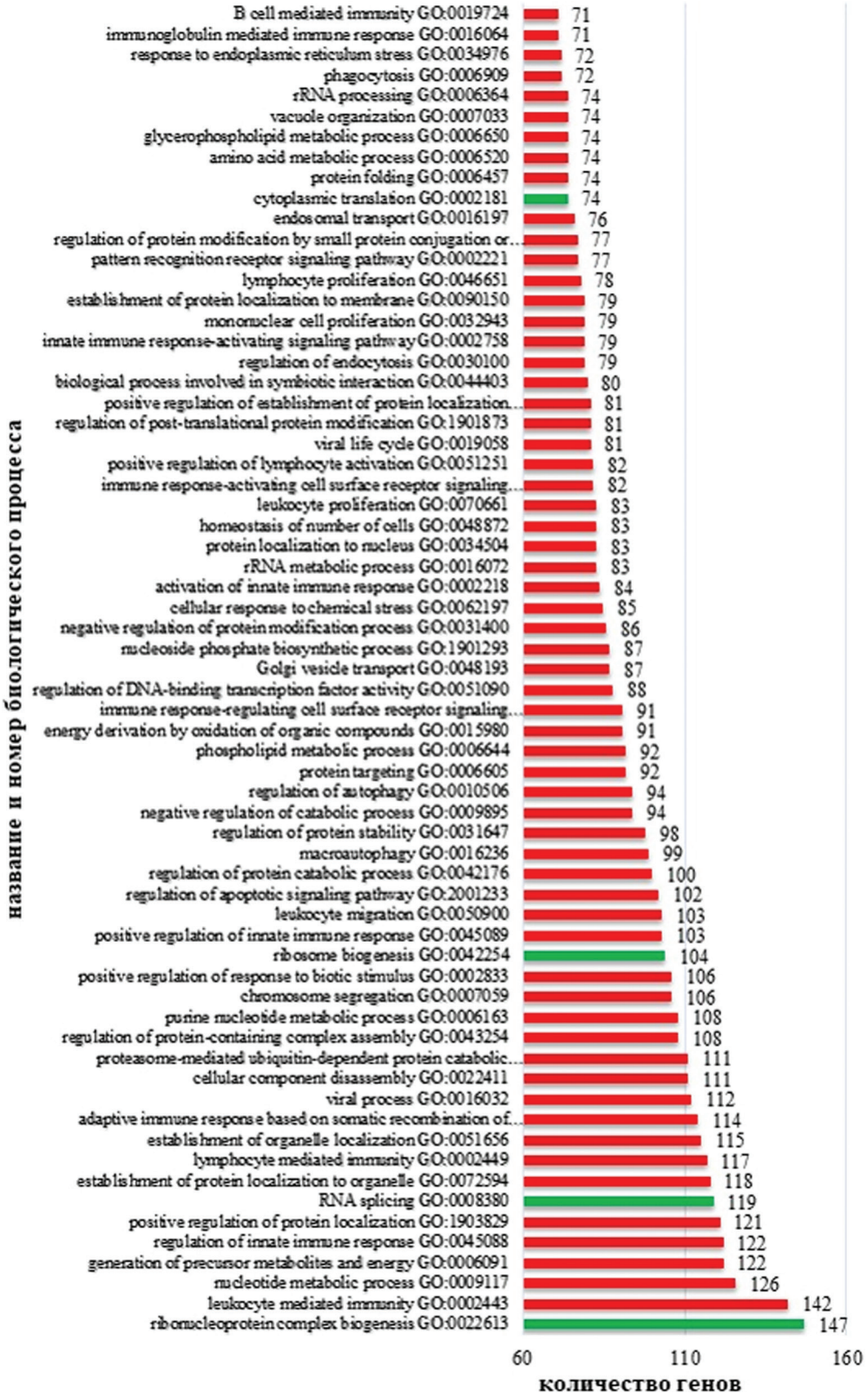


Рис. 3. Характеристика БП, содержащих более 70 генов (n = 65), по результатам GSEA-анализа: красным цветом (светлым тоном) выделены БП со сниженной ДЭ генов, зеленым (темным тоном) – БП с повышенной ДЭ генов. Подписи по оси ординат представлены в виде имени и номера БП в терминах Gene Ontology

Fig. 3. Characterization of biological processes (BPs) containing more than 70 genes (n = 65) based on GSEA analysis: BPs with reduced gene expression are highlighted in red (light tone), BPs with increased gene expression are highlighted in green (dark tone). The ordinate axis labels are the BP name and number in Gene Ontology terms

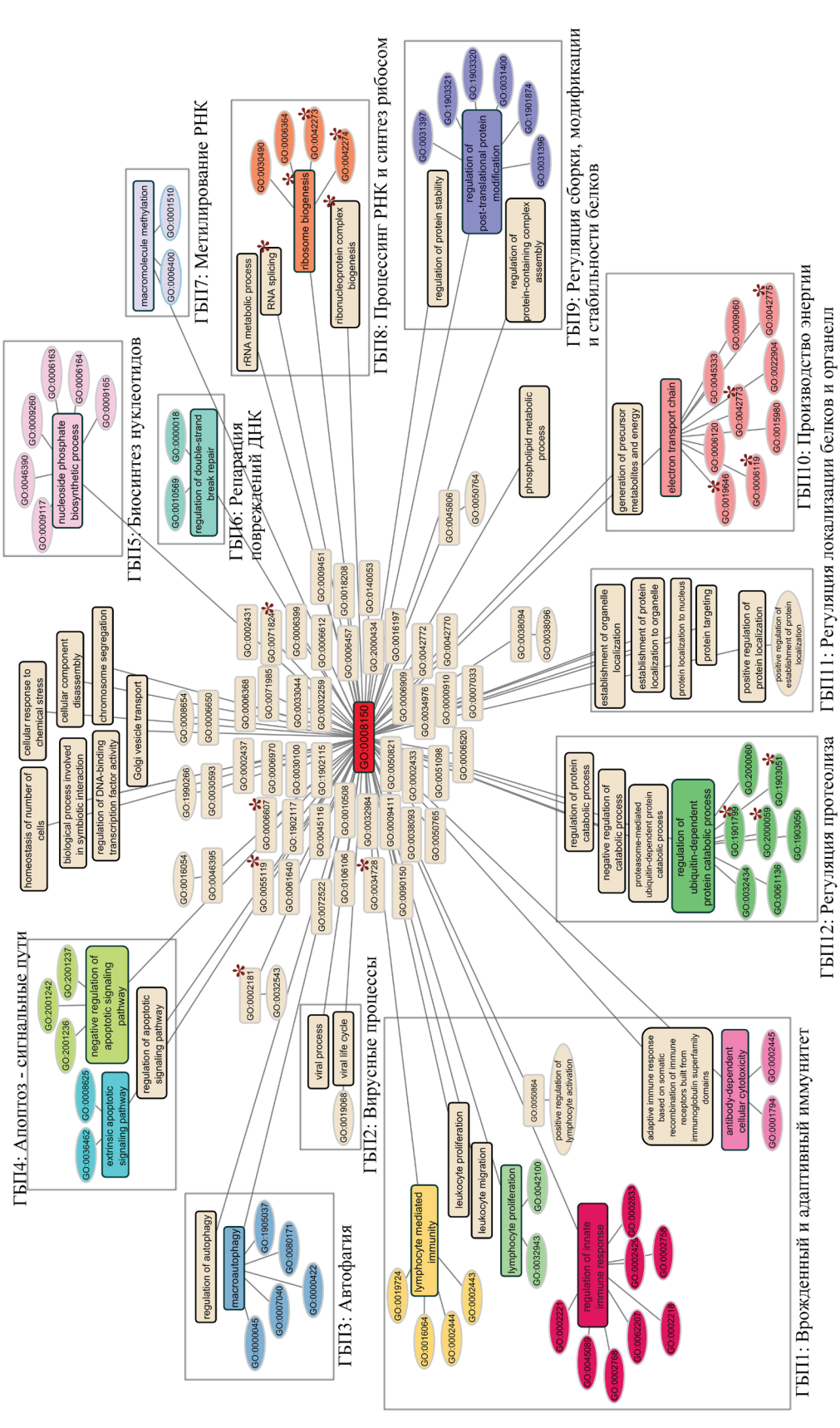


Рис. 4. Основные группы БП, содержащих дифференциально экспрессирующиеся гены у пациентов с состоянием после COVID-19 (прямоугольник – материнские (группирующие) и одиночные БП; овал – дочерние БП; центральный узел –базовый процесс GO:0008150 и БП, имеющие 2 и более дочерних БП; названия указаны для материнских БП и БП с числом участвующих генов более 80; * – БП с повышенной ДЭ генов)

Fig. 4. Major groups of BPs containing differentially expressed genes in patients with long COVID (rectangle – parent (grouping) and single BPs; oval – daughter BPs; central node – indicates the core process GO:0008150 and BPs with two or more daughter BPs; names are given for parent BPs and BPs with more than 80 involved genes; * – BPs with increased differential gene expression)

состояние и увеличением количества клеток с накопившимися повреждениями ДНК, возникшими в результате развития состояния после COVID-19. Снижение активности деления клеток было подтверждено для моноцитов при исследовании транскриптома МНК методом секвенирования РНК отдельных клеток у 44 пациентов с состоянием после COVID-19 вместе со снижением экспрессии генов, связанных с воспалением, активностью инфламмасомы на фоне активации синтеза АТФ (аденозинтрифосфата) [12]. У пациентов с состоянием после COVID-19 также отмечено изменение экспрессии генов, ассоциированных с продукцией интерферона [13], клеточным циклом, иммунной дисрегуляцией и модификациями гистонов [14].

Также следует отметить снижение активности БП, связанных с врожденным и адаптивным иммунитетом, включая сигнальные пути, ассоциированные с протеканием воспалительных процессов. Однако часть генов, участвующих в PRR- и FcR-воспалительных путях (*TLR2*, *FCGR1BP*, *FCER1G*, *HMGB1*), имеет повышенный уровень ДЭ у пациентов с состоянием после COVID-19, что может указывать на наличие хронических воспалительных процессов в части клеток исследуемой популяции. В работе S. Fineschi et al. отмечено повышение экспрессии генов, участвующих в JAK-STAT- и IL9-сигнальных путях связанных с воспалительными процессами, а также снижение активности процессов протеолиза, вирус-ассоциированных процессов [15].

Таким образом, в результате анализа БП подтверждается сделанный на основании анализа изменения ДЭ 100 генов вывод о снижении функциональной активности МНК пациентов с состоянием после COVID-19.

Проведенное исследование является примером системного подхода к анализу результатов и позволяет на основе данных о ДЭ генов оценить характер изменения экспрессии отдельных генов и их комплексов, определить перечень и направление протекания БП в МНК периферической крови пациентов с состоянием после COVID-19, однако связь выявленных изменений с индивидуальными клиническими проявлениями исследуемой патологии требует дальнейшего системного анализа на более высоком уровне.

Заключение. В ходе пилотного исследования транскриптома МНК периферической крови пациентов с состоянием после COVID-19, проведенного впервые в Республике Беларусь методом НС, были выявлены особенности экспрессии генов (n = 2 102), участвующих в 163 биологических процессах. В исследуемой когорте прослеживаются тенденции к изменению функционального статуса МНК, которые могут свидетельствовать о потенциальном снижении пролиферативной активности и интенсивности процессов врожденного и адаптивного иммунитета, а также о возможных метаболических сдвигах в сторону активации биогенеза рибосом, окислительного фосфорилирования и подавления протеолиза.

В связи с малым объемом выборки полученные результаты следует рассматривать как предварительные. Выявленные паттерны экспрессии не могут служить окончательным доказательством конкретных молекулярных механизмов заболевания, однако они открывают направления для дальнейших крупномасштабных исследований, направленных на поиск диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней при состоянии после COVID-19.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Molecular and biological characterization of messenger RNA / F. Gros, W. Gilbert, H. H. Hiatt [et al.] // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. – 1961. – Vol. 26. – P. 111–132. https://doi.org/10.1101/sqb.1961.026.01.016

2. McGettigan, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era / P. A. McGettigan // Current Opinion in Chemical Biology. – 2013. – Vol. 17, N 1. – P. 4–11. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.008

3. Serial Analysis of Gene Expression / V. E. Velculescu, L. Zhang, B. Vogelstein, K. Kinzler // Science. – 1995. – Vol. 270, N 5235. – P. 484–487. https://doi.org/10.1126/science.270.5235.484

4. Niemitz, E. The microarray revolution / E. Niemitz // Nature Reviews Genetics. – 2007. – Vol. 8, Suppl. 1. – P. S15. https://doi.org/10.1038/nrg2259

5. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems / L. Liu, Y. Li, S. Li [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2012. – Vol. 2012. – Art. 251364. https://doi.org/10.1155/2012/251364

6. Long-read RNA sequencing: A transformative technology for exploring transcriptome complexity in human diseases / I. H. Ament, N. DeBruyne, F. Wang, L. Lin // Molecular Therapy. – 2025. – Vol. 33, N 3. – P. 883–894. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.11.025

7. A transcriptomics approach to expand therapeutic options and optimize clinical trials in oncology / V. Lazar, B. Zhang, S. Magidi [et al.] // Therapeutic Advances in Medical Oncology. – 2023. – Vol. 15. – Art. 17588359231156382. https://doi.org/10.1177/17588359231156382

8. Clinical applications of and molecular insights from RNA sequencing in a rare disease cohort / J. C. Stark, N. Pipko, Y. Liang [et al.] // Genome Medicine. – 2025. – Vol. 17, N 1. – Art. 72. https://doi.org/10.1186/s13073–025–01494–w

9. Personalized medicine for rare neurogenetic disorders: can we make it happen? / A. M. van Eeghen, H. Bruining, N. I. Wolf [et al.] // Cold Spring Harbor molecular case studies. – 2022. – Vol. 8, N 2. – Art. a006200. https://doi.org/10.1101/mcs.a006200

10. Спектр нейропсихологических нарушений у пациентов с постковидным синдромом / Н. В. Галиновская, И. О. Стома, Е. В. Воропаев [и др.] // Неврология и Нейрохирургия. Восточная Европа. – 2024. – Т. 14, № 3. – С. 323–334.

11. Transcriptomic Profiling of Long COVID-19 in Patients with Interstitial Lung Disease Reveals Dysregulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation / K. A. Aracena, G. C. Nwankwo, C. T. Lee [et al.] // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. – 2025. – Vol. 73, N 4. – P. 634–637. https://doi.org/10.1165/rcmb.2024-0595le

12. Transcriptome analysis of classical blood cells reveals downregulation of pro-inflammatory genes in the classical monocytes of long COVID patients / F. Fricke, F. Mai, C. Wossidlo [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2025. – Vol. 16. – Art. 1710783. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1710783

13. Bulk RNA sequencing for analysis of post COVID-19 condition in adolescents and young adults / S. L. Sommen, Z. Zhao, S. Segtnan [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2024. – Vol. 22, N 1. – Art. 312. https://doi.org/10.1186/s12967-024-05117-7

14. Towards understanding post-COVID-19 condition: A systematic meta-analysis of transcriptomic alterations with sex-specific insights / E. C. Rusu, P. Monfor-Lanzas, L. Bertran [et al.] // Computers in Biology and Medicine. – 2024. – Vol. 175. – Art. 108507. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.108507

15. Comprehensive transcriptome assessment in PBMCs of post-COVID patients at a median follow-up of 28 months after a mild COVID infection reveals upregulation of JAK/STAT signaling and a prolonged immune response / S. Fineschi, J. Klar, J. R. Lopez Egido [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2025. – Vol. 16. – Art. 1589589. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1589589

References

1. Gros F., Gilbert W., Hiatt H. H., Attardi G., Spahr P. F., Watson J. D. Molecular and biological characterization of messenger RNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1961, vol. 26, pp. 111–132. https://doi.org/10.1101/sqb.1961.026.01.016

2. McGettigan P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, vol. 17, no. 1, pp. 4–11. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.008

3. Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K. W. Serial Analysis of Gene Expression. *Science*, 1995, vol. 270, no. 5235, pp. 484–487. https://doi.org/10.1126/science.270.5235.484

4. Niemitz E. The microarray revolution. *Nature Reviews Genetics*, 2007, vol. 8, suppl. 1, p. S15. https://doi.org/10.1038/nrg2259

5. Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, vol. 2012, art. 251364. https://doi.org/10.1155/2012/251364

6. Ament I. H., DeBruyne N., Wang F., Lin L. Long-read RNA sequencing: A transformative technology for exploring transcriptome complexity in human diseases. *Molecular Therapy*, 2025, vol. 33, no. 3, pp. 883–894. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.11.025

7. Lazar V., Zhang B., Magidi S., Le Tourneau C., Raymond E., Ducreux M. [et al.]. A transcriptomics approach to expand therapeutic options and optimize clinical trials in oncology. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2023, vol. 15, art. 17588359231156382. https://doi.org/10.1177/17588359231156382

8. Stark J. C., Pipko N., Liang Y., Szuto A., Tsoi C. T., Dickson M. A. [et al.]. Clinical applications of and molecular insights from RNA sequencing in a rare disease cohort. *Genome Medicine*, 2025, vol. 17, no. 1, art. 72. https://doi.org/10.1186/s13073–025–01494–w

9. van Eeghen A. M., Bruining H., Wolf N. I., Bergen A. A., Houtkooper R. H., van Haelst M. M., van Karnebeek C. D. Personalized medicine for rare neurogenetic disorders: can we make it happen? *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, 2022, vol. 8, no. 2, art. a006200. https://doi.org/10.1101/mcs.a006200

10. Galinovskaya N. V., Stoma I. O., Voropaev E. V., Barbarovich A. A., Bobovich N. V., Osipkina O. V. Spectrum of Neuropsychological Abnormalities in Patients with Post-COVID Syndrome. *Nevrologiya i neirokhirurgiya. Vostochnaya Evropa = Neurology and Neurosurgery Eastern Europe*, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 323–334 (in Russian).

11. Aracena K. A., Nwankwo G. C., Lee C. T., Karnik R., Ventura I., Douglas D., Udofia I., Chen M., Chelala L., Im H. K., Strek M. E. Transcriptomic Profiling of Long COVID-19 in Patients with Interstitial Lung Disease Reveals Dysregulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2025, vol. 73, no. 4, pp. 634–637. https://doi.org/10.1165/rcmb.2024–0595LE

12. Fricke F., Mai F., Wossidlo C., Steinbeck F., Bergmann-Ewert W., Kordt M., Kraft K., Műller B., Reisinger E. C., Műller-Hilke B. Transcriptome analysis of classical blood cells reveals downregulation of pro-inflammatory genes in the classical monocytes of long COVID patients. *Frontiers in Immunology*, 2025, vol. 16, art. 1710783. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1710783

13. Sommen S. L., Zhao Z., Segtnan S., Stiansen-Sonerud T., Selvakumar J., Beier Havdal L., Gjerstad J., Wyller V. B. B., Lund Berven L. Bulk RNA sequencing for analysis of post COVID–19 condition in adolescents and young adults. *Journal of Translational Medicine*, 2024, vol. 22, no. 1, art. 312. https://doi.org/10.1186/s12967-024-05117-7

14. Rusu E. C., Monfor-Lanzas P., Bertran L., Barrientos-Riosalido A., Solé E., Mahmoudian R., Aguilar C., Briansó S., Mohamed F., Garcia S., Camaron J., Auguet T. Towards understanding post-COVID-19 condition: A systematic meta-analysis of transcriptomic alterations with sex-specific insights. *Computers in Biology and Medicine*, 2024, vol. 175, art. 108507. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2024.108507

15. Fineschi S., Klar J., Lopez Egido J. R., Schuster J., Bergquist J., Kaden R., Dahl N. Comprehensive transcriptome assessment in PBMCs of post-COVID patients at a median follow-up of 28 months after a mild COVID infection reveals up-regulation of JAK/STAT signaling and a prolonged immune response. *Frontiers in Immunology*, 2025, vol. 16, art. 1589589. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1589589

Информация об авторах

Шафорост Александр Сергеевич – ст. науч. сотрудник. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: asofocl@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-6725-5353

Воропаев Евгений Викторович – канд. мед. наук, доцент, проректор по научной работе. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: voropaev.evgenii@gmail.com. https://orcid.org/0000-0002-9435-6109

Галиновская Наталья Викторовна – д-р мед. наук, профессор, декан. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: halinouskaya@gsmu.by. https://orcid.org/0000-0002-1706-0144

Зятьков Алексей Александрович – ст. науч. сотрудник. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: ziatskovaa@gmail.com. https://orcid.org/0000-0001-9542-3791

Осипкина Ольга Викторовна – заведующий лабораторией. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: olga.osipkina@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-1931-4224

Барбарович Анастасия Александровна – ассистент кафедры. Гомельский государственный медицинский университет (ул. Ланге, 5, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: Feniks-1342@mail.ru. https://orcid.org/0000-0003-4360-4341

Information about the authors

Alexander S. Shaforost – Senior Researcher. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: asofocl@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-6725-5353

Evgenii V. Voropaev – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Vice-Rector for Research. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: voropaev.evgenii@gmail.com. https://orcid.org/0000-0002-9435-6109

Natallia V. Halinouskaya – D. Sc. (Med.), Professor, Dean. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: halinouskaya@gsmu.by. https://orcid.org/0000-0002-1706-0144

Aliaksei A. Ziatskov – Senior Researcher. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: ziatskovaa@gmail.com. https://orcid.org/0000-0001-9542-3791

Olga V. Osipkina – Head of the Laboratory. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: olga.osipkina@mail.ru. https://orcid.org/0000-0002-1931-4224

Anastasia A. Barbarovich – Assistant at the Department. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: Feniks-1342@mail.ru. https://orcid.org/0000-0003-4360-4341