

ИЗМЕНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ ПЛУВИННОЙ КРОВИ И АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ ОТ МАТЕРЕЙ С COVID-19

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

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

Новорожденные от матерей с COVID-19 подвержены риску заражения, могут иметь высокий риск осложнений в раннем неонатальном периоде и отдаленные последствия для здоровья. Цель исследования — определить аминокислотный профиль пуповинной плазмы и амниотической жидкости пациентов с COVID-19 для анализа связи влияния перенесенного антенатально COVID-19 на изменения в метаболоме «внутриутробного пациента». Для оценки уровня 31 аминокислоты в образцах амниотической жидкости и пуповинной плазмы беременных с COVID-19, полученных при родоразрешении, применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрической детекцией. Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную — 17 соматически здоровых женщин с беременностью без осложнений. Концентрации восьми аминокислот в амниотической жидкости статистически значимо ($p < 0,05$) различались между исследуемыми группами. Разработаны модели логистической регрессии (чувствительность 0,84; специфичность — 1), позволяющие определять, что анализируемая амниотическая жидкость взята от пациенток, перенесших COVID-19. В плазме пуповинной крови значимые различия обнаружены для четырех аминокислот. Построенные модели позволяют выявлять принадлежность исследуемой пуповинной плазмы пациентам группы контроля или COVID-19 (чувствительность и специфичность — 1). Одновременно в двух точках (амниотическая жидкость и пуповинная плазма), комплексно отображающих метаболом плода, были выявлены и статистически значимо отличались при COVID-19 три аминокислоты. Воздействие вируса на организм приводит к выраженным изменениям в метаболоме амниотической жидкости и пуповинной плазмы плода, что может привести к нарушению программирования производства белковых молекул, но не проявляется при рождении.

Ключевые слова: аминокислотный анализ, плазма пуповинной крови, амниотическая жидкость, COVID-19, маркеры состояния новорожденного

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант рег. № 20-04-60093.

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

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

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

Статья получена: 24.05.2021 **Статья принята к печати:** 18.06.2021 **Опубликована онлайн:** 29.06.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.032

CHANGES IN AMINO ACID PROFILE OF CORD BLOOD PLASMA AND AMNIOTIC FLUID OF MOTHERS WITH COVID-19

Lomova NA , Chagovets VV, Dolgoplova EL, Novoselova AV, Petrova UL, Shmakov RG, Frankevich VE

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov, Moscow, Russia

Neonates born to mothers with COVID-19 are at risk for infection, they may have high risk of complications during the neonatal period, and long-term health consequences. The study was aimed to define the amino acid profile of blood plasma and amniotic fluid in patients with COVID-19 in order to assess the relationship between the COVID-19 infection during the antenatal period, and metabolomic alterations in the “intrauterine” patient. The levels of 31 amino acids in the samples of amniotic fluid and cord blood plasma of pregnant women with COVID-19, obtained during delivery, were assessed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. The index group included 29 patients with confirmed diagnosis of COVID-19, and the control group included 17 healthy women with uncomplicated pregnancies. There were significant ($p < 0.05$) differences in the concentrations of eight amino acids between the studied groups. Logistic regression models were developed (sensitivity 0.84; specificity 1) making it possible to define, whether the assessed amniotic fluid was obtained from COVID-19 patients. Significant differences in the concentrations of four amino acids were observed in the umbilical cord blood. The models developed made it possible to define whether the studied cord blood plasma belonged to controls or to COVID-19 patients (sensitivity and specificity 1). Three amino acids were detected, and their levels were significantly different in COVID-19 patients simultaneously in two points (amniotic fluid and cord blood plasma), depicting the fetal metabolome in a holistic manner. The impact of the virus on those infected results in pronounced metabolomic alterations in the amniotic fluid and the fetal cord blood plasma, which may lead to impaired programming of protein production, but never show up at birth.

Keywords: amino acid analysis, cord blood plasma, amniotic fluid, COVID-19, markers of neonatal condition

Funding: the study was supported by RFBR grant №. 20-04-60093.

Author contribution: Lomova NA — analysis of clinical data, systematic analysis, manuscript writing; Chagovets VV — mass spectrometry-based metabolome analysis, statistical analysis of the results, manuscript editing; Dolgoplova EL — collection and preparation of biological matrix samples in the red zone, statistical analysis of the results; Novoselova AV — mass spectrometry-based metabolome analysis, mass spectrometry data processing; Petrova UL — collection and preparation of biological matrix samples in the red zone; Shmakov RG — analysis of clinical data in the red zone, systematic analysis, manuscript editing; Frankevich VE — preparation of the study, systematic analysis, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov (protocol № 13 dated December 10, 2020); the study met the requirements of the Declaration of Helsinki, International Conference on Harmonization (ICF), Good Clinical Practice (GCP), and Federal Law No. 323-FZ “On the Basics of Protecting Citizens’ Health in the Russian Federation” of November 21, 2011; the informed consent was submitted by all patients.

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

Received: 24.05.2021 **Accepted:** 18.06.2021 **Published online:** 29.06.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.032

Вспышка тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, началась в Ухане (Китай) в 2019 г. и быстро привела к всемирной пандемии, которая поставила системы здравоохранения стран перед необходимостью оказания интенсивной терапии огромному числу пациентов. Из-за быстрого распространения число заболеваний во всем мире увеличивается каждый день. Только в России на сегодняшний день зарегистрировано более 4 700 000 подтвержденных случаев заражения COVID-19. Беременные женщины представляют собой уязвимую группу населения, восприимчивую к инфекции COVID-19 из-за физиологических изменений иммунологических показателей и показателей кровообращения. Дети от матерей, инфицированных COVID-19, подвержены риску заражения, а также высокому риску осложнений в раннем неонатальном периоде и отдаленных последствий для здоровья. Непосредственно для COVID-19 такие последствия еще не изучены, однако исследования, выполненные для вируса гриппа, позволяют предположить их потенциальную возможность [1, 2]. До сих пор мало известно о перинатальной и неонатальной инфекции COVID-19, а текущая информация основана преимущественно на отчетах о единичных случаях. Одно из первых и самых крупных исследований касается 33 новорожденных от матерей с подтвержденным диагнозом COVID-19 [3]. Было постулировано несколько путей передачи вируса, включая послеродовую передачу (горизонтальную), транс-плацентарную передачу, а также через околоплодные воды и грудное молоко [4–12]. Первое исследование, описывающее клинические характеристики и изучающее возможность вертикальной передачи SARS-CoV-2 у девяти беременных с лабораторно подтвержденным COVID-19, продемонстрировало отсутствие доказательств вертикальной передачи [11, 13]. Однако в последнее время в литературе появляются сообщения о единичных случаях вертикальной передачи вируса, а также о тяжелых заболеваниях в антенатальном периоде у беременных [14, 15]. Так, продемонстрирована трансплацентарная передача вируса, подтвержденная комплексными вирусологическими тестами на плаценте, а также симптомами и клиническими проявлениями у новорожденных [16].

По фундаментальным причинам метаболом является более чувствительным и динамичным индикатором биохимического статуса клетки и организма, чем протеом или транскриптом [17]. Метаболомный анализ образцов пациентов с инфекцией COVID-19 дает возможность понять биохимические изменения, связанные с плохо изученными процессами, поскольку он показывает воздействие вируса на хозяина, а не просто присутствие инфекционного агента. Метаболомные исследования могут предоставить набор маркеров, потенциально имеющих важное значение для подтверждения инфекции SARS-CoV-2, а также для определения тяжести заболевания и возможного исхода. Недавно показано, что 204 метаболита в плазме крови пациентов с COVID-19 коррелируют с тяжестью заболевания [18]. Аминокислоты, являющиеся частью метаболома, незаменимы во всех процессах жизнедеятельности человека. Биологическая роль около трехсот аминокислот в нашем организме неопределима. Без необходимого количества аминокислот организм не может эффективно развиваться. Именно поэтому существуют оптимальные уровни аминокислот в организме, обеспечивающие сбалансированные обменные процессы. Отклонение концентрации

аминокислот от референсных значений может указывать на развитие конкретного заболевания. Так, концентрации аминокислот изменяются при инфицировании вирусом пещерной мухи [19], при пневмонии, вызванной вирусом гриппа H1N1 [20], при хронической обструктивной болезни легких [21]. Ряд неонатальных патологий выявляют путем анализа аминокислот в сухой капле крови [22]. Исследования низкомолекулярных промежуточных продуктов метаболизма в биологических системах приобретают все большее значение в последние годы, поскольку позволяют лучше понять взаимодействие и регуляцию метаболических путей человека. Связанные с заболеваниями изменения метаболических профилей физиологических жидкостей человеческого организма исследуют для выяснения патофизиологии сложных заболеваний. Например, метаболомный анализ показал, что изменение метаболизма аминокислот коррелирует с изменением гомеостаза кислорода у пациентов с COVID-19 [23]. Еще в одном исследовании аминокислотных профилей у взрослых и детей с COVID-19 выявлены изменения, которые могут быть связаны с эндотелиальной дисфункцией и нарушением регуляции Т-лимфоцитов [24]. Различные метаболические процессы могут быть охарактеризованы путем измерения концентраций аминокислот [25].

Таким образом, целью исследования было определить влияние COVID-19 на аминокислотный состав амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови для разработки диагностической панели и влияние возможных последствий на состояние новорожденного, к которым могут привести изменения метаболизма аминокислот.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с марта по май 2020 г. в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова была создана «красная зона», где проходили лечение и обследование пациенты с диагнозом COVID-19, в том числе беременные женщины. Подготовлено 190 коек для лечения пациентов с COVID-19 и 60 коек акушерского профиля.

В исследование были включены 46 беременных, которые поступили и были родоразрешены в НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова. Основную группу составили 29 пациенток с подтвержденным диагнозом COVID-19; контрольную группу составили 17 соматически здоровых женщин с беременностью без осложнений. Диагноз COVID-19 был подтвержден с помощью ПЦР-теста («ДНК-Технология»; Россия). Включение в группу происходило по мере обращения. Критерии включения в I группу: наличие COVID-19, установленной по данным молекулярно-генетического обследования (ПЦР); критерии включения во II группу: отсутствие COVID-19 по данным клинического обследования, результатам ПЦР-исследования. Критерии исключения: многоплодная беременность; отсутствие резус- и ABO-изоиммунизации, хромосомных аномалий, генетических мутаций и врожденных пороков развития у плода. Для анализа были собраны пуповинная плазма и амниотическая жидкость.

Образцы биологических жидкостей собирали у всех пациентов на базе 1-го инфекционного отделения НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова «красная зона» с проведением предварительной подготовки и хранения образцов. Транспортировку и последующий анализ осуществляли на

территории НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова в помещениях, сертифицированных для работы с пробами 2-го класса опасности. В работе использовали стандартный набор и модифицированный протокол для приготовления и последующего анализа 31 аминокислоты в физиологических жидкостях (JASEM; Турция). Набор содержит две различных калибровочных смеси лиофилизированных аминокислот, смесь внутренних стандартов, лиофилизированную смесь для контроля качества анализа, подвижные фазы А и В, «Реагент 1» (кат. № JSM-CL-503), используемый при приготовлении образцов плазмы, а также колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) аминокислот (кат. № JSM-CL-575).

В процессе подготовки к анализу 50 мкл образца смешивали с 50 мкл раствора внутренних стандартов, перемешивали в течение 5 с, добавляли 700 мкл Реагента-1, перемешивали повторно 15 с, центрифугировали 3 мин со скоростью 3000 об./мин, после чего переносили надосадочную жидкость в хроматографическую вials. Подготовку и хранение анализируемых образцов и вспомогательных растворов производили в соответствии с руководством JASEM.

Анализ образцов осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе 1260 Infinity II (Agilent; США) с детектированием на масс-спектрометре 6460 Triple Quad (Agilent; США).

Транзитные переходы между родительскими ионами и дочерними фрагментами для анализируемых аминокислот, соответствующие им хроматографические времена удержания, концентрации внутренних стандартов, а также сведения о чувствительности и воспроизводимости анализа представлены в руководстве JASEM.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью скриптов, написанных на языке R (R Core Team, Vienna, Austria, в Rstudio; R. RStudio, Inc.; Boston).

Статистический анализ проводили с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Для описания количественных данных использовали медианы (Me) и квартили Q_1 и Q_3 в формате $Me (Q_1; Q_3)$. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате $p < 0,001$.

Для оценки возможности классификации пациентов по группам на основании исследуемых параметров были разработаны модели логистической регрессии. В качестве

зависимых переменных в моделях рассматривали все возможные комбинации аминокислот. В качестве независимой переменной выступала принадлежность пациентки к группе. Из всех разработанных моделей выбирали четыре с наибольшей величиной площади под ROC-кривой (AUC). Для каждой модели были определены критерий Вальда, 95%-й доверительный интервал (ДИ), отношение шансов (ОШ) и его доверительный интервал. Качество разработанных моделей определяли путем построения ROC-кривой, определения площади под ROC-кривой, а также расчета чувствительности и специфичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 46 женщин, из которых 29 пациенток находились в стационаре с подтвержденным COVID-19, и 17 женщин, не болевших данной вирусной инфекцией (группа контроля). Средний возраст пациентов составил $30,7 \pm 4,9$ года, в первой группе средний возраст пациенток $29,9 \pm 5,03$, в группе контроля $32,0 \pm 5,03$. Индекс массы тела в обеих группах значимо не отличался: в первой группе $27,85 \pm 4,52$, во второй $26,12 \pm 3,16$.

Основными клиническими симптомами были кашель (41,38%), потеря обоняния (24,14%) и гипертермия (41,38%) (табл. 1). Бессимптомное течение COVID-19 зарегистрировано в 8 (28,59%) случаях. Легкие, средние и тяжелые случаи составили 22 (75,86%), 6 (20,69%) и 1 (3,45%) случаев соответственно.

По данным компьютерной томографии (КТ) в 25% случаев характерные признаки вирусной пневмонии отсутствовали (СТ-0). Высокая вероятность вирусной пневмонии с минимальным объемом пораженной легочной ткани была выявлена у 40% женщин (СТ-1). Высокая вероятность вирусной пневмонии с поражением 25–50% объема легочной ткани (СТ-2) отмечена у 10% женщин. Высокая вероятность вирусной пневмонии с поражением 50–75% объема легочной ткани (СТ-3) была выявлена у 10% пациенток, с критическим объемом пораженной легочной ткани $> 75\%$ (СТ-4) — в 15% случаев.

В группе пациенток с подтвержденным COVID-19 срок родоразрешения $38 \pm 1,52$ недель беременности достоверно отличался, в сравнении с группой контроля $39,42 \pm 1,14$ недель ($p = 0,001$). Вероятно, это связано с тем, что в группе COVID-19 в четырех случаях (13,8%) были преждевременные роды, однако причины досрочного родоразрешения не связаны с тяжестью вирусного заболевания COVID-19. Причинами преждевременного

Таблица 1. Клиническая характеристика беременных женщин с COVID-19

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

Таблица 2. Клиническая характеристика беременных женщин, включенных в исследование

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

родоразрешения послужили в одном случае неготовность мягких родовых путей и наличие рубца на матке, в другом — нарастание тяжести преэклампсии и еще в двух случаях — преждевременное излитие околоплодных вод и начало родовой деятельности. Кесарево сечение выполнено в 13 (44,8%) случаях (ОР: 0,9 [0,5;1,6]), вакуум-экстракция проведена в связи с дистрессом плода в одном (3,5%) случае, остальные роды протекали нормально через естественные родовые пути. В группе контроля было произведено 9 (52,9 %) операций кесарева сечения, в остальных случаях роды произошли через естественные родовые пути. Причинами для операции кесарева сечения послужили наличие одного или более рубца на матке, неправильное положение плода, анатомические особенности таза и заключение смежных специалистов (врача офтальмолога, ортопеда, невролога). В группе COVID-19 средний вес при рождении составил 3332 ± 484 г, в группе контроля — 3585 ± 424 г, средняя длина новорожденных составила 52,4 ± 2,66 см и 53,1 ± 2,29 см соответственно. В обеих группах состояние новорожденных на первой минуте по шкале Апгар оценено в 8 (8; 8) баллов и на пятой минуте 9 (9; 9) баллов (табл. 2).

Случаев COVID-19 у новорожденных не зарегистрировано. Новорожденные сразу после рождения были изолированы от их матерей. При получении двух отрицательных результатов SARS-CoV-2 у матерей им разрешали грудное вскармливание. Все новорожденные были протестированы на SARS-CoV-2 сразу после рождения, а также на 3-й и 10-й дни после рождения. Все новорожденные получили отрицательные результаты анализов, которые могут свидетельствовать об отсутствии вертикальной передачи инфекции. Случаев перинатальной смерти не зарегистрировано.

На лабораторном этапе работы был применен метод целевой метаболомики с использованием набора для количественного определения 31 аминокислоты методом ВЭЖХ-МС в образцах амниотической жидкости и плазмы пуповинной крови, собранных в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика Кулакова. Настоящее исследование было проведено для описания изменений уровня аминокислот новорожденных от матерей, у которых был положительный результат теста на инфекцию COVID-19.

Амниотическая жидкость

При анализе амниотической жидкости была определена концентрация 31 аминокислоты. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить восемь аминокислот, содержание которых статистически

значимо отличалось при COVID-19 (табл. 3; рис. 1): 1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатионин, цистин, глутамин, гистидин, транс-4-гидроксипролин.

С учетом полученных результатов ВЭЖХ-МС-анализа интерес представляло рассмотрение возможности разработки математической модели, позволяющей отличить амниотическую жидкость пациентов группы COVID-19 от группы контроля. Для этого были построены модели логистической регрессии на базе аминокислот со статистически значимой разницей между исследуемыми группами. Для построения моделей использовали все возможные комбинации аминокислот. Для каждой из моделей был выполнен ROC-анализ и выбраны четыре модели с характерной наибольшей площадью под ROC-кривой (AUC). В табл. 4 представлены параметры полученных моделей, а на рис. 2 — соответствующие им ROC-кривые. Наибольшее значение AUC, равное 0,89, было у модели, построенной на базе аргинина, цистина, гистидина и транс-4-гидроксипролина (табл. 5). Эта модель характеризуется чувствительностью 0,84 и специфичностью 0,93. Несколько более высокие значения чувствительности и специфичности, 0,84 и 1 соответственно, были у модели, построенной на базе 1-метилгистидина, цистина, транс-4-гидроксипролина (табл. 5).

Пуповинная плазма

На следующем этапе работы был проведен анализ аминокислотного профиля пуповинной плазмы в двух группах. Статистический анализ полученных экспериментальных данных позволил выявить четыре аминокислоты, концентрации которых статистически значимо отличались при COVID-19 (табл. 6; рис. 3): 1-метилгистидин, бета-аланин, цистин, гистидин.

Аналогично исследованию амниотической жидкости были построены модели логистической регрессии, позволяющие отличить пуповинную плазму пациентов группы COVID-19 от группы контроля. Результаты разработки и анализа полученных моделей представлены на рис. 4 и в табл. 7, 8. Во все построенные модели вошел цистин, очевидно, как аминокислота наиболее различающаяся между группами. Все модели характеризуются AUC, равным 1, а также чувствительностью и специфичностью, равными 1 (табл. 8).

Особый интерес представляло сравнение аминокислот в амниотической жидкости и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. В двух точках (амниотическая жидкость и пуповинная плазма), комплексно отображающих метаболизм плода, были выявлены и статистически

Таблица 3. Концентрация аминокислот (нмоль/мл) в амниотической жидкости в группах контроля и COVID-19

Аминокислота	Контроль	COVID-19	p-value
1-метил-L-гистидин	9,52 (5,78; 23,54)	0 (0; 4,98)	< 0,001
3-метил-L-гистидин	1,32 (0,14; 2,56)	1,62 (0,48; 5,35)	0,258
3-аминоизомасляная кислота	7,44 (6,38; 9,22)	5,48 (4,4; 6,17)	0,002
DL-5-гидроксизин	10,31 (9,98; 10,69)	10,28 (9,99; 10,5)	0,591
Этаноламин	45,69 (38,94; 67,65)	35,24 (24,53; 46,3)	0,096
L-2-аминомасляная кислота	1,5 (1,27; 2,34)	1,27 (1; 2,62)	0,367
L-2-аминоадипиновая кислота	7,21 (5,39; 10,59)	6,66 (5,24; 9,46)	0,615
L-аланин	238,74 (179,29; 329,59)	187,36 (136,91; 257,72)	0,302
L-аргинин	26,59 (22,42; 48,86)	16,25 (8,97; 23,61)	0,006
L-аспарагин	29,36 (24,49; 40,74)	25,56 (19,32; 41,31)	0,391
L-аспарагиновая кислота	13,82 (7,9; 29,75)	11,92 (6,64; 62,9)	0,784
L-карнозин	4,58 (4,43; 5,21)	5,5 (4,54; 6,31)	0,107
L-цитруллин	8,6 (6,93; 11,43)	7,57 (4,84; 14,52)	0,632
L-цистатионин	0,96 (0,83; 1,16)	0,8 (0,56; 0,96)	0,036
L-цистин	39,69 (30,93; 46,09)	15,92 (5,48; 35,06)	0,005
L-глутаминовая кислота	176,3 (114,37; 215,51)	112,92 (67,26; 176,17)	0,15
L-глутамин	392,48 (267,94; 450,24)	286,57 (177,62; 369,67)	0,044
L-глицин	216,37 (189,39; 359,66)	219,92 (156,65; 260,22)	0,43
L-гистидин	65,35 (34,72; 85,64)	7,9 (0; 30,68)	0,008
L-лизин	153,56 (113,59; 169,06)	149,15 (105,52; 187,74)	0,973
L-метионин	16,55 (10,59; 20,68)	11,21 (7,36; 19,59)	0,252
L-орнитин	24,16 (15,39; 34,42)	42,8 (20,11; 69,65)	0,096
L-фенилаланин	39,63 (24,82; 51,44)	32 (21,48; 55,77)	0,515
L-пролин	118,37 (103,97; 154,61)	109,16 (72,85; 125,35)	0,137
L-серин	65,52 (37,24; 89,78)	50,74 (32,72; 95,85)	0,681
L-треонин	150,1 (101,89; 211,52)	136,31 (96,46; 172,32)	0,445
L-триптофан	11,63 (7,7; 13,69)	7,49 (4,36; 14,33)	0,302
L-тирозин	24,3 (17,75; 38,24)	18,23 (8,22; 47,62)	0,435
L-валин	378,17 (286,06; 544,61)	412,5 (256,16; 570,82)	0,681
Таурин	12,6 (11,48; 14,32)	12,66 (11,54; 16,48)	0,958
Транс-4-гидрокси-L-пролин	18,03 (14,18; 20,08)	13,54 (11,05; 15,96)	0,019

значимо отличались при COVID-19 три аминокислоты: 1-метилгистидин, цистин и гистидин (табл. 9).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вирусные инфекции вызывают характерные изменения в метаболизме клеток-хозяев, чтобы обеспечить эффективную репликацию вируса [19]. Более того, результирующее метаболическое воздействие и клеточное перепрограммирование варьируют между вирусами (даже в пределах одного семейства) и типом клетки-хозяина.

Полученные данные свидетельствуют о статистически значимом различии концентраций восьми аминокислот в амниотической жидкости и четырех в пуповинной плазме между пациентками с COVID-19 и группой контроля. Причем концентрации восьми аминокислот были снижены у пациенток с COVID-19. Сходные изменения концентраций аминокислот были обнаружены при исследовании плазмы крови взрослых и детей с COVID-19 [24]. Авторы этой работы искали подтверждение своей гипотезе о возможном снижении концентрации

аргинина при COVID-19. Известно, что эндотелиальная дисфункция играет роль в развитии повреждения легких при COVID-19 как у взрослых, так и у детей [27, 28], а низкая биодоступность аргинина связана с развитием эндотелиальной дисфункции и дисрегуляции Т-клеток [29, 30] и вносит вклад в патофизиологию множества заболеваний [31]. Действительно, у больных COVID-19 было обнаружено ожидаемое снижение концентрации аргинина. Кроме того, были значимо снижены и концентрации цитруллина, глутамин, аланина, глицина, гистидина, пролина и нескольких других аминокислот, однако авторы статьи затрудняются объяснить механизмы такого эффекта [24]. Снижение концентрации аминокислот было выявлено и при некоторых других патологиях [19, 21–24, 32, 33].

Особый интерес в нашем исследовании представляло сравнение уровней аминокислот в амниотической жидкости и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19. Одновременно в двух точках (амниотическая жидкость и пуповинная плазма), комплексно отображающих

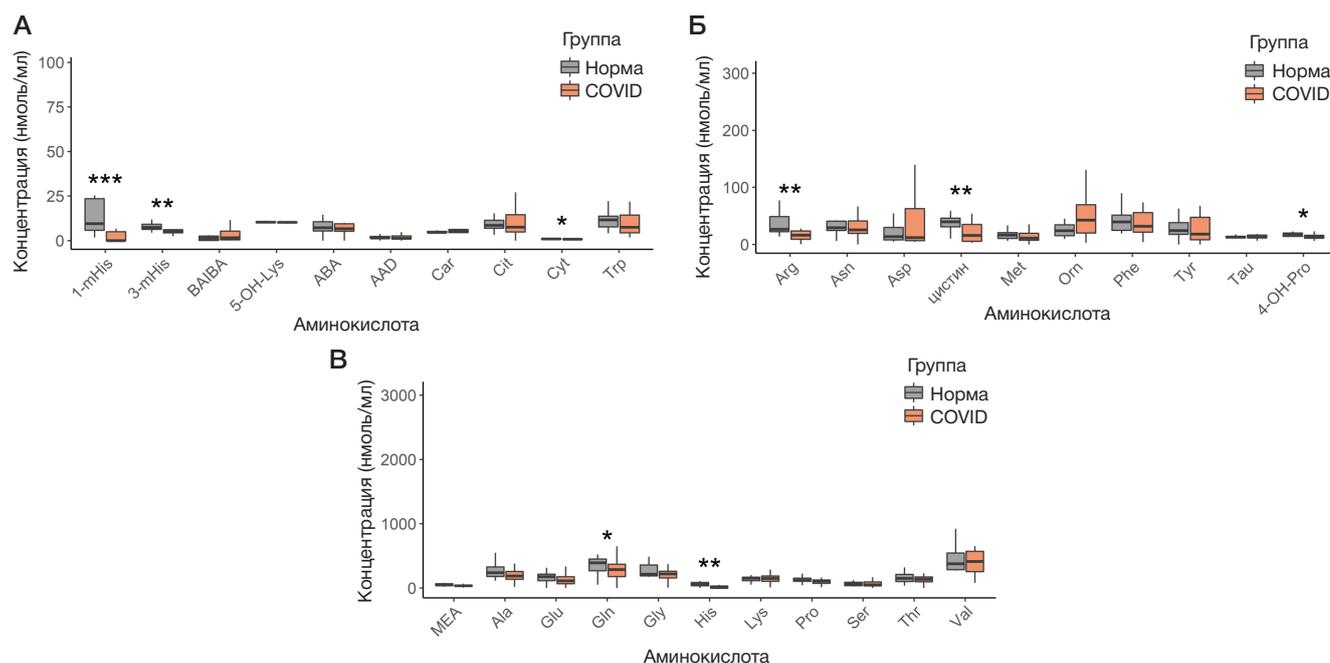


Рис. 1. Концентрация аминокислот в амниотической жидкости в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуротной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуротной величины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

метаболом плода, были выявлены и статистически значимо отличались при COVID-19 три аминокислоты: 1-метилгистидин, цистин и гистидин.

Одной из трех аминокислот, выявленных сразу в двух средах плода (амниотической жидкости и плазме пуповинной крови), обладающей высокой дифференцирующей значимостью, был L-цистин. Это некодируемая аминокислота, представляющая собой продукт окислительной димеризации цистеина. В ходе

посттрансляционной модификации белков она играет крайне важную роль в формировании и поддержании третичной структуры белков и пептидов и, соответственно, их биологической активности. Так, например, такие гормоны, как вазопрессин, окситоцин, инсулин и соматостатин, приобретают биологическую активность после образования внутримолекулярных дисульфидных мостиков.

Двумя другими аминокислотами со статистически значимой разницей, выявленной в амниотической

Таблица 4. Параметры моделей логистической регрессии, позволяющие дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в амниотической жидкости

№ модели	Коэффициент	Величина коэффициента	Критерий Вальда	p-value	ДИ		ОШ	ОШ	
					2,50%	97,50%		2,50%	97,50%
1	Свободный член	5,8782	2,3394	0,019	1,8187	11,8835	357,17	6,1637	144864
	L-аргинин	0,0091	0,3735	0,709	-0,042	0,0565	1,0091	0,9588	1,0582
	L-цистин	-0,0842	-2,2358	0,025	-0,1747	-0,0208	0,9192	0,8397	0,9794
	L-гистидин	0,0129	1,1644	0,244	-0,0063	0,0386	1,013	0,9937	1,0394
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	-0,2534	-1,7891	0,074	-0,574	-0,0041	0,7762	0,5633	0,9959
2	Свободный член	2,7692	1,7238	0,085	-0,1116	6,3699	15,9456	0,8944	583,996
	1-метил-L-гистидин	-0,0336	-1,271	0,204	-0,1107	0,0073	0,9669	0,8952	1,0073
	L-цистин	-0,0123	-0,5235	0,601	-0,0621	0,0328	0,9878	0,9398	1,0333
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	-0,1114	-1,0398	0,298	-0,3392	0,0951	0,8946	0,7123	1,0998
3	Свободный член	2,7231	1,6899	0,091	-0,152	6,3672	15,2278	0,859	582,4
	1-метил-L-гистидин	-0,0339	-1,2824	0,2	-0,1109	0,0071	0,9667	0,895	1,0071
	L-цистин	-0,0156	-0,5326	0,594	-0,0792	0,0395	0,9845	0,9239	1,0402
	L-глутамин	7,00E-04	0,1925	0,847	-0,0066	0,0082	1,0007	0,9934	1,0082
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	-0,116	-1,0585	0,29	-0,3503	0,0978	0,8905	0,7045	1,1027
4	Свободный член	5,1861	2,146	0,032	1,2261	11,0587	178,765	3,408	63495,7
	1-метил-L-гистидин	-0,0272	-0,8762	0,381	-0,1263	0,0193	0,9731	0,8813	1,0195
	L-цистин	-0,0633	-1,6706	0,095	-0,1559	8,00E-04	0,9387	0,8557	1,0008
	L-гистидин	0,0146	2,199	0,028	0,0032	0,0312	1,0147	1,0032	1,0317
	Транс-4-гидрокси L-пролин	-0,2185	-1,5539	0,12	-0,5408	0,0346	0,8038	0,5823	1,0352

Таблица 5. Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в амниотической жидкости

Аминокислота	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность	Положительная предсказательная ценность
L-аргинин, L-цистин, L-гистидин, <i>транс</i> -4-гидрокси-L-пролин	0,89	0,46	0,84 (0,58; 1)	0,93 (0,73; 1)	0,94 (0,8; 1)
1-метил-L-гистидин, L-цистин, <i>транс</i> -4-гидрокси-L-пролин	0,88	0,68	0,84 (0,63; 1)	1 (0,8; 1)	1 (0,86; 1)
1-метил-L-гистидин, L-цистин, L-глутамин, <i>транс</i> -4-гидрокси-L-пролин	0,88	0,67	0,82 (0,63; 0,95)	1 (0,87; 1)	1 (0,87; 1)
1-метил-L-гистидин, L-цистин, L-гистидин, <i>транс</i> -4-гидрокси-L-пролин	0,88	0,65	0,79 (0,58; 1)	0,93 (0,67; 1)	0,95 (0,78; 1)

Таблица 6. Концентрация аминокислот (нмоль/мл) в пуповинной плазме в группах контроля и COVID-19

Аминокислота	Контроль	COVID-19	p-value
1-метил-L-гистидин	0 (0; 1,95)	0 (0; 0)	0,041
3-метил-L-гистидин	3,02 (2,82; 3,46)	3,2 (2,56; 3,68)	0,759
Бета-аланин	1,19 (0,82; 1,61)	2,9 (1,8; 4,35)	0,014
DL-5-гидроксилизин	6,69 (6,48; 6,77)	6,67 (6,56; 6,87)	0,608
Этаноламин	18,77 (14,52; 21,97)	14,75 (13,43; 16,43)	0,104
L-2-аминомасляная кислота	5,97 (1,97; 7,96)	7,04 (3,45; 10,51)	0,255
L-аланин	498,14 (451,48; 554,51)	426,72 (390,15; 530,81)	0,134
L-аргинин	55,2 (42,7; 73,97)	69,1 (51,71; 81,33)	0,23
L-аспарагин	46,5 (43,4; 51)	51,33 (45,72; 53,85)	0,404
L-аспарагиновая кислота	21,69 (12,05; 28,9)	16,66 (11,6; 26,76)	0,753
L-карнозин	2,14 (1,93; 2,3)	2,01 (1,64; 2,33)	0,274
L-цитруллин	11,92 (10,83; 13,47)	11,96 (10,46; 15,18)	0,357
L-цистатинин	0,32 (0,17; 0,46)	0,2 (0,16; 0,42)	0,593
L-цистин	28,93 (26,49; 33,43)	2,55 (1,44; 3,81)	< 0,001
L-глутаминовая кислота	138,44 (41,01; 189,32)	92,68 (60,31; 109,28)	0,187
L-глутамин	617,36 (576,47; 725,84)	625,09 (559,72; 689,24)	0,736
L-глицин	277,25 (255,67; 303,25)	259,22 (235,34; 293,13)	0,43
L-гистидин	175,97 (138,84; 206,4)	141,92 (103,55; 175,91)	0,04
L-лизин	410,97 (388,38; 448,61)	451,73 (389,8; 488,91)	0,531
L-метионин	33,11 (27,86; 39)	30,61 (25,81; 39,05)	0,753
L-орнитин	119,5 (100,28; 131,19)	100,77 (83,6; 124,42)	0,123
L-фенилаланин	79,88 (76,47; 94,87)	80,5 (75,99; 88,11)	0,982
L-пролин	159,61 (153,75; 177,18)	158,5 (143,86; 176,18)	0,417
L-серин	132,49 (125,85; 148,56)	143,03 (128,45; 154,13)	0,558
L-треонин	293,9 (231,79; 339,82)	319,48 (276,25; 352,53)	0,23
L-триптофан	77,59 (66,69; 84,57)	73,72 (68,93; 78,29)	0,309
L-тирозин	70,65 (57,22; 78,07)	63,8 (57,51; 77,25)	0,685
Таурин	38,01 (31,1; 49,77)	37,28 (30,51; 46,92)	0,928
<i>Транс</i> -4-гидрокси-L-пролин	20,95 (17,68; 26,64)	20,56 (19,28; 23,57)	0,893

жидкости и плазме пуповинной крови новорожденных от матерей с COVID-19, были L-гистидин и его производное 1-метилгистидин.

L-гистидин — гетероциклическая альфа-аминокислота, одна из 20 протеиногенных аминокислот и одна из двух условно-незаменимых аминокислот (наряду с аргинином). Первоначально считалось, что незаменима она только для детей. Остаток гистидина входит в состав активных центров множества ферментов. Гистидин является предшественником в биосинтезе гистамина. Гистамин

играет важную роль в развитии воспаления и некоторых аллергических реакций. Гистидин, одна из незаменимых аминокислот, способствует росту и восстановлению тканей, участвует в синтезе эритроцитов и лейкоцитов, а также в формировании миелиновых оболочек нервных клеток. Нехватка гистидина может вызвать ослабление слуха, дегенеративные заболевания, такие как болезни Паркинсона и Альцгеймера.

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

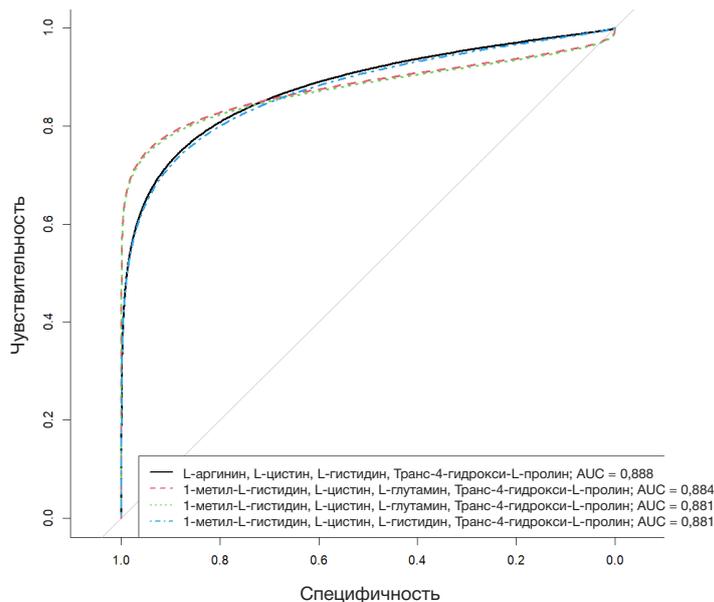


Рис. 2. ROC-кривые моделей логистической регрессии, разработанных на основании концентраций аминокислот в амниотической жидкости для классификации пациенток контрольной группы и группы COVID-19

жидкости и плазме пуповинной крови, что чревато риском нарушения программирования производства белковых молекул. При этом COVID-19 может никак не проявлять себя при рождении. Изменения метаболических процессов путем нарушения необходимого соотношения аминокислот на территории плода, могут быть связаны с репликацией вируса, воспалительной реакцией хозяина и изменениями энергетического метаболизма. Вероятно, данные нарушения метаболизма могут проявиться и на момент родоразрешения, но не были зафиксированы в нашем исследовании, ввиду критериев включения в основную группу. Все роженицы болели COVID-19 на момент родоразрешения. И, возможно, именно данный факт не позволил вирусу реализовать на территории плода все свои негативные потенции.

Выводы

В данном исследовании мы использовали методы целевой метабомики для обнаружения изменений концентрации аминокислот беременных, инфицированных COVID-19, в момент госпитализации. Такие изменения были выявлены. Было обнаружено, что концентрации восьми аминокислот в амниотической жидкости (1-метилгистидин, 3-метилгистидин, аргинин, цистатионин, цистин, глутамин, гистидин, транс-4-гидроксипролин) и четырех аминокислот в пуповинной плазме (1-метилгистидин, бета-аланин, цистин, гистидин) статистически значимо различаются между группой пациентов, инфицированных COVID-19, и контрольной группой. Наша цель состояла в том, чтобы не только найти маркеры заболевания, но и

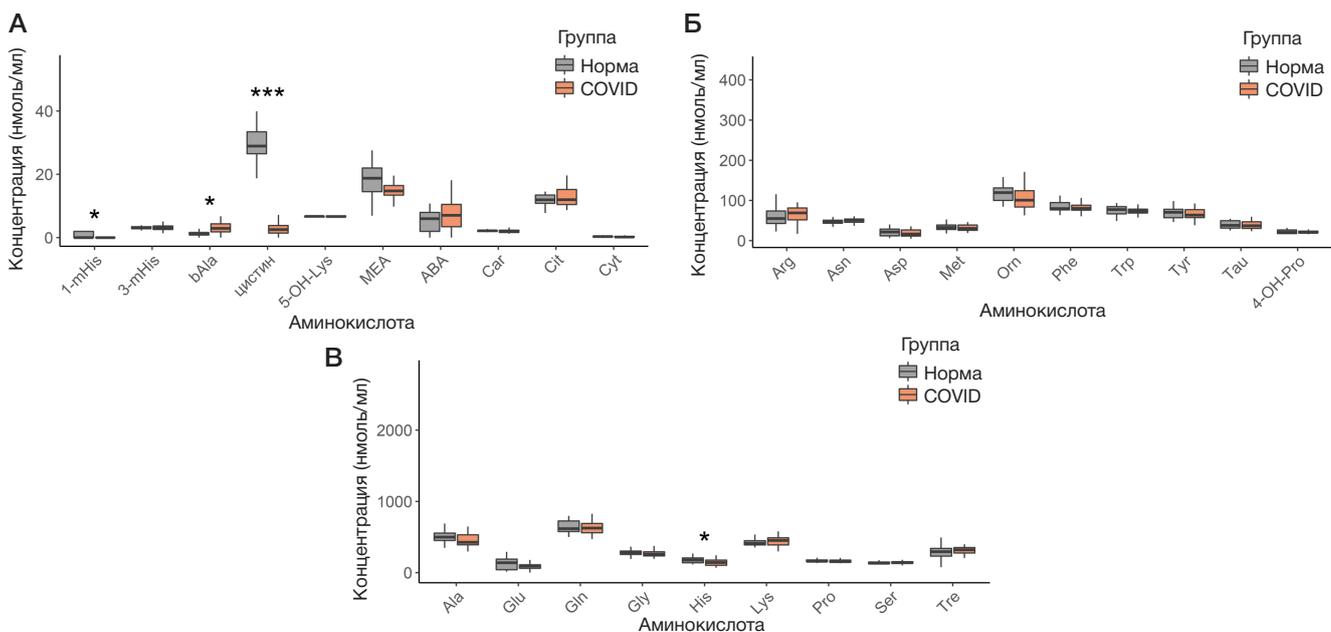


Рис. 3. Концентрация аминокислот в пуповинной плазме в группах контроля и COVID-19. Границами бокса служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины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

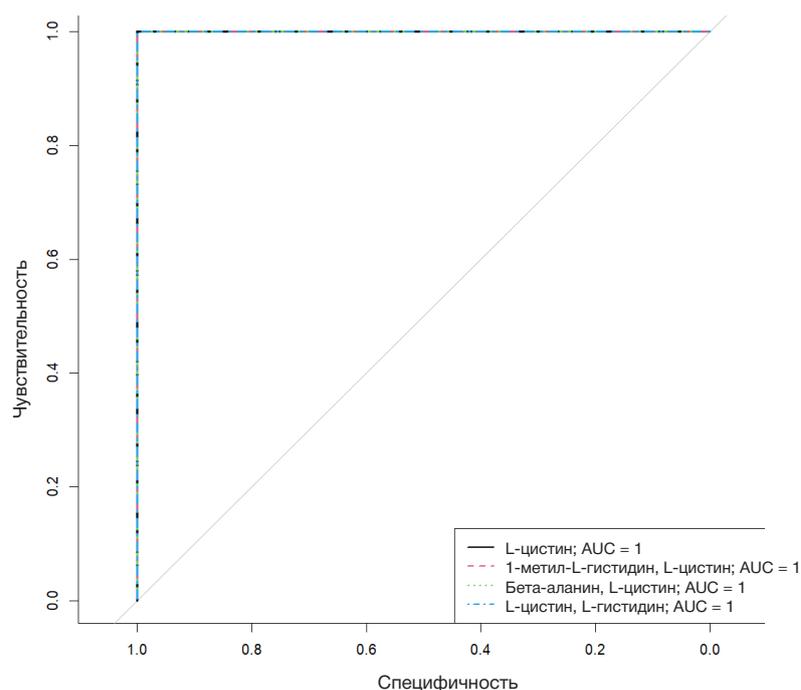


Рис. 4. ROC-кривые моделей логистической регрессии, разработанных на основании концентраций аминокислот в пуповинной плазме для классификации пациенток контрольной группы и группы с COVID-19

понять, какое влияние инфекция COVID-19 оказывает на метаболит плода. Оказалось, что нарушение метаболизма выявленных аминокислот проявляется при ряде серьезных патологий, таких как острый респираторный дистресс-синдром у пациентов с тяжелым сепсисом, пневмония при гриппе H1N1, бактериальная пневмония, серповидноклеточная анемия, талассемия, малярия,

острая астма, муковисцидоз, легочная гипертензия, сердечно-сосудистые заболевания, некоторые виды рака и др. Эти результаты могут быть использованы для выбора направления дальнейших исследований возможных последствий для здоровья новорожденных от матерей, перенесших COVID-19, и определения требований к лечению и медицинской помощи беременным женщинам и

Таблица 7. Параметры моделей логистической регрессии, позволяющих дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в пуповинной плазме

№ модели	Коэффициент	Величина коэффициента	Критерий Вальда	p-value
1	Свободный член	79,204	0,001	0,9992
	L-цистин	-5,3827	-0,001	0,9992
2	Свободный член	79,4804	0,001	0,9992
	1-метил-L-гистидин	3,1115	3,00E-04	0,9998
	L-цистин	-5,4032	-0,001	0,9992
3	Свободный член	77,8123	9,00E-04	0,9992
	Бета-аланин	-1,4597	-2,00E-04	0,9998
	L-цистин	-5,099	-0,001	0,9992
4	Свободный член	78,9156	9,00E-04	0,9993
	L-цистин	-5,3946	-0,001	0,9992
	L-гистидин	0,0027	0	1

Таблица 8. Характеристики моделей логистической регрессии, позволяющих дифференцировать пациенток с COVID-19 и без по концентрации аминокислот в пуповинной плазме

Аминокислоты	AUC	Пороговое значение	Чувствительность	Специфичность	Положительная предсказательная ценность
L-цистин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)
1-метил-L-гистидин, L-цистин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)
Бета-аланин, L-цистин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)
L-цистин, L-гистидин	1	0,5	1 (1; 1)	1 (1; 1)	1 (1; 1)

Таблица 9. Концентрации аминокислот (нмоль/мл) в амниотической жидкости и пуповинной плазме, которые статистически значимо различаются в группах контроля и COVID-19

Образец	Аминокислота	Контроль	COVID-19	p-value
Амниотическая жидкость	1-метил-L-гистидин	9,52 (5,78; 23,54)	0 (0; 4,98)	< 0,001
	3-метил-L-гистидин	7,44 (6,38; 9,22)	5,48 (4,4; 6,17)	0,002
	L-аргинин	26,59 (22,42; 48,86)	16,25 (8,97; 23,61)	0,006
	L-цистатионин	0,96 (0,83; 1,16)	0,8 (0,56; 0,96)	0,036
	L-цистин	39,69 (30,93; 46,09)	15,92 (5,48; 35,06)	0,005
	L-глутамин	392,48 (267,94; 450,24)	286,57 (177,62; 369,67)	0,044
	L-гистидин	65,35 (34,72; 85,64)	7,9 (0; 30,68)	0,008
	Транс-4-гидрокси-L-пролин	18,03 (14,18; 20,08)	13,54 (11,05; 15,96)	0,019
Пуповинная плазма	1-метил-L-гистидин	0 (0; 1,95)	0 (0; 0)	0,041
	Бета-аланин	1,19 (0,82; 1,61)	2,9 (1,8; 4,35)	0,014
	L-цистин	28,93 (26,49; 33,43)	2,55 (1,44; 3,81)	< 0,001
	L-гистидин	175,97 (138,84; 206,4)	141,92 (103,55; 175,91)	0,04

новорожденным после постановки диагноза COVID-19, так как отдаленные последствия для здоровья данной когорты новорожденных могут включать в себя эндокринные,

нервные и аллергические расстройства, обусловленные метаболомными нарушениями программирования производства белковых молекул в антенатальном периоде.

Литература

- Mendez-Figueroa H, Raker C, Anderson BL. Neonatal characteristics and outcomes of pregnancies complicated by influenza infection during the 2009 pandemic. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 204 (6 SUPPL.): 58.
- Song JY, Park KV, Han SW, Choi MJ, Noh JY, Cheong HJ, et al. Paradoxical long-term impact of maternal influenza infection on neonates and infants. *BMC Infect Dis*. 2020; 20 (1): 1–8.
- Zeng L, Xia S, Yuan W, Yan K, Xiao F, Shao J, et al. Neonatal Early-Onset Infection with SARS-CoV-2 in 33 Neonates Born to Mothers with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Pediatr*. 2020; 174 (7): 722–5.
- Yu N, Li W, Kang Q, Zeng W, Feng L, Wu J. No SARS-CoV-2 detected in amniotic fluid in mid-pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30320-0.
- Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
- Zamaniyan M, Ebadi A, Aghajani S, Rahmani Z, Haghshenas M, Azizi S. Preterm delivery, maternal death, and vertical transmission in a pregnant woman with COVID-19 infection. *Prenat Diagn*. 2020; 40 (13): 1759–61.
- Sisman J, Jaleel MA, Moreno W, Rajaram V, Collins RRJ, Savani RC, et al. Intrauterine Transmission of SARS-CoV-2 Infection in a Preterm Infant. *Pediatr Infect Dis J*. 2020; 265–7.
- Costa S, Posteraro B, Marchetti S, Tamburrini E, Carducci B, Lanzone A, et al. Excretion of SARS-CoV-2 in human breast milk. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26 (10): 1430–2.
- Buonsenso D, Costa S, Sanguinetti M, Cattani P, Posteraro B, Marchetti S, et al. Neonatal Late Onset Infection with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Am J Perinatol*. 2020; 37 (8): 869–72.
- Qiancheng X, Jian S, Lingling P, Lei H, Xiaogan J, Weihua L, et al. Coronavirus disease 2019 in pregnancy. *Int J Infect Dis*. 2020; 95: 376–83.
- Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 from an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1846–8.
- Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr*. 2020; 9 (1): 51–60.
- Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers with COVID-19 Pneumonia. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1848–9.
- Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingin K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI: 10.3390/v13030447.
- Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–75.
- Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467-020-17436-6.
- Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics*. 2016; 12 (10). DOI: 10.1007/s11306-016-1108-4.
- Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59–72.e15.
- Wannemacher RW, Pekarek RS, Bartelloni PJ, Vollmer RT, Beisel WR. Changes in individual plasma amino acids following experimentally induced sand fly fever virus infection. *Metabolism*. 1972; 21 (1): 67–76.
- Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15. DOI: 10.1186/s13054-017-1672-7
- Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
- Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
- Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
- Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
- Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome

- to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
26. Thaker SK, Chng J, Christofk HR. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol*. 2019; 17 (1): 59.
 27. Diorio C, McNerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
 28. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
 29. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicines*. 2020; 8 (8): 277.
 30. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
 31. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M, Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: *Nutrition in Clinical Practice*. SAGE Publications Inc.: 2017; 30S–47S.
 32. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17. DOI: 10.21203/rs.3.rs-18796/v1.
 33. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2013; 17 (1): 1–8.

References

1. Mendez-Figueroa H, Raker C, Anderson BL. Neonatal characteristics and outcomes of pregnancies complicated by influenza infection during the 2009 pandemic. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 204 (6 SUPPL.): 58.
2. Song JY, Park KV, Han SW, Choi MJ, Noh JY, Cheong HJ, et al. Paradoxical long-term impact of maternal influenza infection on neonates and infants. *BMC Infect Dis*. 2020; 20 (1): 1–8.
3. Zeng L, Xia S, Yuan W, Yan K, Xiao F, Shao J, et al. Neonatal Early-Onset Infection with SARS-CoV-2 in 33 Neonates Born to Mothers with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Pediatr*. 2020; 174 (7): 722–5.
4. Yu N, Li W, Kang Q, Zeng W, Feng L, Wu J. No SARS-CoV-2 detected in amniotic fluid in mid-pregnancy. *Lancet Infect Dis*. 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30320-0.
5. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395 (10226): 809–15.
6. Zamaniyan M, Ebadi A, Aghajanzadeh S, Rahmani Z, Haghshenas M, Azizi S. Preterm delivery, maternal death, and vertical transmission in a pregnant woman with COVID-19 infection. *Prenat Diagn*. 2020; 40 (13): 1759–61.
7. Sisman J, Jaleel MA, Moreno W, Rajaram V, Collins RRJ, Savani RC, et al. Intrauterine Transmission of SARS-COV-2 Infection in a Preterm Infant. *Pediatr Infect Dis J*. 2020; 265–7.
8. Costa S, Posteraro B, Marchetti S, Tamburrini E, Carducci B, Lanzone A, et al. Excretion of SARS-CoV-2 in human breast milk. *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26 (10): 1430–2.
9. Buonsenso D, Costa S, Sanguinetti M, Cattani P, Posteraro B, Marchetti S, et al. Neonatal Late Onset Infection with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Am J Perinatol*. 2020; 37 (8): 869–72.
10. Qiancheng X, Jian S, Lingling P, Lei H, Xiaogan J, Weihua L, et al. Coronavirus disease 2019 in pregnancy. *Int J Infect Dis*. 2020; 95: 376–83.
11. Dong L, Tian J, He S, Zhu C, Wang J, Liu C, et al. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 from an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1846–8.
12. Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G, et al. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr*. 2020; 9 (1): 51–60.
13. Zeng H, Xu C, Fan J, Tang Y, Deng Q, Zhang W, et al. Antibodies in Infants Born to Mothers with COVID-19 Pneumonia. *JAMA*. 2020; 323 (18): 1848–9.
14. Sukhikh G, Petrova U, Prikhodko A, Starodubtseva N, Chingina K, Chen H, et al. Vertical Transmission of SARS-CoV-2 in Second Trimester Associated with Severe Neonatal Pathology. *Viruses*. 2021; 13 (3). DOI: 10.3390/v13030447.
15. Ellington S, Strid P, Tong VT, Woodworth K, Galang RR, Zambrano LD, et al. Characteristics of women of reproductive age with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection by pregnancy status — United States, January 22–June 7, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2020; 69 (25): 769–75.
16. Vivanti AJ, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11 (1). DOI: 10.1038/s41467-020-17436-6.
17. Kell DB, Oliver SG. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. *Metabolomics*. 2016; 12 (10). DOI: 10.1007/s11306-016-1108-4.
18. Shen B, Yi X, Sun Y, Bi X, Du J, Zhang C, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. 2020; 182 (1): 59-72.e15.
19. Wannemacher RW, Pekarek RS, Bartelloni PJ, Vollmer RT, Beisel WR. Changes in individual plasma amino acids following experimentally induced sand fly fever virus infection. *Metabolism*. 1972; 21 (1): 67–76.
20. Banoei MM, Vogel HJ, Weljie AM, Kumar A, Yende S, Angus DC, et al. Plasma metabolomics for the diagnosis and prognosis of H1N1 influenza pneumonia. 2017; 1–15. DOI: 10.1186/s13054-017-1672-7
21. Inoue S, Ikeda H. Differences in plasma amino acid levels in patients with and without bacterial infection during the early stage of acute exacerbation of COPD. *Int J COPD*. 2019; 14: 575–83.
22. Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int J Neonatal Screen*. 2020; 6 (2): 1–17.
23. Páez-Franco JC, Torres-Ruiz J, Sosa-Hernández VA, Cervantes-Díaz R, Romero-Ramírez S, Pérez-Fragoso A, et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2021; 11 (1). DOI: 10.1038/s41598-021-85788-0.
24. Rees CA, Rostad CA, Mantus G, Anderson EJ, Chahroudi A, Jaggi P. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. 2021; 118 (25): 4–6.
25. Hirschel J, Vogel M, Baber R, Garten A, Beuchel C, Dietz Y, et al. Relation of whole blood amino acid and acylcarnitine metabolome to age, sex, BMI, puberty, and metabolic markers in children and adolescents. *Metabolites*. 2020; 10 (4). DOI: 10.3390/metabo10040149.
26. Thaker SK, Chng J, Christofk HR. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol*. 2019; 17 (1): 59.
27. Diorio C, McNerney KO, Lambert M, Paessler M, Anderson EM, Henrickson SE, et al. Evidence of thrombotic microangiopathy in children with SARS-CoV-2 across the spectrum of clinical presentations. *Blood Adv*. 2020; 4 (23): 6051–63.
28. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*. 2020; 20 (6): 363–74.
29. Gambardella J, Khondkar W, Morelli MB, Wang X, Santulli G, Trimarco V. Arginine and endothelial function. *Biomedicines*. 2020; 8 (8): 277.
30. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological Reviews*. 2008; 222 (1): 180–91.
31. Morris CR, Hamilton-Reeves J, Martindale RG, Sarav M,

- Ochoa Gautier JB. Acquired Amino Acid Deficiencies: A Focus on Arginine and Glutamine. In: Nutrition in Clinical Practice. SAGE Publications Inc.: 2017; 30S–47S.
32. IKEDA H. Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls. 2020; 1–17. DOI: 10.21203/rs.3.rs-18796/v1.
33. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. Crit Care. 2013; 17 (1): 1–8.