

**АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
В ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**
**ANALYTICAL METHODS IN CHEMISTRY
AND CHEMICAL TECHNOLOGY**

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-65-74>



УДК 543.9

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Определение возможных микроРНК-маркеров злоупотребления препаратами кобальта методом ПЦР в реальном времени с использованием панелей сигнального пути гипоксии

П.В. Постников^{1,✉}, Ф.В. Радус², Ю.А. Ефимова², И.В. Пронина^{1,3}

¹Национальная антидопинговая лаборатория (Институт) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (НАДЛ МГУ), Москва, 105005 Россия

²МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

³Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: drpavelpostnikov@gmail.com

Аннотация

Цели. Кобальт имитирует состояние гипоксии, препятствуя деградации альфа-субъединицы гипоксия-индуцируемого фактора, что приводит к увеличению кислородной емкости крови и может использоваться спортсменами в качестве допинга для получения конкурентных преимуществ. На сегодняшний момент для определения общего кобальта в организме используют прямые методы масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, жидкостной хроматографией-тандемной масс-спектрометрии, однако Всемирным антидопинговым агентством не установлена максимально допустимая пороговая концентрация этого элемента в биожидкостях. Отсутствие четких критериев идентификации осложняет интерпретацию полученных результатов. В связи с этим, в данной статье впервые предлагается подход по косвенному определению возможных злоупотреблений кобальтом для целей допинг-контроля, основанный на изменении уровней экспрессии микроРНК, задействованных в регуляции сигнального пути гипоксии. Цель исследования заключалась в поиске возможных микроРНК-маркеров, экспрессия которых не зависит от гипоксии, вызванной физическими нагрузками, но заметно изменяется при приеме препаратов кобальта.

Методы. Выделение микроРНК из образцов плазмы крови проводили при помощи набора PAXgene Blood miRNA Kit. Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на амплификаторе CFX96 Bio-Rad (США) с помощью наборов miScript® SYBR® Green PCR Kit и панелей для исследования профилей экспрессии зрелых микроРНК сигнального пути гипоксии Hypoxia Signaling Pathway miScript® miRNA PCR Array.

Результаты. На основании статистического анализа данных было установлено, что экспрессия hsa-miR-15b-5p в плазме крови испытуемых не зависит от физической нагрузки, но возрастает при приеме препаратов кобальта.

Выводы. Разница в уровнях экспрессии при гипоксии, вызванной анаэробной физической нагрузкой, и имитацией гипоксии за счет применения кобальта делает hsa-miR-15b-5p потенциальным претендентом на роль маркера злоупотребления данным эритропоэз-стимулирующим агентом.

Ключевые слова: кобальт, qPCR-RT, микроРНК, допинг-контроль, стимуляторы эритропоэза

Для цитирования: Постников П.В., Радус Ф.В., Ефимова Ю.А., Пронина И.В. Определение возможных микроРНК-маркеров злоупотребления препаратами кобальта методом ПЦР в реальном времени с использованием панелей сигнального пути гипоксии. *Тонкие химические технологии.* 2023;18(1):65–74. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-65-74>

RESEARCH ARTICLE

Determination of possible microRNA-markers of cobalt abuse by real-time qPCR using hypoxia signaling pathway panels

Pavel V. Postnikov^{1,✉}, Fedor V. Radus², Yulia A. Efimova², Irina V. Pronina^{1,3}

¹National Anti-Doping Laboratory (Institute), M.V. Lomonosov Moscow State University (NADL MSU), Moscow, 105005 Russia

²MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

³Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: drpavelpostnikov@gmail.com

Abstract

Objectives. Cobalt mimics the state of hypoxia to prevent degradation of the alpha subunit of hypoxia-inducible factor, resulting in an increase in blood oxygen capacity and endurance. Athletes can use this property to gain competitive advantage. Nowadays, direct methods of inductively coupled plasma mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry are used to determine total cobalt levels in the body. However, the World Anti-Doping Agency is yet to establish a maximum allowable threshold concentration of this element in biofluids. The lack of clear identification criteria complicates the interpretation of the obtained results for the purposes of doping control. In this regard, the present work proposes a new approach for the indirect determination of possible cobalt abuse based on changes in the expression levels of miRNAs involved in the regulation of hypoxia signaling pathways. Here, the aim is to identify possible microRNA markers whose expression does not depend on exercise-induced hypoxia, but changes markedly when taking cobalt preparations.

Methods. MicroRNA isolation was performed from blood plasma samples using the PAXgene Blood miRNA Kit. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on CFX96 Bio-Rad (USA) analyzer using miScript® SYBR® Green PCR Kits and panels for studying the expression profiles of mature microRNAs of the hypoxia signaling pathway miScript® miRNA PCR Array.

Results. Based on the statistical analysis of the data, it was found that the expression of hsa-miR-15b-5p in the blood plasma of the subjects does not depend on physical activity, but increases when taking cobalt preparations.

Conclusions. The difference in expression levels during anaerobic exercise-induced hypoxia and cobalt-induced hypoxia makes hsa-miR-15b-5p a potential candidate to be a marker of erythropoiesis-stimulating agent abuse.

Keywords: cobalt, qPCR-RT, microRNA, doping control, erythropoiesis stimulants

For citation: Postnikov P.V., Radus F.V., Efimova Yu.A., Pronina I.V. Determination of possible microRNA-markers of cobalt abuse by real-time qPCR using hypoxia signaling pathway panels. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):65–74 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-65-75>

ВВЕДЕНИЕ

Соединения кобальта(II) до 80-х гг. XX века часто использовались для лечения различных форм анемий [1–3]. Механизм их действия связан с активацией транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией (англ. hypoxia-inducible factor (HIF)), приводящего к увеличению экспрессии гена эритропоэтина, ключевого регулятора выработки красных кровяных клеток – эритроцитов и увеличению кислородной емкости крови [4–6]. Однако при более детальном изучении возникающих вследствие приема больших доз кобальта серьезных побочных эффектов – острых отравлений, нарушений сердечного ритма, психических расстройств, а также стимуляции канцерогенеза [7–10], их использование для клинических целей прекратилось, им на смену пришли препараты рекомбинантных эпоэтинов [11]. Несмотря на это, профессиональные спортсмены используют различные биодобавки, содержащие кобальт, и даже суспензию хлорида кобальта(II) для повышения толерантности к физической нагрузке и аэробной выносливости, что может давать

конкурентные преимущества. Кобальт включен в Запрещенный список¹ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) и относится к «активаторам гипоксия-индуцируемого фактора» в соответствии со статьей S2 «Пептидные гормоны, факторы роста, подобные субстанции и миметики».

По состоянию на сегодняшний день лишь немногие антидопинговые лаборатории используют прямые методы определения кобальта: масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) [12–15], жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией [16, 17] или их комбинацию, а большинство и вовсе не включили эти подходы в свой методологический арсенал, что приводит к возникновению проблемы выявления факта злоупотребления солями этого элемента в качестве допингового агента. Помимо этого, ВАДА до сих пор не установило максимально допустимую пороговую концентрацию этого

¹ WADA Prohibited List 2022. URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2022list_final_en.pdf. Дата обращения 10.11.2022. / Accessed November 10, 2022.

элемента в биожидкостях и какие-либо критерии идентификации, что осложняет интерпретацию полученных результатов. В ряде работ [15, 18, 19] использован подход, основанный на сравнении соотношения уровня витамина В12 – источника кобальта, присутствующего в организме в естественном состоянии, измеренного иммунохимически, и концентрации общего кобальта, измеренной методом ИСП-МС. Несмотря на то, что данный подход действительно перспективен и может косвенно выявить наличие солей кобальта в организме, он довольно трудоемок для широких скрининговых исследований. Кроме того, несколько научных статей посвящены изучению эритропоэтических эффектов при приеме низких доз неорганического кобальта [4, 20]. Программа гематологического модуля биологического паспорта спортсмена (БПС)² позволяет косвенно определить возможные манипуляции с кровью и факт приема некоторых эритропоэстимулирующих агентов (ЭСА) за счет резкого увеличения концентрации гемоглобина, падения процентного содержания ретикулоцитов и анализа ряда других параметров. Однако установить, являются ли изменения в крови результатом высотных тренировок спортсменов или следствием приема запрещенных препаратов, не представляется возможным.

В связи с вышеперечисленным, существует необходимость разработки нового аналитического подхода косвенного определения злоупотребления солями кобальта, основанного на изменении профилей экспрессии микроРНК как следствия приема препаратов, содержащих кобальт. Такие изменения профилей малых некодирующих РНК крови могут выступать в качестве более ранних высокочувствительных маркеров ответа на физиологический или патологический стимул, чем биохимические [21–24].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы для исследования

Для исследования брали образцы плазмы крови добровольцев ($n = 10$), ведущих активный образ жизни, в возрасте 22–35 лет (контрольная группа), плазмы крови спортсменов, выступающих в дисциплине «спортивная ходьба» (группа 1), плазмы крови тех же добровольцев после приема биодобавки «Кобальт DS®»

² WADA Athlete biological passport operating guidelines. URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/guidelines_abp_v8_final.pdf. Дата обращения 15.11.2022. / Accessed November 15, 2022.

(Dr. Skalny, Россия) (группа 2) в течение 20 суток в количестве в 4 раза превышающей рекомендуемую дозировку (1 таблетка — 200 мкг аспарагината кобальта) после приема пищи. Для получения плазмы образцы венозной крови, взятой натощак, центрифугировали 10 мин при температуре 20 °С со скоростью 1500 об/мин на центрифуге Rotixa 50 RS (*Hettich Zentrifugen*, Германия). Весь объем плазмы отбирали и замораживали при –20 °С до исследований.

Добровольцы были проинформированы о целях эксперимента, от них было получено письменное согласие на использование их биологического материала в научных целях, исследование не противоречит Хельсинкской декларации³ и одобрено локальным комитетом по этике Московского научно-практического центра медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины Департамента здравоохранения г. Москвы. Образцы плазмы крови спортсменов отбирали согласно пункту 5.3.12.2 Международного Стандарта для Лабораторий⁴ и пункту 6.3 Всемирного антидопингового кодекса из архива лаборатории. Образцы крови добровольцев отбирали по правилам сбора образцов по программе БПС в вакуумные пробирки BD Vacutainer® Plus ЭДТА (K2EDTA) (*Becton Dickinson*, США) для гематологических исследований.

Выделение микроРНК из образцов плазмы крови

МикроРНК выделяли из 2 мл плазмы при помощи набора PAXgene Blood miRNA Kit (*PreAnalytiX*, Швейцария) по протоколу производителя с некоторыми модификациями. Внесение в стандартную методику изменений было необходимо в связи с тем, что кровь собирали не в специализированные пробирки PAXgene (*QIAGEN*, Германия), а в пробирки BD Vacutainer® Plus (*Becton Dickinson*, США). Использовались следующие модификации: 2 мл плазмы смешивали с 2 мл денатурирующего буферного раствора (2.7 М тиоцианата гуанидина, 1.3 М тиоцианата аммония, 100 мМ ацетата натрия, 5 мМ ЭДТА, pH 4.0), инкубировали при температуре 20–25 °С 20 мин, центрифугировали 10 мин при 14000g, оса-

³ Declaration of Helsinki of the World Medical Association. URL: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>. Дата обращения 15.11.2022. / Accessed November 15, 2022.

⁴ International Standard for Laboratories URL: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf. Дата обращения 15.11.2022. / Accessed November 15, 2022.

док промывали дважды, используя 2 мл деионизованной воды. После второй промывки осадок растворяли в 350 мкл буферного раствора BM1 из указанного выше набора, далее выделение микроРНК вели по протоколу производителя, смывали микроРНК с колонок двумя объемами по 40 мкл деионизованной воды.

Измерение концентрации микроРНК проводили с использованием флуориметра Fluo 100 (*Hangzhou Allsheng Instruments*, Китай) согласно инструкции. Выделенную микроРНК хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего использования.

Проведение обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора miScript[®] II RT Kit (*QIAGEN*, Германия) с использованием буферного раствора 5×miScript HiSpec Buffer по протоколу производителя на приборе C1000 Touch Thermal Cycler (*Bio-Rad*, США), для реакции брали 200 нг микроРНК, конечный объем реакционной смеси 20 мкл. Полученную кДНК хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед постановкой количественной ПЦР кДНК разводили добавлением 200 мкл деионизованной воды. Количественную ПЦР с детекцией в реальном времени проводили на ДНК-амплификаторе CFX96 (*Bio-Rad*, США) с помощью наборов miScript[®] SYBR[®] Green PCR Kit (*QIAGEN*, Германия) и панелей для исследования профилей экспрессии зрелых микроРНК сигнального пути гипоксии Hypoxia Signaling Pathway miScript[®] miRNA PCR Array (*QIAGEN*, Германия). Программа ПЦР: инициация $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 мин, 40 циклов ($94\text{ }^{\circ}\text{C} - 15\text{ с}$, $55\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$, $70\text{ }^{\circ}\text{C} - 30\text{ с}$). Контроли прохождения обратной транскрипции и ПЦР, а также референсные гены включены в состав панели.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения CFX Maestro Software (*Bio-Rad*, США) и онлайн программного обеспечения GeneGlobe (*QIAGEN*, Германия). Данные проведенных экспериментов объединяли в одно исследование. В работе определяли нормализованную экспрессию микроРНК ($\Delta\Delta\text{Ct}$), нормализацию проводили на референсные РНК, содержащиеся в использованной панели Hypoxia Signaling Pathway miScript[®] miRNA PCR Array (*QIAGEN*, Германия). По коэффициентам вариации (CV) и значениям среднего геометрического (M -Value) в качестве референсных были

выбраны SNORD68 (CV 0.3690, M 0.8174), SNORD95 (CV 0.0282, M 0.5652), SNORD96a (CV 0.3951, M 0.8783) со средними величинами стабильности CV 0.2641 и M 0.7537, т.к. для гетерогенных образцов рекомендуется использовать референсные РНК с CV < 0.5 и M < 1.0. При расчете относительной нормализованной экспрессии микроРНК ($\Delta\Delta\text{Ct}$) использовались усредненные значения ΔCt опытной группы против контрольной группы. Значимыми признавались величины $\Delta\Delta\text{Ct} < 2^{-2}$ и $2^2 < \Delta\Delta\text{Ct}$ ($p < 0.01$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ЭСА чаще применяются в видах спорта, ориентированных на продолжительные физические нагрузки и длинные дистанции (легкая атлетика, велоспорт, спортивная ходьба, биатлон и др.), для улучшения снабжения органов и тканей организма кислородом, и увеличения выносливости. Однако, следует учитывать, что у атлетов развивается вызванное физической нагрузкой состояние гипоксии, которое само по себе способствует активации HIF и запуску процесса эритропоэза. Поэтому обнаружение разницы в маркерах сигнального пути гипоксии при анаэробной физической нагрузке и при применении запрещенного ВАДА кобальта для современного допинг-контроля весьма актуально.

В большей части исследованных образцов экспрессия микроРНК изменялась незначительно или достоверность полученных данных была ниже $p = 0.01$. На рис. 1 представлено сравнение уровней экспрессии циркулирующих в плазме микроРНК сигнального пути гипоксии в экспериментальных группах 1 (спортсмены) и 2 (добровольцы, принимающие биологически активную добавку (БАД) «Кобальт DS[®]»).

По оси абсцисс отложен логарифм (Log 2) отношения уровня экспрессии микроРНК в группе 2 к уровню экспрессии той же микроРНК в группе 1. Сплошная вертикальная линия соответствует отсутствию изменения уровня экспрессии, пунктирные вертикальные линии соответствуют снижению или увеличению уровня экспрессии в группе 2 по сравнению с группой 1 в 4 раза.

По оси ординат отложен отрицательный логарифм ($-\text{Log } 10$) значения p (p -value), отражающий значимость полученных результатов. Сплошная горизонтальная линия соответствует $p = 0.01$. Таким образом, изменения уровня экспрессии, отраженные на данном графике над сплошной горизонтальной линией, являются статистически значимыми, а отраженные под ней – не обладают статистической значимостью.

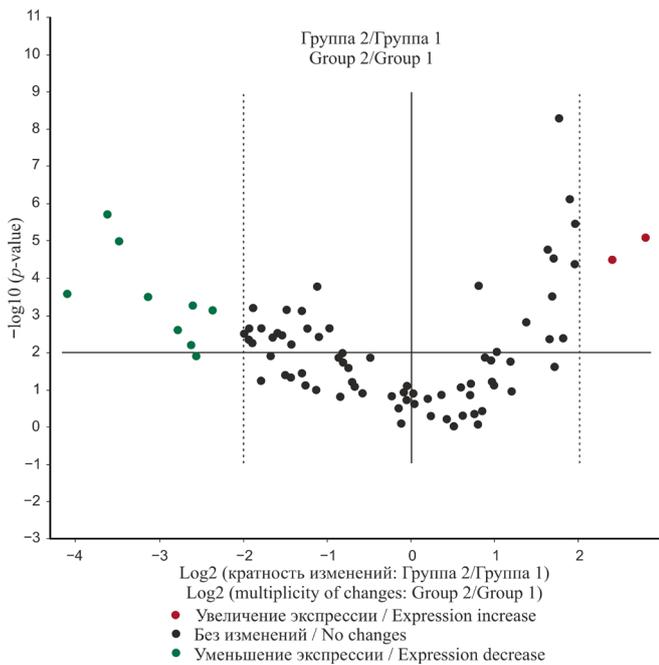


Рис. 1. Сравнение уровней экспрессии циркулирующих в плазме микроРНК сигнального пути гипоксии в экспериментальных группах 1 (спортсмены) и 2 (добровольцы, принимающие БАД «Кобальт DS®»).
Fig. 1. Comparison of expression levels of microRNAs of the hypoxia signaling pathway circulating in plasma in experimental groups 1 (athletes) and 2 (volunteers taking dietary supplements Cobalt DS®).

На основании анализа данных по уровням циркулирующих в плазме микроРНК в трех исследованных группах были отобраны девять микроРНК, экспрессия которых стабильно определяется во всех образцах и изменяется в условиях гипоксии, как вызванной аэробными нагрузками, так и вызванной приемом БАД, содержащей кобальт (табл.). К ним относятся miR-135a-5p, miR-15b-5p, miR-199b-5p, miR-200b-3p, miR-203a-3p, miR-204-5p, miR-26a-5p, miR-449a, miR-504-5p (рис. 2).

На рис. 2 видно, что семь (miR-135a-5p, miR-199b-5p, miR-200b-3p, miR-203a-3p, miR-204-5p, miR-449a, miR-504-5p) из девяти выбранных микроРНК у спортсменов экспрессируются на более высоком уровне, чем у добровольцев, не занимающихся спортом. После приема «Кобальт DS®» уровень их экспрессии также повышен, но значительно ниже, чем у спортсменов.

С нашей точки зрения, использование данных семи микроРНК в качестве маркеров применения ЭСА будет практически затруднено. Это возможно только при отслеживании уровней их экспрессии во времени подобно программе гематологического модуля БПС. Уровень miR-26a-5p между группами меняется незначительно.

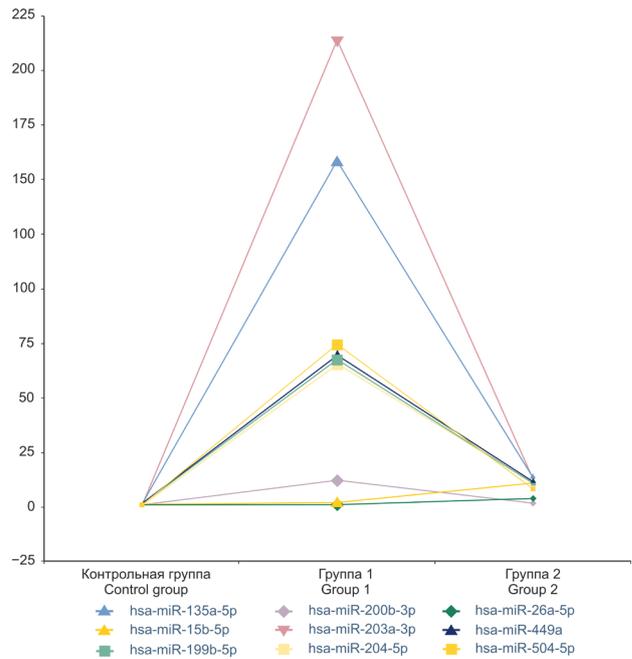


Рис. 2. Линейная диаграмма, отражающая изменение экспрессии выбранных циркулирующих микроРНК в различных группах. Исходя из данных, представленных на рисунке видно, что в группе 2 наблюдается увеличение экспрессии всех микроРНК, кроме miR-15b-5p, чья экспрессия остается неизменной, но при приеме БАД «Кобальт DS®» она увеличивается.
Fig. 2. Line diagram showing changes in the expression of selected circulating miRNAs in different groups. Based on the data presented in the figure, it can be seen that in group 2, there is an increase in the expression of all miRNAs, except for miR-15b-5p, whose expression remains unchanged, but when taking dietary supplements Cobalt DS®, it increases.

Специалистам в области спортивной медицины, непосредственно работающим со спортсменами, также возможно будут интересны hsa-miR-135a-5p и hsa-miR-203a-3p. Уровень данных микроРНК в плазме крови спортсменов в 11.2 (hsa-miR-135a-5p) и 17.1 (hsa-miR-203a-3p) раз выше у спортсменов, чем у добровольцев (табл.). Сравнение уровней данных микроРНК у спортсменов с различным уровнем подготовки и/или у спортсменов разных видов спорта позволило бы предположить возможность их использования как маркеров физической подготовки в целом или маркеров устойчивости к анаэробным нагрузкам, в частности. С научной точки зрения, интересно определить, является ли высокий уровень данных микроРНК генетически обусловленным. Исследования Guo с соавторами [25] показали, что has-miR-135a-5p снижает число апоптотических клеток миокарда и воспаление после инфаркта миокарда за счет ингибирования экспрессии белков воспаления: TNF- α , IL-1 β и IL-6. Также

Таблица. Отношение уровней экспрессии циркулирующих микроРНК в группе 2 (добровольцы, принимающие БАД «Кобальт DS®») к таковому в группе 1 (спортсмены), усредненные данные по группам
Table. The ratio of expression levels of circulating miRNAs in group 2 (volunteers taking dietary supplements Cobalt DS®) to that in group 1 (athletes), group averages

Номер ячейки	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	hsa-let-7a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-let-7c-5p	hsa-let-7d-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-let-7f-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-107	hsa-miR-10b-5p
	3.38	2.02	2.59	3.86	3.24	3.69	3.09	1.50	-2.48	-1.06	-5.16	-3.47
B	hsa-miR-122-5p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-138-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-148b-3p
	-3.16	1.97	-1.81	1.74	1.84	-11.16	-2.18	-2.18	-1.17	1.01	-1.11	-1.63
C	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-184	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-188-5p
	1.28	1.14	-2.80	6.89	1.41	1.94	-1.80	3.50	-3.18	-2.82	-1.76	-2.48
D	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-203a-3p	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-20a-5p
	3.86	1.62	1.68	1.18	-6.19	-2.40	-3.84	-6.87	-17.09	-6.07	-3.73	2.29
E	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-215-5p	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-26b-5p
	-1.76	-1.50	-2.69	1.52	-1.04	-3.03	-2.15	3.12	1.34	-1.04	5.23	3.25
F	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-429
	-1.40	1.73	-3.45	-1.60	-3.82	1.62	1.02	-1.09	-2.70	-1.96	-1.69	-12.29
G	hsa-miR-449a	hsa-miR-451a	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-504-5p	hsa-miR-5p	hsa-miR-877-3p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-935	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-9-5p	hsa-miR-98-5p	hsa-miR-99a-5p
	-5.90	1.79	-2.35	-8.79	2.26	-3.69	1.92	-2.91	3.20	-2.20	-1.02	-3.94

Примечание: А – экспрессия данной микроРНК крайне вариабельна среди индивидуумов не зависимо от того, к какой группе они относятся. Скорее всего данную микроРНК нельзя будет использовать в качестве биологического маркера применения запрещенных веществ; В – экспрессия данной микроРНК относительно низка как в контрольных, так и в экспериментальных образцах. В некоторых образцах данная микроРНК не обнаружена вовсе. Таким образом, возможность использования данной микроРНК в качестве маркера применения ЭСА также маловероятна.

Note: А – the expression of this microRNA is highly variable among individuals, regardless of which group they belong to. Most likely, this microRNA cannot be used as a biological marker for the use of prohibited substances; В – the expression of this miRNA is relatively low in both control and experimental samples. In some samples, this miRNA was not detected at all. Thus, the possibility of using this microRNA as a marker for the use of ESA is also unlikely.

hsa-miR-135a-5p напрямую взаимодействует с ингибитором гипоксией индуцируемого фактора 1 альфа (HIF1AN), снижая его экспрессию и, таким образом, косвенно повышая экспрессию генов, ответственных за процессы остеогенеза [26]. Путем скрининга онлайн-баз данных в работе [27] предсказали и затем доказали экспериментально, что has-miR-135a-5p потенциально может участвовать в регуляции TRPC1 белков (кальциевых каналов

транзитного рецепторного потенциала (TRPC)). TRPC1 является дифференциальным регулятором событий, опосредованных гипоксией. Блокирование TRPC1 уменьшает индуцированную гипоксией аутофагию, что способствует выживанию клеток в условиях гипоксии. Hsa-miR-203a-3p по данным [28] препятствует развитию ишемического инсульта за счет подавления апоптоза, окислительного стресса и воспаления.

Наиболее интересной из 84 исследованных микроРНК нам представляется hsa-miR-15b-5p, т.к. ее экспрессия у спортсменов (группа 1) остается неизменной, как и у добровольцев контрольной группы, а после приема «Кобальт DS®» ее экспрессия заметно выше (группа 2). Ранее hsa-miR-15b-5p уже исследовалась в связи с поиском маркеров устойчивости к «горной болезни», вызывающей отек легких и отек мозга в условиях гипоксии на высотах более 2500 м над уровнем моря [29]. Испытуемые с более высоким начальным уровнем hsa-miR-15b-5p легче переносили условия гипоксии, признаков развития «горной болезни» у них не наблюдалось.

Обнаруженная нами явная разница в уровнях экспрессии при гипоксии, вызванной анаэробной физической нагрузкой, и имитацией гипоксии за счет применения препарата кобальта делает hsa-miR-15b-5p потенциальным претендентом на роль маркера злоупотребления ЭСА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных пилотных исследований по сравнению уровней циркулирующих микроРНК плазмы крови добровольцев, профессиональных спортсменов, задействованных в видах спорта, ориентированных на выносливость, и тех же добровольцев после приема биодобавки, содержащей кобальт, были отобраны микроРНК-кандидаты, экспрессия которых стабильно определялась во всех образцах и изменялась в условиях гипоксии, как вызванной аэробными нагрузками, так и вызванной приемом БАД. Особый интерес, в качестве возможного потенциального маркера косвенного определения активаторов HIF, представляет hsa-miR-15b-5p, экспрессия которой заметно возрастает после 20-дневного применения «Кобальт DS®», но остается неизменной при длительной физической нагрузке. Для уточнения полученных данных

требуется расширение выборки исследуемых образцов. Ввиду отсутствия установленного ВАДА порогового значения для прямого определения концентрации общего кобальта в плазме и моче, поиск новых маркеров злоупотребления допингом ЭСА имеет несомненную практическую значимость для целей допинг-контроля, так как они могут выступать в качестве дополнительного доказательства приема запрещенных миметиков гипоксии.

Вклад авторов

П.В. Постников – формулирование целей и задач, обсуждение экспериментов и результатов, проведение экспериментальных исследований, написание и редактирование текста статьи, правка финальной версии статьи, подготовка материалов к публикации;

Ф.В. Радус – содействие в проведении экспериментальных исследований, обсуждение экспериментов и результатов;

Ю.А. Ефимова – обсуждение экспериментов и результатов, правка финальной версии статьи, подготовка материалов к публикации;

И.В. Пронина – формулирование целей и задач, обсуждение экспериментов и результатов, проведение экспериментальных исследований, написание и редактирование текста статьи, правка финальной версии статьи.

Authors' contributions

P.V. Postnikov – formulation of aims and objectives, discussion of experiments and results, conducting experimental research, writing and editing the text of the article, editing the final version of the article, and preparing materials for publication;

F.V. Radus – assistance in conducting experimental research, discussion of experiments and results;

Yu.A. Efimova – discussion of experiments and results, editing the final version of the article, and preparing materials for publication;

I.V. Pronina – formulation of aims and objectives, discussion of experiments and results, conducting experimental research, writing and editing the text of the article, editing the final version of the article.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Robinson J.C., James III G.W., Kark R.M. The effect of oral therapy with cobaltous chloride on the blood of patients suffering with chronic suppurative infection. *New Engl. J. Med.* 1949;240(19):749–753. <https://doi.org/10.1056/NEJM194905122401902>
2. Ebert B., Jelkmann W. Intolerability of cobalt salt as erythropoietic agent. *Drug Test. Anal.* 2014;6(3):185–189. <https://doi.org/10.1002/dta.1528>

3. Pronina I.V., Mochalova E.S., Efimova Yu. A., Postnikov P.V. Biological functions of cobalt and its toxicology and detection in anti-doping control. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine. Chem. Technol.* 2021;16(4):318–336 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-4-318-336>

4. Hoffmeister T., Schwenke D., Wachsmuth N., Krug O., Thevis M., Byrnes W.C., Schmidt W.F.J. Erythropoietic effects of low-dose cobalt application. *Drug Test Anal.* 2019;11(2):200–207. <https://doi.org/10.1002/dta.2478>

5. Beuck S., Schanzer W., Thevis M. Hypoxia-inducible factor stabilizers and other small-molecule erythropoiesis-stimulating agents in current and preventive doping analysis. *Drug Test. Anal.* 2012;4(11):830–845. <https://doi.org/10.1002/dta.390>
6. Muñoz-Sánchez J., Chánez-Cárdenas M.E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* 2019;39(4):556–570. <https://doi.org/10.1002/jat.3749>
7. Finley B.L., Monnot A.D., Paustenbach D.J., Gaffney S.H. Derivation of a chronic oral reference dose for cobalt. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2012;64(3):491–503. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.08.022>
8. Gault N., Sandre C., Poncy J.-L., Moulin C., Lefaix J.-L., Bresson C. Cobalt toxicity: chemical and radiological combined effects on HaCaT keratinocyte cell line. *Toxicol. in Vitro.* 2010;24(1):92–98. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.027>
9. Catalani S., Rizzetti M.C., Padovani A., Apostoli P. Neurotoxicity of cobalt. *Hum. Exp. Toxicol.* 2012;31(5):421–437. <https://doi.org/10.1177/0960327111414280>
10. Gómez-Arnaiz S., Tate R.J., Grant M.H. Cytotoxicity of cobalt chloride in brain cell lines – a comparison between astrocytoma and neuroblastoma cells. *Toxicol. in Vitro.* 2020;68:104958. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104958>
11. Jelkmann W. Efficacy of recombinant erythropoietins: Is there unity of international units? *Nephrol. Dial. Transpl.* 2009;24(5):1366–1368. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp058>
12. Krug O., Kutscher D., Piper T., Geyer H., Schänzer W., Thevis M. Quantifying cobalt in doping control urine samples – a pilot study. *Drug Test. Anal.* 2014;6(11–12):1186–1190. <https://doi.org/10.1002/dta.1694>
13. Ho E.N.M., Chan G.H.M., Wan T.S.M., Curl P., Riggs C.M., Hurley M.J., Sykes D. Controlling the misuse of cobalt in horses. *Drug Test. Anal.* 2015;7(1):21–30. <https://doi.org/10.1002/dta.1719>
14. Thevis M., Krug O., Piper T., Geyer H., Schanzer W. Solutions Advertised as Erythropoiesis-stimulating Products were Found to Contain Undeclared Cobalt and Nickel Species. *Int. J. Sports Med.* 2016;37(1):82–84. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569350>
15. Knoop A., Görgens C., Geyer H., Thevis M. Elevated urinary cobalt concentrations identified in routine doping controls can originate from vitamin B₁₂. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2020;34(7):e8649. <https://doi.org/10.1002/rcm.8649>
16. Sobolevsky T., Ahrens B. Measurement of urinary cobalt as its complex with 2-(5-chloro-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the purpose of anti-doping control. *Drug Test. Anal.* 2021;13(6):1145–1157. <https://doi.org/10.1002/dta.3004>
17. Minakata K., Suzuki M., Suzuki O. Application of electrospray ionization tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cobalt in urine. *Anal. Chim. Acta.* 2008;614(2):161–164. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.043>
18. Hillyer L.L., Ridd Z., Fenwick S., Hincks P., Paine S.W. Pharmacokinetics of inorganic cobalt and a vitamin B₁₂ supplement in the Thoroughbred horse: differentiating cobalt abuse from supplementation. *Equine Vet. J.* 2018;50(3):343–349. <https://doi.org/10.1111/evj.12774>
19. Postnikov P.V., Ordzhonikidze Z.G., Badietva V.A., Turin I.A., Pavlov V.I. Determination of cobalt in plasma blood samples by the ICP-MS method after oral intake of low doses of Co-containing dietary supplements. *Voprosy pitaniia = Problems of Nutrition.* 2022;91(6):100–109.
20. Hoffmeister T., Schwenke D., Krug O., Wachsmuth N., Geyer H., Thevis M., Byrnes W.C., Schmidt W.F.J. Effects of 3 Weeks of Oral Low-Dose Cobalt on Hemoglobin Mass and Aerobic Performance. *Front. Physiol.* 2018;9:1289. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01289>
21. Postnikov P.V., Efimova Yu. A., Pronina I.V. Circulating MicroRNAs as a New Class of Biomarkers of Physiological Reactions of the Organism to the Intake of Dietary Supplements and Drugs. *Microna.* 2022;11(1):25–35. <http://dx.doi.org/10.2174/2211536611666220422123437>
22. Пронина И.В., Постников П.В., Павлов В.И., Орджоникидзе З.Г. Сравнение профилей экспрессии микроРНК атлетов, выступающих в видах спорта, ориентированных на выносливость, и добровольцев, не занимающихся спортом, с использованием панели сигнального пути гипоксии. *Спортивная медицина наука и практика.* 2022;12(2):13–21. <https://doi.org/10.47529/2223-2524.2022.2.10>
- [Pronina I.V., Postnikov P.V., Pavlov V.I., Ordzhonikidze Z.G. Comparison of micron expression profiles of athletes involved in endurance sports and non-athletic volunteers using a signaling pathway panel. *Sportivnaya meditsina nauka i praktika = Sport Medicine: research and Practice.* 2022;12(2):13–21 (in Russ.). <https://doi.org/10.47529/2223-2524.2022.2.10>]
23. Sessa F., Salerno M., Di Mizio G., Bertozzi G., Messina G., Tomaiuolo B., Pisanelli D., Maglietta F., Ricci P., Pomara C. Anabolic Androgenic Steroids: Searching New Molecular Biomarkers. *Front. Pharmacol.* 2018;9:1321. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01321>
24. Leuenberger N., Saugy M. Circulating microRNAs: The Future of Biomarkers in Anti-doping Field. In: Santulli G. (Ed.). *MicroRNA: Medical Evidence. Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2015;888:401–408. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_20
25. Guo X.-Y., Liu Q.-L., Liu W., Cheng J.-X., Li Z.-J. Effect and mechanism of miR-135a-5p/CXCL12/JAK-STAT axis on inflammatory response after myocardial infarction. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020;24(24):12912–12928. https://doi.org/10.26355/eurrev_202012_24195
26. Yin N., Zhu L., Ding L., Yuan J., Du L., Pan M., Xue F., Xiao H. MiR-135-5p promotes osteoblast differentiation by targeting HIF1AN in MC3T3-E1 cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2019;24:51. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0177-6>
27. Zhang Z., Ren L., Zhao Q., Lu G., Ren M., Lu X., Yin Y., He S., Zhu C. TRPC1 exacerbate metastasis in gastric cancer via ciRS-7/miR-135a-5p/TRPC1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020;529(1):85–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.181>
28. Li Y., Peng B., Li Y., Huang A., Peng Y., Yu Q., Li Y. MiR-203a-3p/153-3p improves cognitive impairments induced by ischemia/reperfusion via blockade of SRC-mediated MAPK signaling pathway in ischemic stroke. *Chem. Biol. Interact.* 2022;358:109900. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109900>
29. Huang H., Dong H., Zhang J., Ke X., Li P., Zhang E., Xu G., Sun B., Gao Y. The Role of Salivary miR-134-3p and miR-15b-5p as Potential Non-invasive Predictors for Not Developing Acute Mountain Sickness. *Front. Physiol.* 2019;10:898. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00898>

Об авторах:

Постников Павел Викторович, к.х.н., начальник отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский переулок, д. 10, стр. 1). E-mail: postnikov@dopingtest.ru. Scopus Author ID 57021610900, SPIN-код РИНЦ 7251-9937, <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

Радус Федор Валерьевич, ассистент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: radus20@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0938-9609>

Ефимова Юлия Александровна, к.х.н., доцент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: efimova_yulia@bk.ru. Scopus Author ID 25228417800, <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

Пронина Ирина Валерьевна, к.б.н., главный специалист отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (105005, Россия, Москва, Елизаветинский переулок, д. 10, стр. 1); старший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (125315, Россия, Балтийская ул., д. 8). E-mail: zolly_sten@mail.ru. Scopus Author ID 8161867200, ResearcherID G-3951-2014, SPIN-код РИНЦ 5706-2369, <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

About the authors:

Pavel V. Postnikov, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: postnikov@dopingtest.ru. Scopus Author ID 57021610900, RSCI SPIN-code 7251-9937, <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

Fedor V. Radus, Assistant, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: radus20@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0938-9609>

Yuliya A. Efimova, Cand. Sci. (Chem.), Assistant Professor, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: efimova_yulia@bk.ru. Scopus Author ID 25228417800, <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

Irina V. Pronina, Cand. Sci. (Chem.), Main Specialist, Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia); Senior Researcher, Pathogenomics and Transcriptomics Laboratory, Institute of General Pathology and Pathophysiology (8, ul. Baltiiskaya, Moscow, 125315, Russia). E-mail: zolly_sten@mail.ru. Scopus Author ID 8161867200, ResearcherID G-3951-2014, RSCI SPIN-code 5706-2369, <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

*Поступила: 22.12.2022; получена после доработки: 27.12.2022; принята к опубликованию: 30.01.2023.
The article was submitted: December 22, 2022; approved after reviewing: December 27, 2022; accepted for publication: January 30, 2023.*