

**ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ
МОЛЕКУЛ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ
ЗАБОЛЕВАНИЕ COVID-19**

Абрамова Н.Д.¹,
Калюжная Н.О.¹,
Меремьянина Е.А.¹,
Богданова Е.А.²,
Костинов М.П.^{1,2},
Свитич О.А.^{1,2},

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени
И.И. Мечникова», Москва, РФ,

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), Москва, РФ,

**CHANGES IN THE MOLECULAR GENETIC PROFILE OF INNATE
IMMUNE MOLECULES IN INDIVIDUALS WHO HAVE HAD COVID-19
DISEASE**

Abramova N. D. ^a,
Kalyuzhnaya N. O. ^a,
Meremianina E. A. ^a,
Bogdanova E. A. ^b,
Kostinova M.P. ^b,
Sviticha O. A. ^b

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russian Federation),

^b I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University)

Резюме

Введение. Заболевание COVID-19 в 2020 году получило статус пандемии. За этот период было выявлено, что тяжесть течения заболевания патологии может зависеть не только от штамма вируса, но и от функционирования иммунной системы. **Цель.** Изучение особенностей экспрессионных и генетических факторов врожденного иммунитета у пациентов, перенесших заболевание COVID-19. **Материалы и методы.** Был изучен материал от 148 пациентов (соскобы со слизистых оболочек и венозная кровь). Идентификация изучаемых маркеров проводилась методами обратной транскрипции и ПЦР-РВ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни, точного критерия Фишера, критерия χ^2 , отношения шансов и 95% доверительного интервала. **Результаты.** В ходе проведенного нами исследования была показана прогностическая роль полиморфных маркеров и гаплотипов в генах TLR9 (rs352140 и rs5743836) и TLR4 (rs11536889 и rs4986791) в отношении риска развития тяжелого течения инфекции SARS-CoV-2. При изучении отдаленных последствий COVID-19 было выявлено, что у пациентов, перенесших заболевание, сохраняется дисбаланс экспрессии рецепторных и эффекторных молекул на уровне мукозального иммунитета. Наблюдается снижение уровня экспрессии как рецепторных молекул (TLR3, TLR7) так и факторов противовирусного иммунного ответа (IL28) в слизистых ротоглотки на фоне общего увеличения этих маркеров в эпителиальных клетках слизистой оболочки носоглотки. **Заключение.** Были изучены экспрессионные и генетические факторы врожденного иммунитета, приводящие к тяжелому течению инфекции SARS-CoV-2 и, как следствие, к стойким изменениям в иммунной системе в течение длительного времени после выздоровления, что расширяет наши знания о молекулярно-генетических механизмах, связанных с длительным течением COVID-19. Полученные в ходе исследования результаты могут помочь оценить риски развития тяжелого течения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и развивающихся впоследствии осложнений у госпитализированных пациентов.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, COVID-19, SARS-CoV-2, экспрессия генов, врожденный иммунитет, полиморфизм генов, SNP.

Abstract

Introduction. In 2020 COVID-19 was declared to be a pandemic. Since then it was revealed that the severity of the disease pathology may depend not only on the viral strain, but also on the functioning of the immune system. **Target.** To study characteristics of expression and genetic factors of innate immunity in patients who have had COVID-19. **Materials and methods.** Material (scrapings from the mucous membranes and venous blood) from 148 patients was studied. Identification of the studied markers was carried out using reverse transcription and RT-PCR methods. Statistical analysis of the results was carried out using the Mann-Whitney test, Fisher's exact test, χ^2 test, odds ratio and 95% confidence interval. **Results.** Our study demonstrated the prognostic role of polymorphic markers and haplotypes in the TLR9 (rs352140 and rs5743836) and TLR4 (rs11536889 and rs4986791) genes in relation to the risk of developing severe SARS-CoV-2 infection. As the result of studying the long-term effects of COVID-19 it was revealed that an imbalance in the expression of receptor and effector molecules at the mucosal level of the immune system remains in patients who have had the disease. There is a decrease in the expression level of both receptor molecules (TLR3, TLR7) and antiviral immune response factors (IL28) in the mucous membranes of the oropharynx with the background of a general increase of these markers in the epithelial cells of the nasopharyngeal mucosa. **Conclusion.** The expression and genetic factors of innate immunity leading to severe SARS-CoV-2 infection and, consequently, persistent changes in the immune system long after recovery, have been studied, which expands our knowledge of the molecular genetic mechanisms associated with the long-term course of COVID-19. The results obtained during the study can help assess the risks of developing severe infection caused by SARS-CoV-2 and developing complications in hospitalized patients.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, gene expression, innate immune response, Genetic Polymorphisms, SNP

1 Введение

Заболевание COVID-19 в 2020 году получило статус пандемии, которая привела к глобальному кризису общественного здравоохранения с беспрецедентной заболеваемостью. Из-за высокой контагиозности вируса SARS-CoV-2 заболевание быстро распространилось по всему земному шару. За весь период пандемии было зарегистрировано более пяти волн роста числа инфицированных, что связано со способностью вируса SARS-CoV-2 часто мутировать. Появление новых штаммов таких как Alpha, Beta, Delta, Gamma и Omicron и др. свидетельствует о быстром эволюционном процессе вирусных частиц и о дальнейшей возможности появления новых вариантов вируса, которые будут нести серьезную угрозу жизни и здоровья населения. За период пандемии было выявлено, что тяжесть течения заболевания COVID-19 может зависеть не только от штамма вируса, но и от других факторов. Так, например, возраст и общее состояние здоровья и иммунной системы человека, наличие или отсутствие сопутствующих хронических заболеваний, генетическая предрасположенность, а также индивидуальный уровень макро- и микроэлементов в значительной степени влияют на тяжесть протекания заболевания COVID-19. Поскольку у пациентов, перенёсших заболевание COVID-19, происходит нарушение баланса во врожденном и адаптивном иммунитете, можно говорить о том, что COVID-19 является иммуноопосредованным заболеванием[9]. Ключевую роль в запуске всех воспалительных процессов играют рецепторы, взаимодействующие с вирусом SARS-CoV-2 на уровне входных ворот, а именно в слизистых оболочках ротовой полости и носоглотки[15]. Помимо уже хорошо изученного при данной патологии рецептора ACE2, огромное значение имеют паттерн-распознающие рецепторы (PRRs)[5, 7, 23]. Одним из основных семейств PRRs являются Toll-подобные рецепторы (TLRs). TLRs воспринимают широкий спектр микробных компонентов и вызывают врожденные иммунные реакции. Все сигнальные пути, запускаемые TLRs, завершаются активацией ядерного фактора транскрипционного фактора-каппаВ (NF-κB), который контролирует экспрессию множества генов воспалительных цитокинов. Для активации NF-κB также необходимы реакции фосфорилирования и деградации ингибирующих белков κB (IκB), которые запускаются при помощи киназ. Кроме того, TLRs могут активировать альтернативные пути, которые также вызывают противовирусные врожденные иммунные реакции[10]. Исходя из этого, TLRs представляют собой связующее звено между врожденным и адаптивным иммунитетом, регулируя активацию антигенпрезентирующих клеток и ключевых цитокинов. Также TLRs могут напрямую регулировать активацию, рост, дифференцировку, развитие и функционирование Т-клеток[12, 23].

Таким образом, количество и функциональная активность TLRs играют определяющую роль в запуске и протекании каскада иммунных реакций при инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваниях. Сигнальные каскады, которые запускаются PRRs, в том числе TLRs, приводят к

транскрипции генов и экспрессии таких провоспалительных цитокинов, как, например, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкин-1 бета (IL-1 β) и др.[7, 14]. Значительный выброс этих цитокинов приводит к гиперактивации иммунной системы. Длительное протекание воспалительных процессов, к которым может привести избыточный выброс TNF α , IL-1 β и других цитокинов, способны вызвать длительную дисфункцию иммунитета, приводя к тяжелому течению COVID-19 и осложнениям сопутствующих хронических заболеваний[11, 17, 25].

Исследование экспрессионного профиля рецепторных и эффекторных молекул на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей поможет лучше понять молекулярные механизмы патогенеза COVID-19. Экспрессионная активность этих факторов, в свою очередь, определяется генетическими особенностями индивидуума, поэтому немаловажную роль играет анализ полиморфных маркеров в генах рецепторов врожденного иммунитета. Таким образом, целью данного исследования было изучение особенностей экспрессионного профиля рецепторных и эффекторных молекул и генетических факторов врожденного иммунитета у пациентов, перенесших заболевание COVID-19.

2 Материалы и методы

Исследование генетического и экспрессионного профиля молекул врожденного иммунитета было проведено на клинической базе ГKB 57 имени Д.Д. Плетнева. В настоящем исследовании приняли участие 148 пациентов: 123 пациента перенесли COVID-19; контрольную выборку составили 25 условно-здоровых человек (не заболевшие после контакта с инфицированным лицом). Сбор образцов для анализа проходил в период сентября 2020 года по январь 2021 года. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Для проведения этого исследования был пройден локальный этический комитет ФГБНУ НИИ ВС им. И.И.Мечникова. В ходе заседания был составлен протокол №1(25.01.2023 № 16/01). По документам предоставляем в локальный этический комитет было сделано заключение о том, что проводимое научное исследование обосновано и одобрено.

Все пациенты, принимавшие участие в исследовании, были отобраны в соответствии со специальными характеристиками исследуемых групп – критериями включения и исключения. Критериями включения в группу были следующие аспекты: пациенты в возрасте 18-35 лет, имеющие в анамнезе типичные симптомы коронавирусной инфекции, подтвержденные ПЦР тестом. Исследование было проведено у лиц, русской популяции проживающих в московском регионе; лица, которые принадлежали другим этническим группам были исключены из исследования.

Учитывались следующие проявления: нарушение обоняния (аносмия, гипосмия), кашель с мокротой, заложенность носа, ринорея, гипертермия, мышечные боли, а также физические признаки пневмонии (фокус крепитации и/или мелкопузырчатых хрипов, укорочение перкуторного звука, жесткое бронхиальное дыхание), лейкоцитоз $> 10 \cdot 10^9/\text{л}$ и палочкоядерный сдвиг $>$

10%. Критериями исключения являлись: пациенты в возрасте младше 18 лет и старше 35 лет, принимающие иммуномодулирующую терапию и/или имеющие обострения сопутствующих хронических заболеваний. Помимо всего прочего из исследования исключались женщины с подтвержденной беременностью/лактацией.

Для оценки экспрессионного профиля рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета были исследованы материалы от пациентов (n=25), перенесших заболевание COVID-19. Контрольную группу составили пациенты, контактировавшие с больными COVID-19, но с отрицательным результатом на наличие вируса или антител к вирусу SARS-CoV-2 в ПЦР-РВ и хемилюминесцентном иммуноанализе. Забор биологического материала осуществлялся в контрольных точках исследования: 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев после перенесенного заболевания COVID-19. В работе использовали биоматериал в виде соскобов слизистых оболочек ротоглотки, носоглотки и ротовой полости. Забор материала производился цитощеточкой типа А (Юнона, РФ) и транспортировался в лабораторию в пробирке на 1,5 мл в физиологическом растворе (Панеко, РФ) в закрытом пакете. Для изучения генетических маркеров осуществлялся забор венозной крови: в группу с тяжелым течением COVID-19 вошло 99 человек, с легким течением – 24 человека, контрольную группу составили 25 человек.

Из полученного биоматериала выделяли нуклеиновые кислоты методом сорбции на селикагеле с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (Amplisense, Россия) в соответствии с инструкцией. Проверка качества выделенной РНК для исследования экспрессии генов *TLR3*, *TLR7*, *IL1 β* , *IL28*, *TNF- α* осуществлялась с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000® (Thermo Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции и последующий анализ методом ПЦР-РВ проводили с помощью коммерческих наборов «Набор для обратной транскрипции ОТ-1» и «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Последовательность праймеров для генов *TLR3*, *TLR7*, *IL1 β* , *IL28*, *TNF- α* подбирали с помощью программы Vector NTI, анализируя последовательность интересующих генов, полученную из GenBank[1, 2]. Стандартизация результатов ПЦР-РВ проводилась по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства» β -актина. Обхват экспрессии гена был посчитан методом относительного анализа экспрессии гена $\Delta\Delta C_t$ [22]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Манна-Уитни (GraphPad Prism ver.8, США). Данные на графиках представлены в виде медианных значений.

Идентификация полиморфных маркеров в генах *IL28B*, *TLR4* и *TLR9* также осуществлялась при помощи ПЦР-РВ. Для идентификации полиморфных маркеров в гене *IL28B* были использованы готовые коммерческие наборы фирмы «Синтол» (РФ). Для оценки полиморфных маркеров rs352140 (*TLR9*) и rs11536889 (*TLR4*) были использованы реактивы из «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, РФ) и специально

синтезированные праймеры и зонды (Синтол, РФ). Исследование полиморфных маркеров rs5743836 (TLR9) и rs4986791 (TLR4) осуществлялось при помощи адаптированной методики с использованием коммерческих наборов фирмы «Литех» (РФ) и «Набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Статистический анализ был выполнен с применением точного критерия Фишера (Fi) (FisherExact.exe, Dr.Haseeb A.Khan, Саудовская Аравия, <http://www.biometrika.tomsk.ru>), критерия χ^2 , критерия χ^2 с поправкой Йейтса, расчётом отношения шансов и 95% доверительного интервала (Microsoft Excel 2016, США).

3 Результаты и обсуждение

При заражении COVID-19 на уровне слизистых оболочек ротовой полости и носоглотки вирус SARS-CoV-2 контактирует с PRRs, такими как TLR3 и TLR7. TLR3 опосредует индукцию транскрипции интерферонов I типа (IFN), провоспалительных цитокинов и хемокинов, тем самым запуская цепь противовирусных иммунных реакций [6, 12, 13]. Активация TLR7 также приводит к продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, TNF- α , IFN 1 типа и др. [12]. Активация PRRs и последующая выработка провоспалительных факторов при длительной стимуляции вирусом SARS-CoV-2 может вызвать затяжной воспалительный процесс, приводящий к тяжелому повреждению легких. В дальнейшем такой иммунный ответ может привести к системному воспалению и к повреждению других органов и тканей. Поэтому оценка уровня экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета в период реабилитационного процесса у лиц, перенесших COVID-19, позволит лучше понять фундаментальные процессы, происходящие в иммунной системе на уровне слизистых оболочек, а также прогностически оценить риск возникновения тяжелого течения COVID-19 и дальнейших осложнений, вызванных длительной стимуляцией вирусом SARS-CoV-2 иммунной системы. Полученные данные представлены в таблице 1.

Нами было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета *TLR3* и *TLR7* на уровне слизистых оболочек носоглотки и ротоглотки в течение всего периода реабилитации. Однако на уровне слизистых носоглотки и ротоглотки наблюдается тенденция к увеличению уровня экспрессии данных генов. Такое увеличение уровня экспрессии генов молекул врожденного иммунитета можно объяснить тем, что количество мРНК коррелирует с уровнями воспаления и потенциального повреждения тканей, которое сохраняется после перенесения заболевания COVID-19 [6; 13; 14].

Экспрессия генов цитокинов *IL1 β* , *IL28*, *TNF α* была разнонаправленной. Наблюдалось увеличение уровня экспрессии *IL1 β* на слизистых оболочках ротоглотки и носоглотки; в частности, нами было выявлено достоверное увеличение уровня экспрессии *IL1 β* на эпителиальных клетках носоглотки (в 108,5 раз, $P < 0,05$) на 4 месяц после перенесенного заболевания COVID-19,

которое поддерживалось на высоком уровне в последующие месяцы. Можно сделать вывод, что уровень экспрессии гена *IL1 β* остается высоким после перенесенного заболевания COVID-19. Такой высокий уровень экспрессии гена на слизистых оболочках носоглотки у лиц, перенесших данное заболевание, может объясняться ролью *IL-1 β* в иммунном ответе, направленном на вирусные инфекции. Данный цитокин играет роль в рекрутировании и активации иммунных клеток, не обладая при этом прямой противовирусной активностью. Через свой рецептор *IL1R1* он регулирует активацию провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантов, не нарушая при этом противовирусного ответа *IFNs*. Помимо этого, данный цитокин активирует имфламмосомы для успешной элиминации вирусных частиц. В частности, некоторые исследования свидетельствуют о том, что высокий уровень активации воспалительных инфламмосом *NLRP3* в сочетании с продукцией *IL-18* и *IL-1 β* в дальнейшем отрицательно влияет на функцию [3, 19]. Возможно, именно гиперэкспрессия данных цитокинов на уровне слизистого эпителия носоглотки и ротоглотки в дальнейшем может вызывать когнитивные нарушения, характерные для лиц, перенесших заболевание COVID-19 в тяжелой форме течения.

При изучении противовирусного цитокина *IL28* нами было выявлено достоверное снижение уровня экспрессии гена на слизистых оболочках ротоглотки и ротовой полости. Однако уровень экспрессии гена *IL28* сохранялся высоким во входных воротах инфекции, а именно в носоглотке. Hannah E. Davis, Lisa McCorkell выяснили, что высокий уровень экспрессии и продукции *IFNs*, в частности *IFN λ s* может сохраняться высоким спустя более, чем полгода с момента заболевания COVID-19[8].

Сохраняется и высокий уровень экспрессии *TNF- α* на уровне слизистого эпителия носоглотки. Такое изменение в сторону гиперэкспрессии *TNF- α* возможно объяснить сохранностью локального умеренного воспаления. Известно, что при многих тяжелых вирусных заболеваниях на системном уровне сохраняется умеренная воспалительная реакция организма со значительными изменениями уровней циркулирующих цитокинов, таких как *IL-1* (*IL-1 α* и *IL-1 β*) и *TNF α* [26]. Однако клеточные механизмы на уровне мукозального иммунитета, их роль и их терапевтический потенциал еще предстоит изучить у выздоровевших пациентов.

Как было отмечено ранее, заболевание COVID-19 вызывает стойкие изменения в работе организма. Вирус SARS-CoV-2 запускает множество патофизиологических состояний, которые могут усугублять тяжелые хронические состояния пациентов [15]. На сегодняшний день существует множество работ о влиянии «цитокинового шторма» на сопутствующие заболевания в анамнезе у лиц с заболеванием COVID-19 [15,16,20]. Также множество исследований посвящено влиянию уровня экспрессии эффекторных молекул на развитие аутоиммунитета и тяжелых патофизиологических состояний [18; 22; 23]. Однако такие исследования в основном направлены на системный уровень. Интересно было оценить

уровень экспрессии эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек барьерных тканей (ротоглотка, носоглотка, ротовая полость) у лиц, перенесших заболевание COVID-19 с хроническими заболеваниями в анамнезе. Поскольку, высокий уровень экспрессии как рецепторных, так и эффекторных молекул врожденного иммунитета был высоким на уровне слизистой оболочки носоглотки у лиц, перенесших заболевание COVID-19, было интересно посмотреть, как экспрессия эффекторных молекул будет ассоциирована с сопутствующими хроническими заболеваниями. В работе получены следующие результаты. Нами было выявлено (Рисунок 1), что у лиц с хронической сопутствующей патологией как сердечно-сосудистой, так и легочной системы (верхних дыхательных путей (ВДП) и нижних дыхательных путей (НДП)), перенесших заболевание COVID-19, уровень экспрессии *IL1 β* сохраняется высоким на 4 месяц после перенесённого заболевания. Такой высокий уровень экспрессии *IL1 β* характерен для лиц с хроническими заболеваниями легочной [20]. Так, например, высокие уровни экспрессии *IL1 β* являются прогностическими для хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ)[27].

Однако уровень экспрессии *IL1 β* в дальнейшем снижается в 20 раз у группы лиц с хронической сопутствующей патологией легочной системы. Похожая картина наблюдается и у лиц с хронической сопутствующей патологией сердечно-сосудистой системы. Нами был выявлен высокий уровень экспрессии *IL1 β* на уровне эпителиальных клеток носоглотки на 4 месяц после перенесенного заболевания COVID-19, который снижался в последующие месяцы (6 месяц и 8 месяц). Интересно отметить, что уровень экспрессии гена *IL1 β* на уровне слизистой оболочки носоглотки у лиц без хронических заболеваний в анамнезе исходно был низким, возрастал спустя полгода после перенесенного заболевания, и затем снижался.

Относительно уровня экспрессии *TNF- α* у лиц с сопутствующими хроническими заболеваниями, наблюдалась следующая картина (Рисунок 2). При сопутствующих хронических легочных заболеваниях у лиц, переболевших COVID-19, исходно высокий уровень экспрессии *TNF- α* на уровне эпителиальных клеток носоглотки в последующие месяцы после инфекционного процесса, вызванного SARS-CoV-2, плавно снижался (в 2,3 раза на 6 месяц и 7,3 раза на 8 месяц относительно исходного уровня). Другая картина наблюдалась у лиц с сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой системы (ССС). Нами было выявлено снижение уровня экспрессии в 28 раз *TNF- α* на 4-6 месяц после перенесённого заболевания COVID-19. Однако, на 8 месяц после перенесённого заболевания COVID-19 наблюдается значительное увеличение уровня экспрессии *TNF- α* на уровне слизистой оболочки носоглотки. Возможно, такое увеличение уровня экспрессии гена *TNF- α* у лиц с патологией СССР в анамнезе объясняется тем, что при заболевании COVID-19 отмечается выраженное снижение количества лимфоцитов различных линий, включая Т-лимфоциты, CD4+, CD8+ и регуляторные Т-лимфоциты. Иммуносупрессия, возникающая при инфекции

SARS-CoV-2, а также перераспределение клеток иммунной системы могут быть связаны с временным снижением защитной функции клеток иммунной системы, с возможностью потери аутоотолерантности к некоторым аутоантигенам. Однако в период реабилитации может происходить восстановление систем иммунитета, при котором может возникнуть нерегулируемый [4, 6].

Экспрессия молекул врожденного иммунитета при COVID-19 и его осложнениях зависит от многих факторов, включая гормональный фон, метилирование ДНК, активность регуляторных белков и миРНК и т.д. Также значимое влияние на экспрессию белковых молекул могут оказывать индивидуальные вариации генома человека, а именно полиморфные маркеры в изучаемых генах иммунитета. В нашем исследовании мы проанализировали ассоциацию тяжелого течения COVID-19 с полиморфизмами в генах врожденного иммунитета: IL28B (rs12979860 и rs8099917), TLR4 (rs11536889 и rs4986791) и TLR9 (rs352140 и rs5743836).

Анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs5743836 в гене TLR9 показал, что при тяжелом течении инфекции SARS-CoV-2 аллель Т встречался в 7 раз чаще ($p(Fi) < 0,001$; $OR = 7,2$; $95\%CI = 3,4-15,3$), а генотип ТТ в 21 раз чаще по сравнению с контрольной группой ($p(Fi) < 0,001$; $OR = 21,4$; $95\%CI = 4,5-101,3$) и почти в 10 раз чаще по сравнению с легким течением COVID-19 ($p(Fi) = 0,029$; $OR = 9,7$; $95\%CI = 1,1-89,6$). Генотип ТС, напротив, в группе с тяжело протекающей инфекцией SARS-CoV-2 встречался значительно реже: в 3 раза по сравнению с контрольной группой ($p(Fi) = 0,025$; $OR = 0,3$; $95\%CI = 0,1-0,8$) и в 11,5 раз по сравнению с легким течением ($p(Fi) = 0,018$; $OR = 0,09$; $95\%CI = 0,01-0,8$). Также в группе с тяжело протекающей инфекцией SARS-CoV-2 по сравнению с контрольной группой реже встречалась гомозигота СС ($p(Fi) = 0,001$; $OR = 0,08$; $95\%CI = 0,02-0,4$). Данные представлены на Рисунке 3. Анализ полиморфного маркера rs352140 в гене TLR9 не выявил значимых ассоциаций с тяжелым течением COVID-19. Также мы рассмотрели два изучаемых маркера в гене TLR9 в совокупности (rs352140&rs5743836) и изучили распространенность гаплотипов в изучаемых выборках. Статистически значимая разница была выявлена при анализе гаплотипа GATT, который встречался с частотой 0,302 в основной группе, а в группах сравнения обнаружен не был (Рисунок 4).

Исследование полиморфных маркеров rs11536889 и rs4986791 в гене TLR4 не выявило непосредственной связи данных маркеров с тяжелым течением COVID-19. Однако, анализ показал, что генотип СТ (rs4986791) ассоциирован с восприимчивостью к инфекции SARS-CoV-2 ($p(Fi) = 0,044$), в то время как генотип СС при COVID-19 встречался значительно реже ($p(Fi) = 0,025$). Анализ гаплотипов продемонстрировал следующую закономерность: в контрольной выборке встречались только гаплотипы GGCC (частота 0,917) и GCCC (0,083), в то время как при тяжелом течении COVID-19 помимо GGCC (0,658) и GCCC (0,178), встречались еще гаплотипы GGCT (0,137), GCCT (0,014) и GCTT (0,014). Статистический анализ также выявил,

что при тяжелой инфекции SARS-CoV-2 гаплотип GGCC встречался реже (OR=0,2; 95%CI=0,04-0,8), что продемонстрировано на рисунке 5.

Анализ полиморфных маркеров rs12979860 и rs8099917 в гене IL28B не выявил ассоциации с тяжелым течением инфекции SARS-CoV-2. Вероятно, выявленные нами изменения в экспрессии данного гена на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц с COVID-19 могут быть вызваны другими факторами или генетическими особенностями индивидов.

4 Заключение

В ходе проведенного нами исследования была показана прогностическая роль полиморфных маркеров и гаплотипов в генах TLR9 (rs352140 и rs5743836) и TLR4 (rs11536889 и rs4986791) в отношении риска развития тяжелого течения инфекции SARS-CoV-2. Было выявлено, что генотип TT (rs5743836) и гаплотип GATT в гене TLR9 повышают риск развития патологии в 21 и 8 раз соответственно. Также с тяжелым течением ассоциирована гетерозигота (rs4986791) в гене TLR4. Напротив, генотип TC и гомозигота CC полиморфного маркера rs5743836 в гене TLR9 при тяжелом течении COVID-19 встречались в 3 и 12 раз реже. Генотип CC (rs4986791) и гаплотип GGCC в гене TLR4 также играли протективную роль в отношении тяжелого течения инфекции SARS-CoV-2, снижая риск её развития в 5 раз.

При изучении отдаленных последствий COVID-19 было выявлено, что у пациентов, перенесших заболевание, сохраняется дисбаланс экспрессии рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек ВДП. Наблюдается снижение уровня экспрессии как рецепторных молекул (TLR3, TLR7), так и факторов противовирусного иммунного ответа (IL28) в слизистых ротоглотки на фоне общего увеличения этих маркеров в эпителиальных клетках слизистой оболочки носоглотки. Эти изменения способны влиять на другие хронические заболевания, включающие в себя нарушения в работе сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

Таким образом, были изучены экспрессионные и генетические факторы врожденного иммунитета, приводящие к тяжелому течению инфекции SARS-CoV-2 и, как следствие, к стойким изменениям в иммунной системе в течение длительного времени после выздоровления, что расширяет наши знания о молекулярно-генетических механизмах, связанных с длительным течением COVID-19. Кроме того, полученные в ходе исследования результаты могут помочь оценить риски развития тяжелого течения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и развивающихся впоследствии осложнений у госпитализированных пациентов.

Источник финансирования

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) по проекту (гранту) № 20-04-60450/20 с использованием материально-технической базы ЦПК (центра коллективного пользования) ФГБНУ «НИИВС» им. И.И. Мечникова.

Участие авторов

Абрамова Н.Д. – проведение экспериментов, анализ литературы и экспериментальных данных, обсуждение, оформление статьи; Калюжная Н.О. – проведение экспериментов, анализ литературы, написание текста статьи; Меремьянина Е.А. – анализ литературы, написание текста статьи, подготовка графического материала статьи. Богданова Е.А. – анализ экспериментальных данных, обсуждение, написание текста и оформление статьи. Костинов М.П. – анализ экспериментальных данных, обсуждение, написание текста и оформление статьи. Свитич О.А. – анализ литературы и экспериментальных данных, обсуждение, написание текста и оформление статьи.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Выражение признательности

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования НИИВС им И.И. Мечникова. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» - при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Министерства образования и науки России, Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Авторы благодарят сотрудников кафедры госпитальной терапии ПФ РНИМУ им. Н.И. Пирогова : Академика РАН д.м.н., профессора, заведующего кафедрой, госпитальной терапии ПФ Чучалина А.Г. а так же профессора кафедры госпитальной терапии ПФ Барановой И.А.

ТАБЛИЦЫ

Таблица (№1) Экспрессионный профиль молекул рецепторных и эффекторных молекул врожденного иммунитета на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у лиц перенесших заболевание COVID-19 относительно контрольной группы
Table (№1) Expression profile of receptor and effective molecules of innate immunity at the level of the mucous means of the upper respiratory tract in persons who have recovered from COVID-19 relative to the control group

	Ротоглотка (oropharynx)					
	4 месяц (4 month)		6 месяц (6 month)		8 месяц (8 month)	
	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance	Изменение/ (Changes)	P уровень значимости/ P level of significance
TLR3	↓ в 28 *10 ⁴	0,0238	↓ в 11*10 ⁴	0,0238	↓	0,069
TLR7	↓ в 119,4	0,0101	↓ в 148,3	0,0005	↓ в 456,07	0,0005
IL1b	↑	0,2949	↑	0,1079	↑	0,5728
IL28	↓ в 215,5	0,0012	↓ в 278,4	0,0007	↓ в 533,5	0,0095
TNF-α	↓	0,8357	↓	0,2284	↓ в 34 p	0,0992
	Носоглотка (Nasopharynx)					
	4 месяц (4 month)		6 месяц (6 month)		8 месяц (8 month)	
	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance
TLR3	↑	0,4079	↑	0,0879	↑	0,1898
TLR7	↔	0,9015	↑	0,8048	↔	0,2086
IL1b	↑ в 108,5	0,0328	↑	0,1259	↑	0,3749
IL28	↑	0,7473	↑	0,3489	↑	0,6154
TNF-α	↑ в 421,5	0,0044	↑ в 184,5	0,0031	↑ в 23,06	0,0068
	Ротовая полость (Oral cavity)					
	4 месяц (4 month)		6 месяц (6 month)		8 месяц (8 month)	
	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance	Изменение/ Changes	P уровень значимости/ P level of significance

	Changes	P level of significance	Changes	level of significance	Changes	level of significance ges
<i>TLR3</i>	↑	0,1416	↑	0,0206	↑	0,2818
<i>TLR7</i>	↑	0,9773	↑	0,3922	↔	0,5083
<i>IL1b</i>	↓	0,1416	↓	0,1416	↓	0,1135
<i>IL28</i>	↓ в 29*10⁴	0,0007	↓ в 41 *10⁴	0,0007	↓ в 73 *10⁴	0,0007
<i>TNF-α</i>	↔	0,6669	↑	0,2257	↔	0,5489

Примечание. ↑ - Увеличение уровня экспрессии относительно группы условно здоровых лиц. ↓ - снижение уровня экспрессии относительно группы условно здоровых лиц. ↔ - равнозначный уровень экспрессии с контрольной группой. Жирным выделены достоверно значимые результаты (при $p \leq 0,05$ по тестам Манна Уитни) исследования экспрессионного профиля молекул.

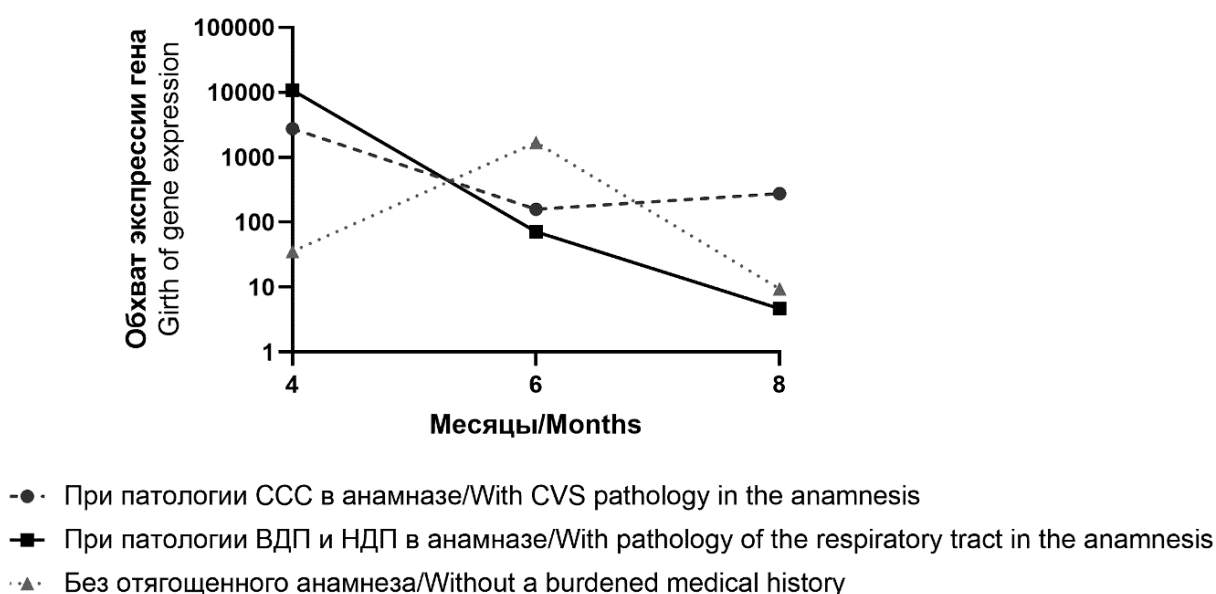
Note. ↑ - Increase in expression level relative to a group of conditionally healthy individuals. ↓ - decrease in expression level relative to a group of conditionally healthy individuals. ↔ - equivalent level of expression with the control group. Reliably significant results (at $p \leq 0.05$ according to Mann Whitney tests) of the study of the expression profile of molecules are highlighted in bold.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Уровень экспрессии гена *IL1β* в носоглотке у лиц перенесших заболевание COVID-19

Figure 1. *IL1β* gene expression level in the nasopharynx of individuals who have had COVID-19 disease

Уровень экспрессии гена *IL1β* в носоглотке полости у лиц перенесших заболевание COVID-19
The level of expression of the *IL1β* gene in the nasopharynx in people who have had COVID-19 disease



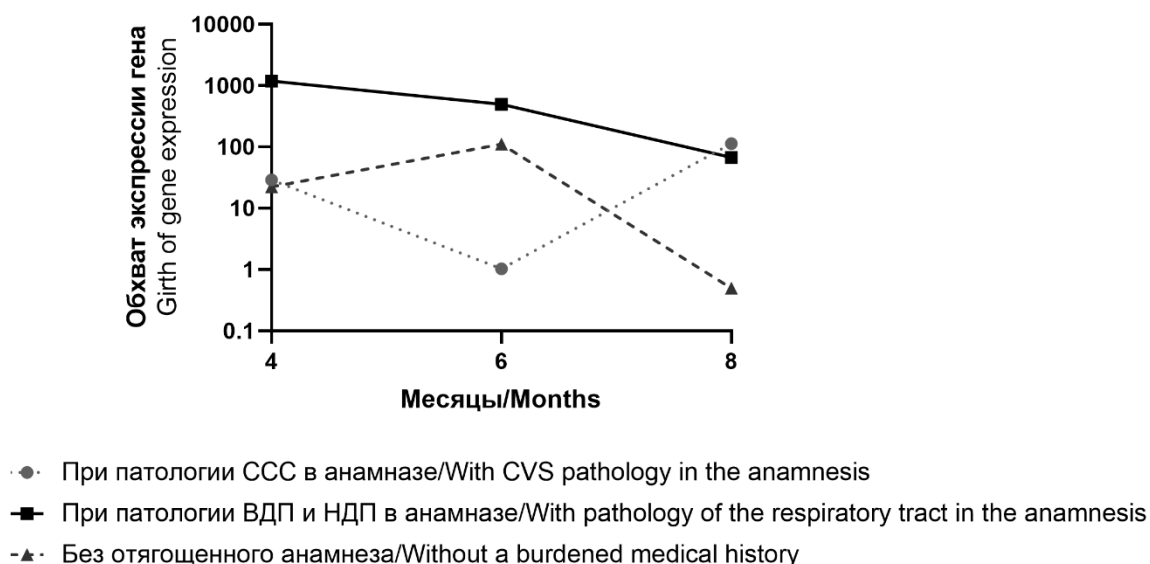
Примечание. По оси абсцисс время и группы. По оси ординат Относительные единицы от числа копий β -актина. Красным цветом – экспрессия гена *IL1β* у лиц с сопутствующей ССС патологией в анамнезе. Синим цветом- экспрессия гена *IL1β* у лиц с сопутствующей патологией дыхательных путей (ВДП и НДП) в анамнезе. Зеленым цветом - экспрессия гена *IL1β* у лиц без отягощённого анамнеза.

Note. The x-axis is time and groups. Y axis Relative units of β -actin copy number. Red color shows the expression of the *IL1β* gene in individuals with a history of concomitant CVD pathology. Blue color indicates *IL1β* gene expression in individuals with a history of concomitant respiratory tract pathology. Green color shows the expression of the *IL1β* gene in individuals without a significant medical history.

Рисунок 2. Уровень экспрессии гена *TNF-α* в носоглотке у лиц перенесших заболевание COVID-19

Figure 2. Level of expression of the *TNF-α* gene in the nasopharynx in individuals who have had COVID-19 disease

Уровень экспрессии гена *TNF-α* в носоглотке у лиц перенесших заболевание COVID-19
The level of expression of the *TNF-α* gene in the nasopharynx in people who have had COVID-19 disease



Примечание. По оси абсцисс время и группы. По оси ординат Относительные единицы от числа копий β-актина. Красным цветом – экспрессия гена *TNF-α* у лиц с сопутствующей CCC патологией в анамнезе. Синим цветом- экспрессия гена *TNF-α* у лиц с сопутствующей патологией дыхательных путей (ВДП и НДП) в анамнезе. Зеленым цветом - экспрессия гена *TNF-α* у лиц без отягощённого анамнеза.

Note. The x-axis is time and groups. Y axis Relative units of β-actin copy number. Red color shows the expression of the *TNF-α* gene in individuals with a history of concomitant CVD pathology. Blue color indicates the expression of the *TNF-α* gene in individuals with a history of concomitant respiratory tract pathology. Green color - *TNF-α* gene expression in individuals without a significant medical history.

Рисунок 3. Распределение частот генотипов полиморфного маркера rs5743836 гена TLR9 в группах с тяжелым и легким течением коронавирусной инфекции и в контрольной группе. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат представлена частота. * - $p \leq 0,05$

Figure 3. Distribution of genotype frequencies of the polymorphic marker rs5743836 of the TLR9 gene in groups with severe and mild coronavirus infection and in the control group. The x-axis represents the study groups, and the y-axis represents frequency. * - $p \leq 0.05$

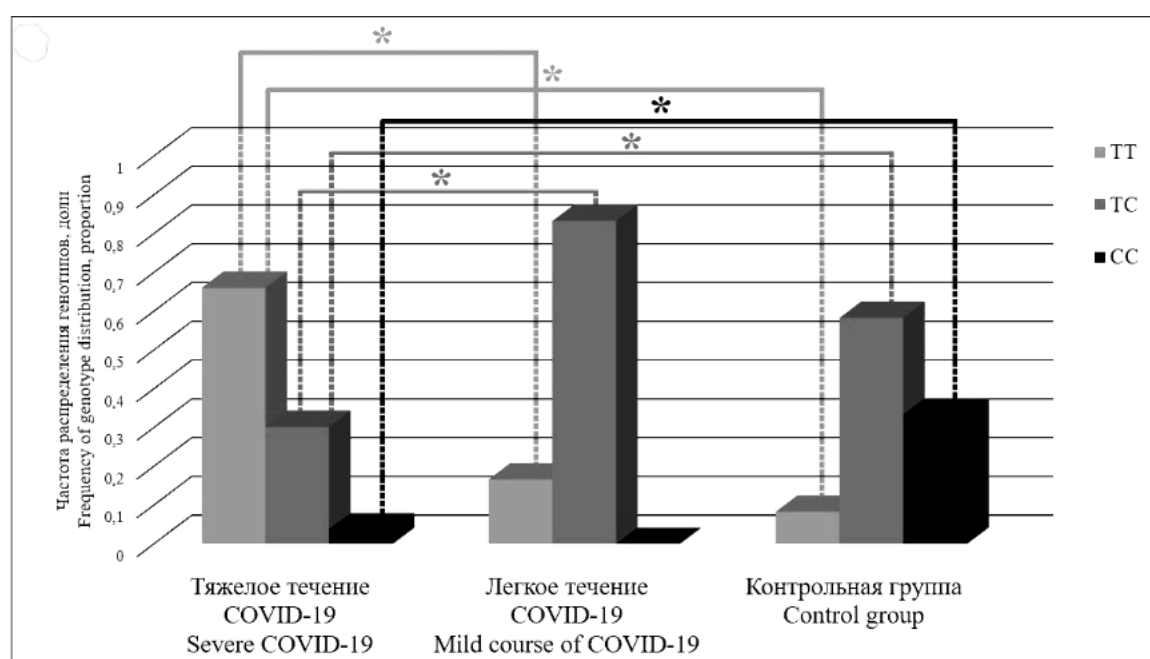


Рисунок 4. Распределение частот гаплотипов GATT полиморфных маркеров rs352140 и rs5743836 гена TLR9 в группах с тяжелым и легким течением коронавирусной инфекции и в контрольной группе. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат представлена частота. * - $p \leq 0,05$

Figure 4. Distribution of haplotype frequencies of GATT polymorphic markers rs352140 and rs5743836 of the TLR9 gene in groups with severe and mild coronavirus infection and in the control group. The x-axis represents the study groups, and the y-axis represents frequency. * - $p \leq 0.05$

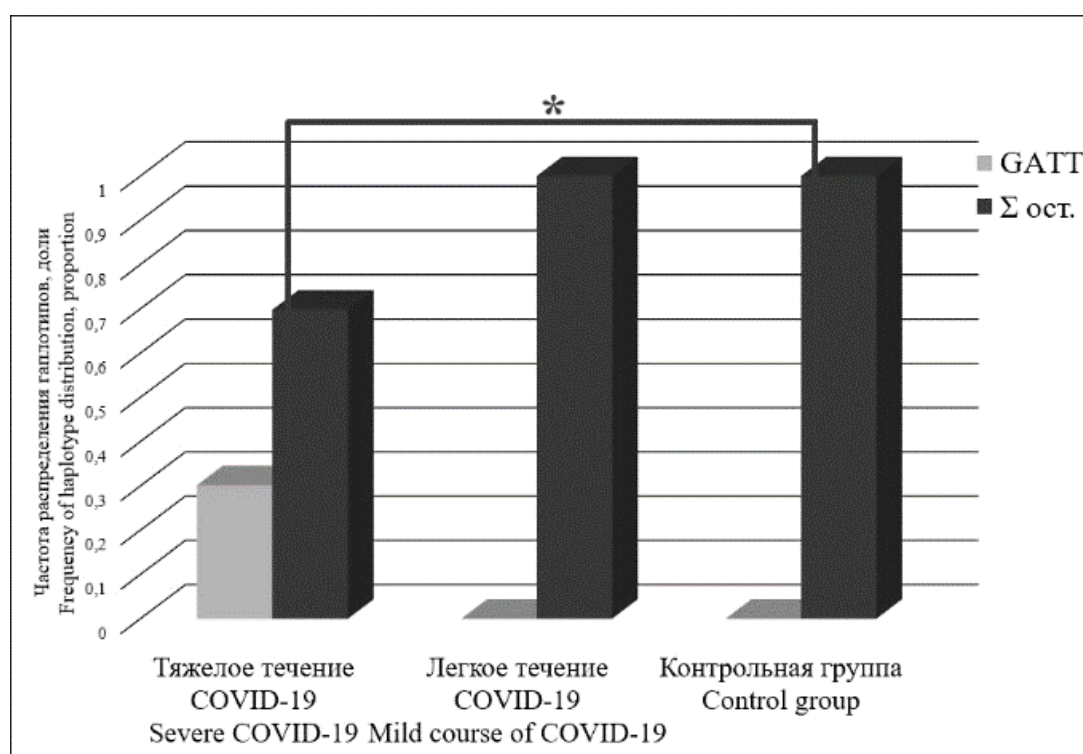
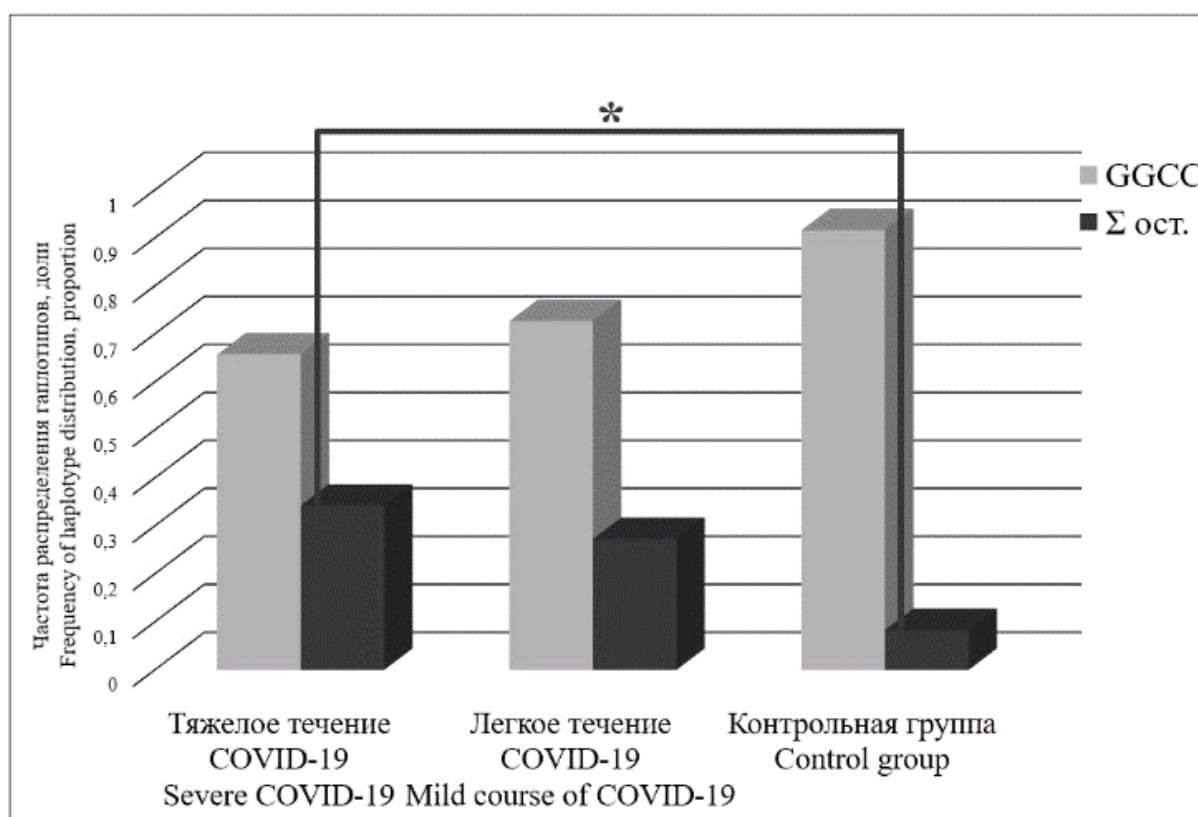


Рисунок 5. Распределение частот гаплотипов GGCC полиморфных маркеров rs11536889 и rs4986791 гена TLR4 в группах с тяжелым и легким течением коронавирусной инфекции и в контрольной группе. По оси абсцисс представлены исследуемые группы, по оси ординат представлена частота. * - $p \leq 0,05$

Figure 5. Distribution of frequencies of GGCC haplotypes of polymorphic markers rs11536889 and rs4986791 of the TLR4 gene in groups with severe and mild coronavirus infection and in the control group. The x-axis represents the study groups, and the y-axis represents frequency. * - $p \leq 0.05$



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

1. Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).

Абрамова Наталья Дмитриевна/ Abramova Natalya Dmitrievna

Абрамова Наталья Дмитриевна- младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИ ВС им. И.И. Мечникова»

Abramova Natalya Dmitrievna - Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums

2. Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

ФГБНУ «НИИ ВС им. И.И. Мечникова»

Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums

3. Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).

Москва, 105064 Малый Казенный пер., 5А, лаборатория молекулярной иммунологии

Laboratory of Molecular Immunology, 105064 Maly Kazenny per., 5A, Moscow

4. Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.

and960911@gmail.com

+79164786457

Блок 2. Информация об авторах

Абрамова Наталья Дмитриевна¹ -младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИ ВС им. И.И. Мечникова». Abramova Natalya Dmitrievna^a - Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums

Калюжная Наталия Олеговна ¹ – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Kalyuzhnaya Natalia Olegovna ^a – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums

Меремьянина Екатерина Андреевна^{1, 2} – к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научноисследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», старший преподаватель кафедры вирусологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Meremyanina Ekaterina Andreevna^{a,b} – Ph.D. (medical science), Laboratory of Molecular Immunology, Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Senior Lecturer, Department of Virology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education,

Богданова Екатерина Александровна³ — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии им. А.А. Воробьева «ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)» Ekaterina A. Bogdanova^c – PhD (medical science), Associate Professor of the Department of Microbiology, Immunology and Virology named after A.A. Vorobyov, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovskiy University);

Костинов Михаил Петрович ^{1,3} – д. м. н., профессор, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова; профессор кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия Kostinov Mikhail Petrovich ^{a,c} - MD, Professor, corresponding member RAS, Head of Laboratory, I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums; Professor

of Department, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Свитич Оксана Анатольевна ^{1,3} - д.м.н., профессор РАН, член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени академика А.А. Воробьева, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России

Svitich Oksana Anatolyevna ^{a,c} - MD, professor of RAS, corresponding member. RAS, Director of the Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after Academician A.A. Vorobyov, First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov of the Ministry of Health of Russia

Блок 3. Метаданные статьи

ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ МОЛЕКУЛ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ ЗАБОЛЕВАНИЕ COVID-19

CHANGES IN THE MOLECULAR GENETIC PROFILE OF INNATE IMMUNE MOLECULES IN INDIVIDUALS WHO HAVE HAD COVID-19 DISEASE

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Экспрессия и продукция цитокинов при COVID-19

Expression and production of cytokines in COVID-19

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, COVID-19, SARS-CoV-2, экспрессия генов, врожденный иммунитет, полиморфизм генов, SNP.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, gene expression, innate immune response, Genetic Polymorphisms, SNP.

Оригинальные статьи

Количество страниц текста – 9

Количество таблиц – 1

Количество рисунков – 5

Дата поступления: 22.11.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Абрамова Н.Д., Сощенко Т.Д., Меремьянина Е.А., Солнцева В.К., Железняк В.Н., Свитич О.А. Экспрессия рецепторов врожденного иммунитета TLR3 и TLR7 на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов с тяжелой формой COVID-19 // Терапия. - 2023. - Т. 9. - №2. - С. 7-13.	Abramova N.D., Soshchenko T.D., Meremyanina E.A., Solntseva V.K., Zheleznyak V.N., Svitich O.A. Expression of innate immunity TLR3 and TLR7 receptors at the level of the upper respiratory airways' mucosa in patients with severe COVID-19 // <i>Therapy</i> . 2023. Vol. 9. no. 2. pp. 7-13.	doi: 10.18565/therapy.2023.2.7-13
2	Абрамова Н.Д., Меремьянина Е.А., Калюжная Н.О., Поддубиков А.В., Костинов М.П., Греченко В.В., Свитич О.А. Экспрессия и продукция цитокинов у пациентов с тяжелым течением SARS-CoV-2 // Российский иммунологический журнал. - 2023. - Т. 26. - №4. - С. 603-610.	Abramova N.D., Meremyanina E.A., Kalyuzhnaya N.O., Poddubikov A.V., Kostinov M.P., Grechenko V.V., Svitich O.A. Cytokine expression and production in severe cases	doi: 10.46235/1028-7221-13957-CEA

		of SARS-CoV-2 infection // <i>Russian Journal of Immunology</i> . 2023. Vol. 26. no. 4. pp. 603-610.	
3	Akbarialiabad H, Taghrir MH, Abdollahi A, Ghahramani N, Kumar M, Paydar S, Razani B, Mwangi J, Asadi-Pooya AA, Malekmakan L, Bastani B. Long COVID, a comprehensive systematic scoping review// <i>Infection</i> . 2021. Vol. 6 pp.1163-1186.		doi: 10.1007/s15010-021-01666-x.
4	Barison A, Aimo A, Castiglione V, Arzilli C, Lupón J, Codina P, Santiago-Vacas E, Cediel G, Emdin M, Bayes-Genis A. Cardiovascular disease and COVID-19: les		doi: 10.1177/2047487320924501.

	liaisons dangereuses.// <i>Eur J Prev Cardiol.</i> 2020 Vol.27 no.10 pp.1017-1025.		
5	Botos I, Liu L, Wang Y, Segal DM, Davies DR. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex.// <i>Biochim Biophys Acta.</i> 2009 no.1789(9-10) pp.667-74.		doi: 10.1016/j.bbagr.2009.06.005.
6	Cañas CA. The triggering of post-COVID-19 autoimmunity phenomena could be associated with both transient immunosuppression and an inappropriate form of immune reconstitution in susceptible individuals.// <i>Med Hypotheses.</i> 2020 Vol.145 pp.110345.		doi: 10.1016/j.mehy.2020.110345.

7	Chen Y, Lin J, Zhao Y, Ma X, Yi H. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses.// <i>J Zhejiang Univ Sci B</i> . 2021 Vol.22 no.8 pp.609-632.		doi: 10.1631/jzus.B2000808.
8	Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, Wei H, Low RJ, Re'em Y, Redfield S, Austin JP, Akrami A. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact.// <i>EClinicalMedicine</i> . 2021 no.38 pp.101019.		doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101019.
9	Fathi F, Sami R, Mozafarpour S, Hafezi H, Motedayyeh H, Arefnezhad R, Eskandari N. Immune system changes during COVID-19 recovery play key role in determining		doi: 10.1177/2058738420966497

	disease severity. // <i>Int J Immunopathol Pharmacol.</i> 2020 Vol. 34 pp.2058738420966497.		
10	Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. // <i>Trends Mol Med.</i> 2007 Vol.13 no.11 pp.460-9.		doi: 10.1016/j.molmed.2007.09.002.
11	Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways.// <i>Front Immunol.</i> 2014 Vol.25 no.5 pp.461.		doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
12	Khanmohammadi S, Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19.// <i>J Med Virol.</i> 2021 Vol.93 no.5 pp.2735-2739.		doi: 10.1002/jmv.26826.
13	Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors.// <i>Trends Cell</i>		doi: 10.1016/j.tcb.2013.12.002

	<i>Biol. 2014 Vol. 24 no.6 pp.360-9.</i>		
14	Luo XH, Zhu Y, Mao J, Du RC. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19.// <i>Scand J Immunol. 2021 Vol. 93 no.3 pp.e12989.</i>		doi: 10.1111/sji.12989.
15	Mitsi E, Diniz MO, Reiné J, Collins AM, Robinson RE, Hyder-Wright A, Farrar M, Liatsikos K, Hamilton J, Onyema O, Urban BC, Solórzano C, Belij-Rammerstorfer S, Sheehan E, Lambe T, Draper SJ, Weiskopf D, Sette A, Maini MK, Ferreira DM. Respiratory mucosal immune memory to SARS-		doi: 10.1038/s41467-023-42433-w.

	CoV-2 after infection and vaccination.// <i>Nat Commun.</i> 2023 Vol. 26 no.14(1) pp. 6815.		
16	Mogensen, Trine H. "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses.// <i>Clinical microbiology reviews</i> (2009) Vol. 22 no.2 pp.240-73, Table of Contents.		doi:10.1128/CMR.00046-08
17	Nguyen H, Gazy N, Venketaraman V. A Role of Intracellular Toll-Like Receptors (3, 7, and 9) in Response to Mycobacterium tuberculosis and Co-Infection with HIV " // <i>International journal of molecular</i>		doi:10.3390/ijms21176148

	<i>sciences2020, vol. 21 no.17 pp.6148.</i>		
18	Pauwels, N. S., Bracke, K. R., Dupont, L. L., Van Pottelberge, G. R., Provoost, S., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Lambrecht, B. N., Joos, G. F., & Brusselle, G. G.). Role of IL-1 α and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 β axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD// <i>The European respiratory journal</i> , 2011 Vol. 38 no.5 pp.1019–1028.		https://doi.org/10.1183/09031936.00158110
19	Puchner, B., Sahanic, S., Kirchmair, R., Pizzini, A., Sonnweber, B., Wöll, E., Mühlbacher, A., Garimorth, K., Dareb, B., Ehling, R.,		https://doi.org/10.23736/S1973-9087.21.06549-7 .

	Wenter, J., Schneider, S., Brenneis, C., Weiss, G., Tancevski, I., Sonnweber, T., & Löffler-Ragg, J.. Beneficial effects of multi-disciplinary rehabilitation in postacute COVID-19: an observational cohort study.// <i>European journal of physical and rehabilitation medicine</i> , (2021), Vol. 57 no.2, pp.189–198.		
20	Qin, C., Zhou, L., Hu, Z., Zhang, S., Yang, S., Tao, Y., Xie, C., Ma, K., Shang, K., Wang, W., & Tian, D. S.. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19)		https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248

	in Wuhan, China. // <i>Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America</i> , (2020) Vol.71 no.15, pp.762–768.		
21	Rajagopala, S. V., Strickland, B. A., Pakala, S. B., Kimura, K. S., Shilts, M. H., Rosas-Salazar, C., Brown, H. M., Freeman, M. H., Wessinger, B. C., Gupta, V., Phillips, E., Mallal, S. A., Turner, J. H., & Das, S. R. Mucosal Gene Expression in Response to SARS-CoV-2 Is Associated with Viral Load.// <i>Journal of virology</i> , 2023 Vol.97 no.2, pp.e0147822.		https://doi.org/10.1128/jvi.01478-22

22	Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. // <i>Biostatistics, bioinformatics and biomathematics</i> , 2013 Vol.3 no.3, pp.71–85		https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25558171/
23	Reikine, S., Nguyen, J. B., & Modis, Y. (2014). Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5.// <i>Frontiers in immunology</i> , 2014, Vol.5, pp.342.		https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00342
24	Scharf, R. E., & Anaya, J. M. (2023). Post-COVID		https://doi.org/10.3390/v15030675

	Syndrome in Adults-An Overview.// <i>Viruses</i> , Vol.15 no.3, pp.675.		
25	Takaoka, A., & Yamada, T.. Regulation of signaling mediated by nucleic acid sensors for innate interferon-mediated responses during viral infection.// <i>International immunology</i> , 2019, Vol.31, no.8, pp.477–488.		https://doi.org/10.1093/intimm/dxz034
26	Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease.// <i>Cold Spring Harbor perspectives in biology</i> , 2014, Vol.6, no.10, pp.a016295.		https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295

27	Zhang, G., Nie, S., Zhang, Z., & Zhang, Z. Longitudinal Change of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibodies in Patients with Coronavirus Disease 2019. // <i>The Journal of infectious diseases</i> , 2020, Vol.222 no.2, pp.183–188.	https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa229
28	Zhao, Z., Xie, J., Yin, M., Yang, Y., Ding, C., Gao, Y., & Ma, X. Interleukin-6 and severity of COVID-19 patients in Hefei, China.// <i>Medecine et maladies infectieuses</i> , 2020, Vol. 50 no.7, pp. 629–631.	https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.06.005