



## ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TLR3 И TLR9 В ОЦЕНКЕ ТЯЖЕСТИ COVID-19

Л.А. Ащина<sup>1</sup>, Н.И. Баранова<sup>1</sup>, А.И. Болгова<sup>1,2</sup>, О.А. Левашова<sup>1</sup>, О.Н. Лесина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Пензенский институт усовершенствования врачей — филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, Пенза, Россия

<sup>2</sup> Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи, Пенза, Россия

### Prognostic significance of TLR3 and TLR9 gene polymorphism in assessing the severity of COVID-19

L.A. Ashchina<sup>1</sup>, N.I. Baranova<sup>1</sup>, A.I. Bolgova<sup>1,2</sup>, O.A. Levashova<sup>1</sup>, O.N. Lesina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Penza Institute for Further Training of Physicians — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Penza, Russia

<sup>2</sup> Penza Regional Clinical Center of Specialized Types of Medical Care, Penza, Russia

#### Резюме

**Цель:** изучение полиморфных вариантов генов TLR3 (rs3775291) и TLR9 (rs352140) у больных COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания и их значимость для определения риска тяжелого течения COVID-19.

**Материалы и методы:** генетический анализ полиморфизма генов TLR3 (rs3775291) и TLR9 (rs352140) проведен у 164 пациентов с COVID-19, которые были разделены по степени тяжести на 3 группы: 1-я — с легкой, 2-я — со среднетяжелой и 3-я — с тяжелой и крайне тяжелой степенями тяжести. Контрольную группу составили 40 здоровых доноров. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программ STATISTICA 12.0 (Stat Soft, USA). Для оценки различия групп по качественному признаку использован критерий  $\chi^2$  с поправкой Yates, а при нарушении условий его применимости — двусторонний критерий Фишера (PF). Различия групп считали статистически значимым при  $p < 0,05$ . Силу ассоциации оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio (OR) и 95 % доверительному интервалу.

**Результаты:** выявлено, что частота встречаемости генотипа СТ была достоверно выше, а частота встречаемости генотипа ТТ аллели rs3775291 гена TLR3 достоверно ниже у больных с манифестной формой COVID-19 по сравнению с контрольной группой. Анализ частоты встречаемости TLR9 (rs352140) у больных COVID-19 показал достоверно более высокие значения генотипа СТ и более низкие значения генотипа СС по сравнению со здоровыми людьми. Сравнительный анализ между группами госпитализированных больных в зависимости от степени тяжести выявил более высокую частоту встречаемости генотипа СТ и более низкую частоту встречаемости генотипа ТТ генов TLR3 (rs3775291) и TLR9 (rs352140) у больных с тяжелым и крайне тяжелым состоянием.

**Заключение:** выявлены достоверные отличия по частоте встречаемости генотипов генов TLR3 (rs3775291) и TLR9 (rs352140) у больных с манифестной формой COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми. Анализ

#### Abstract

**Objective:** to study polymorphic variants of TLR3 (rs3775291) and TLR9 (rs352140) genes in patients with COVID-19 depending on the severity of the disease and their significance for determining the risk of severe course of COVID-19.

**Materials and Methods:** genetic analysis of polymorphism of TLR3 (rs3775291) and TLR9 genes (rs352140) was performed in 164 patients with COVID-19, who were divided by degree of severity into three groups: Group 1 with mild, Group 2 with moderate and Group 3 with severe and extremely severe degrees of severity. The control group consisted of 40 healthy donors. Statistical processing of the obtained results was carried out using STATISTICA 12.0 programs (Stat Soft, USA). To assess the difference of groups by qualitative characteristics, the  $\chi^2$  criterion with Yates correction was used, and in case of violation of its conditions, the  $\chi^2$  criterion was applied. Yates correction, and if the conditions of its applicability were violated, the two-sided Fisher's two-sided criterion (RF). The difference between the groups was considered statistically significant at  $p < 0,05$ . The strength of associations was evaluated in the values of the odds ratio index odds ratio (OR) and 95 % confidence interval.

**Results:** the frequency of the ST genotype was significantly higher and the frequency of the TT genotype of the rs3775291 allele of the TLR3 gene was significantly lower in patients with the manifest form of COVID-19 compared with the control group. Frequency analysis of TLR9 (rs352140) in COVID-19 patients showed significantly higher values of the ST genotype and lower values of the CC genotype compared to healthy individuals. Comparative analysis between groups of hospitalized patients depending on severity revealed higher frequency of ST genotype and lower frequency of TT genotype of TLR3 (rs3775291) and TLR9 (rs352140) genes in patients with severe and extremely severe condition.

**Conclusion:** reliable differences in the frequency of occurrence of genotypes of TLR3 (rs3775291) and TLR9 (rs352140) genes in patients with the manifest form of COVID-19 compared to healthy people were revealed. The analysis of nucleotide sequence variants of the studied genes in hospitalized patients depending on the degree of severity also showed

вариантов нуклеотидной последовательности изучаемых генов у госпитализированных пациентов в зависимости от степени тяжести также показал достоверные различия в частоте встречаемости генотипов. Так, у больных в тяжелом и крайне тяжелом состоянии COVID-19 было выявлено достоверно значимое отличие в частоте встречаемости генотипов СТ и ТТ генов TLR3 (rs3775291) и TLR9 (rs352140) по сравнению с больными с легким и среднетяжелым течением, что может в дальнейшем иметь прогностическое значение в оценке тяжести заболевания.

**Ключевые слова:** COVID-19, тяжесть заболевания, Toll-like рецепторы, генотипы, генетический анализ, полиморфизм.

## Введение

В декабре 2019 г. новое инфекционное заболевание, получившее название COVID-19, распространилось по всему миру [1]. Вариация клинических симптомов, описанных у пациентов с COVID-19 в разных популяциях, проявлялась от бессимптомных или слабо симптоматичных инфекций до тяжелой пневмонии, дыхательной недостаточности, полиорганной недостаточности и смерти [2]. Выделенные факторы риска тяжелого течения COVID-19 включали пожилой возраст, сопутствующие заболевания, такие как гипертония, сердечно-сосудистые заболевания, диабет, а также ожирение [3]. Однако было доказано, что на восприимчивость и тяжесть инфекции решающее влияние оказывают генетические факторы и факторы окружающей среды. Так, одним из генетических элементов, которые могут быть ответственны за различия в восприимчивости и тяжести вируса, является полиморфизм гена ACE2. Известно, что ACE2 является основным клеточным рецептором для проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетки человеческого организма. В легких ACE2 высокоэкспрессирован на эпителиальных клетках бронхов. Продемонстрировано, что, когда спайковый белок SARS связывается с рецептором ACE2, комплекс подвергается протеолизу трансмембранной протеазой серин 2 TMPRSS2, что приводит к расщеплению ACE2 и активации спайкового белка, способствуя проникновению вируса в клетку-мишень. Многочисленные исследования доказали, что полиморфизм ACE2 влияет на кинетику связывания и интернализацию вируса, что объясняет вариабельность тяжести заболевания у индивидуумов в различных популяциях [4, 5].

Также описана ключевая роль в патогенезе COVID-19 системы главного комплекса гистосовместимости (HLA). Это важный компонент пути презентации вирусного антигена, который играет роль в определении дифференциальной восприимчивости к вирусу и тяжести инфекционных

*significant differences in the frequency of genotypes. Thus, in patients with severe and extremely severe COVID-19, a significant difference in the frequency of occurrence of ST and TT genotypes of TLR3 (rs3775291) and TLR9 (rs352140) genes was revealed compared to patients with mild and moderate COVID-19, which may further have prognostic value in assessing the severity of the disease.*

**Key words:** COVID-19; disease severity; Toll-like receptors; genotypes; genetic analysis; polymorphism.

заболеваний. Аллели HLA участвуют в активации и модуляции иммунного ответа на вирусные заболевания, в том числе и SARS-CoV-2, а проведенные исследования по изучению полиморфизма HLA доказали его влияние на течение и смертность пациентов при COVID-19 [6].

Кроме того, известно, что врожденная иммунная система обеспечивает первую линию защиты от патогенов и потенциально важна для инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 [7]. Врожденный иммунитет включает семейство рецепторных белков, получивших название рецепторов распознавания образов (PRR — pattern recognition receptor), среди которых toll-like рецепторы (TLR) являются важными представителями этого семейства. TLR способны распознавать патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP — pathogen-associated molecular pattern) и индуцировать воспалительную реакцию, направленную на уничтожение патогенов [8]. Сигнализация TLR играет ключевую роль в регуляции экспрессии цитокинов и поэтому важна при цитокиновом шторме у пациентов с COVID-19 [9]. Более того, взаимодействие SARS-CoV-2 spike-гликопротеина с TLR на поверхности клеток может запускать различные иммунные процессы у больных [10]. SARS-CoV-2 в основном активирует TLR2, TLR3, TLR4, TLR7/8 и TLR9 и индуцирует соответствующие нижестоящие пути ответа. ИФН I типа оказывают противовирусное действие на ранней стадии инфекции, в то время как чрезмерное накопление провоспалительных цитокинов вызывает иммунное повреждение и органную недостаточность. В тяжелых случаях инфекции SARS-CoV-2 синдром высвобождения цитокинов является важным отличительным признаком [11, 12]. Все большее признание получает тот факт, что гены, особенно те, которые регулируют иммунный ответ хозяина, могут обуславливать дифференциальную уязвимость и влиять на исход COVID-19 [13, 14]. В экспериментальной модели показано, что активация TLR3 бо-

лее эффективна, чем TLR4 [15], что продемонстрировано против широкого спектра РНК-вирусных инфекций, и участвует в формировании защитного ответа против коронавирусов [16]. Кроме того, TLR3 является важнейшим компонентом врожденного иммунного ответа, вызывая высвобождение интерферон-регулирующих факторов и выработку провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6), которые отвечают за врожденные противовирусные реакции и иммунитет к COVID-19 [17].

Гены TLR демонстрируют генетические вариации и аллельные полиморфизмы, приводящие к многочисленным иммунопатологическим последствиям при вирусных инфекциях. Предполагается, что генетические особенности играют важную роль почти во всех инфекционных заболеваниях и, вероятно, также влияют на заболеваемость COVID-19 и смертность. В связи с этим важно выявить значимые гены, которые могут помочь в точном прогнозировании клинического исхода и летальности от COVID-19 и, следовательно, позволят проводить профилактические мероприятия у пациентов с повышенным риском восприимчивости к вирусу, а также развитию тяжелых форм заболевания.

**Цель исследования** — изучение полиморфных вариантов генов TLR3 (rs3775291) и TLR9 (rs352140) у больных COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания и их значимость для определения риска тяжелого течения COVID-19.

#### Материалы и методы исследования

Проведен генетический анализ полиморфизма генов *TLR3* (rs3775291) и *TLR9* (rs352140) у 164 больных COVID-19 в возрасте от 20 до 60 лет, находящихся на лечении в Пензенском областном клиническом центре специализированных видов медицинской помощи. Средний возраст больных составил  $40 \pm 20$  лет. Диагноз устанавливался на основании выявления РНК SARS-CoV-2 в мазках из носа и зева методом ПЦР. В контрольную группу вошли здоровые доноры ( $n = 40$ ) из Пензенского областного клинического центра крови аналогичного возрастного диапазона, без признаков респираторного заболевания, в анамнезе которых не было указания на перенесенное заболевание COVID-19. Доноры из контрольной группы были проверены на отсутствие инфицирования к вирусу SARS-CoV-2 (мазок из зева и носа на вирус SARS-CoV-2 методом ПЦР были отрицательные, антитела IgG в крови к вирусу SARS-CoV-2 были отрицательные). Диагностический алгоритм обследования пациента амбулаторного центра диагностики и лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 включал: сбор анамнеза, физикальное обследование, методы общей лабораторной диагностики

(клинический анализ крови, биохимический анализ крови, этиологическую лабораторную диагностику), пульсоксиметрию, компьютерную томографию (КТ) легких. Больные COVID-19 были разделены на 3 группы в зависимости от степени тяжести согласно действующим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 12 от 12.09.2021 г., версия 13 от 14.10.2021 г., версия 14 от 27.12.2021 г. В 1-ю группу вошли пациенты с COVID-19 ( $n = 86$ ), которые характеризовались легким течением заболевания и минимальным поражением обоих легких, не превышающим КТ 1. Во 2-ю группу больных COVID-19 ( $n = 46$ ) вошли пациенты со средней степенью тяжести заболевания ( $SpO_2 < 95\%$ ;  $ЧД > 22$ ). У них отмечались изменения при КТ, типичные для вирусного поражения (объем поражения минимальный или средний; КТ 1 – 2). Третью группу составили пациенты с COVID-19 ( $n = 32$ ) с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания, наличием изменений в легких при КТ, типичных для вирусного поражения с объемом поражения средним, значительным или субтотальным (КТ 2 – 4), с выраженными лабораторными изменениями, прогрессирующей клинической симптоматикой. У пациентов с крайне тяжелым течением заболевания наблюдались стойкая фебрильная лихорадка, ОРДС, острая дыхательная недостаточность (ОДН) с необходимостью инвазивной вентиляции легких, септический шок, полиорганная недостаточность, изменения в легких, соответствующие КТ 4.

Было проведено клиническое, открытое, проспективное, рандомизированное исследование. Критериями включения больных в исследование явились: диагноз COVID-19, возраст от 20 до 60 лет, информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения были: ОРВИ, вызванные другими респираторными вирусами, возраст пациентов до 18 лет, отказ пациента от участия в исследовании.

Изучение полиморфизмов генов *TLR3* (rs3775291) и *TLR9* (rs352140) у пациентов было проведено в центральной научно-исследовательской лаборатории Пензенского института усовершенствования врачей — филиала Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования (РМАНПО). От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проводимые исследования. Сбор проб от пациентов с COVID-19 и здоровых людей из контрольной группы осуществлялся с сентября 2021 г. по январь 2022 г. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Пензенского института усовершенствования врачей — филиала РМАНПО (протокол № 20 от 15.12.2021 г.). Забор крови для исследования осуществляли утром, на-



тошак из кубитальной вены в объеме 5 мл в вакутейнеры с ЭДТА. Выделение ДНК проводили из 1000 мкл цельной венозной крови наборами «Проба-рапид-генетика» согласно прилагаемой инструкции («ДНК-технология», Россия). Полученные препараты ДНК хранили при температуре от -18°C до -22°C не более 1 месяца. Типирование полиморфных вариантов генов *TLR3* (*rs3775291*) и *TLR9* (*rs352140*) осуществляли методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени на амплификаторе «ДТ-лайт» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с использованием реагентов, синтезированных компанией «ДНК-синтез» (Москва).

Для информационной конфиденциальности использовался персональный компьютер с созданием базы данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программ STATISTICA 12.0 (США). Для оценки различия групп по качественному признаку использован критерий  $\chi^2$  с поправкой Yates, а при нарушении условий его применимости — двусторонний критерий Фишера (PF). Различие групп считали статистически значимым при  $p < 0,05$ . Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя отношения шансов odds ratio (OR) и 95% доверительного интервала.

### Результаты исследования

Изучены полиморфные варианты генов *TLR3* (*rs3775291*) и *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 и группы контроля. Полученные данные о частотах генотипов или аллелей были подвергнуты уравнию Харди Вайнберга и отражены в таблице 1.

Отмечено, что у пациентов с COVID-19 в 47% случаев встречался генотип СС полиморфизма гена *TLR3* (*rs3775291*), чуть реже встречался СТ и наиболее редким был генотип ТТ. В контрольной группе генотип СС был наиболее часто встречающимся. В 2 раза реже встречался генотип СТ и наиболее редким явился генотип ТТ. При сравнительном анализе частот генотипов у больных

COVID-19 и здоровых людей было выявлено, что встречаемость генотипа СТ у пациентов была выше в 1,6 раза по сравнению со здоровыми донорами ( $p = 0,043$ ). Генотип ТТ, напротив, встречался реже в 1,8 раза у больных по сравнению со здоровыми людьми ( $p = 0,035$ ). Изучение полиморфизма гена *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 и здоровых людей выявило следующие особенности. Наиболее часто встречающимся генотипом в сравниваемых группах явился генотип СТ, далее по частоте встречаемости был генотип СС и наиболее редким был ТТ. Сравнительный анализ частот генотипов у пациентов с COVID-19 и в контрольной группе показал, что встречаемость генотипа СС у больных была ниже в 1,6 раза по сравнению со здоровыми донорами ( $p = 0,04$ ). Генотип СТ, напротив, встречался у больных чаще по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,046$ ).

Кроме того, больные COVID-19 были разделены на 3 группы по степеням тяжести. Характеристика клинических проявлений и объема поражения легких у пациентов с различной степенью тяжести представлена в таблице 2.

Проведен сравнительный анализ по частоте встречаемости различных генотипов *TLR3* (*rs3775291*) и *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 между группами в зависимости от степени тяжести (табл. 3).

В группе больных с легким течением заболевания генотипы СС и СТ полиморфизма гена *TLR3* (*rs3775291*) встречались в равнозначном процентном соотношении, а генотип ТТ был наиболее редким. В группе больных со средней степенью тяжести генотип СС встречался в 1,6 раза чаще по сравнению с генотипом СТ и в 5 раз чаще по сравнению с генотипом ТТ. В группе с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания наиболее часто встречающимся генотипом *TLR3* (*rs3775291*) был СТ, а наиболее редким ТТ.

Анализ частот генотипов *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 выявил, что в группе больных с легким течением заболевания наиболее часто встре-

Таблица 1

### Распределение полиморфных вариантов генов *TLR3* (*rs3775291*) и *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 и здоровых людей

Полиморфизм	Генотип	Пациенты с COVID-19 n (%)	Контрольная группа, n (%)	ОШ (95%ДИ)	P
<i>TLR3</i> ( <i>rs3775291</i> )	СС	77 (47,0)	22 (55,0)	0,345(0,115-1,045)	0,15
	СТ	71 (43,3)	11 (27,5)	2,54 (0,562-18,73)	<b>0,043</b>
	ТТ	16 (9,7)	7 (17,5)	7,352 (3,652-12,635)	<b>0,035</b>
<i>TLR9</i> ( <i>rs352140</i> )	СС	33 (20,1)	13 (32,5)	0,489 (0,165-1,562)	<b>0,04</b>
	СТ	106 (64,6)	22 (55,0)	1,052 (0,356-2,756)	<b>0,046</b>
	ТТ	25 (15,2)	5 (12,5)	2,698 (0,498-20,165)	0,26

p — статистически значимые различия больных COVID-19 и контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

**Клинические проявления и объем поражения легких у пациентов  
с различной степенью тяжести COVID-19**

Признак	1 группа (n = 86)	2 группа (n = 46)	3 группа (n = 32)
T°C max (град.)	37,97±0,1	38,2±0,1	38,5±0,1
Длительность лихорадки (дней)	4,1±0,3	6,2±0,4	9,3±0,8
SpO <sub>2</sub> при поступлении (%)	96,1±0,1	94,9±0,3	84,1±1,2
SpO <sub>2</sub> мин. (%)	95,5±1,2	93,9±0,3	80,1±1,4
ДН 1 ст. (% больных)	0	12,7	48,8
ДН 2 ст. (% больных)	0	1,6	32,8
ДН 3 ст. (% больных)	0	0	18,4
Объем поражения легких по КТ (%)	1,29±0,25	22,9±2,1	52,8±3,4
КТ 1 (% больных)	11,4	60,3	0
КТ 2 (% больных)	0	39,6	48,9
КТ 3 (% больных)	0	0	38,9
КТ 4 (% больных)	0	0	12,2
ОРИТ (дней)	0	0	12,8±2,5

чающимся генотипом явился СТ, который превышал в 3 раза встречаемость генотипа СС и в 4 раза генотипа ТТ. В группе больных со средней степенью тяжестью аналогично пациентам с легким течением заболевания генотип СТ встречался в 56,5% случаев, а генотипы СС и ТТ в равнозначном проценте. В группе с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания частота встречаемости генотипа СТ составила 75%, что превышало частоту встречаемости генотипа СС в 4 раза, а генотипа ТТ — в 12 раз.

Сравнительный анализ встречаемости генотипов *TLR3 (rs3775291)* и *TLR9 (rs352140)* у больных COVID-19 с различными степенями тяжести и контрольной группы выявил следующие различия. В группе пациентов с легкой и средней степенью тяжестью заболевания генотип ТТ гена *TLR3 (rs3775291)* встречался достоверно реже по сравнению с контрольной группой ( $p=0,03$ ;  $OR=1,02(0,752-1,562)$ ;  $p=0,031$ ;  $OR=1,52(1,02-2,05)$ ), а частота встречаемости генотипов *TLR9 (rs352140)* в данных группах не имела достоверно значимых различий с контрольной группой. В группе больных с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19 генотип СТ гена *TLR3 (rs3775291)* встречался достоверно чаще в 1,8 раза по сравнению со здоровыми людьми ( $p=0,025$ ;  $OR=2,01(1,52-3,21)$ ), а генотип ТТ, напротив, в 2,8 раза реже ( $p=0,02$ ;  $OR=1,42(0,972-1,662)$ ). Анализ генотипов *TLR9 (rs352140)* у пациентов показал достоверно более высокую встречаемость генотипа СТ ( $p=0,032$ ;  $OR=0,92(0,752-1,261)$ ) и более низкую встречаемость генотипа ТТ ( $p=0,04$ ;  $OR=1,22(0,852-1,685)$ ) по сравнению с контрольной группой.

Проведенный сравнительный анализ между группами больных с различными степенями тяжести выявил различия по частоте встречаемости генотипа СТ гена *TLR3 (rs3775291)*, а именно в группе с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания пациентов генотип СТ встречался достоверно чаще по сравнению с группой со средней степенью тяжести ( $p=0,048$ ;  $OR=1,98(1,02-2,35)$ ). Частота встречаемости генотипа ТТ гена *TLR3 (rs3775291)* у больных с тяжелой и крайне тяжелой степенью тяжести была достоверно ниже по сравнению с группами больных со средней степенью тяжести и легким течением заболевания ( $p=0,045$ ;  $OR=0,896(0,702-1,102)$ ;  $0,046$   $OR=1,52(0,834-1,981)$ ). Анализ между группами пациентов по частоте встречаемости генотипов *TLR9 (rs352140)* выявил, что генотип СТ у больных с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания встречался достоверно чаще по сравнению с группами больных со средней степенью тяжести и легким течением заболевания ( $p=0,032$ ;  $OR=3,21(2,165-3,956)$ ;  $p=0,047$ ;  $OR=2,658(1,982-3,652)$ ). Напротив, генотип ТТ у больных с тяжелым и крайне тяжелым состоянием встречался достоверно реже по сравнению с группами больных со средней степенью тяжести и легким течением заболевания ( $p=0,01$ ;  $OR=1,982(1,023-2,203)$ ;  $p=0,042$ ;  $OR=0,896(0,456-1,102)$ ).

### Обсуждение

В проведенном исследовании были проанализированы частоты встречаемости полиморфных вариантов генов *TLR3 (rs3775291)* и *TLR9 (rs352140)* у больных COVID-19 в зависимости от степе-

Таблица 3

**Распределение полиморфных вариантов генов TLR3 (rs3775291) и TLR9 (rs352140) у больных COVID-19 в зависимости от степени тяжести заболевания**

Полиморфизм	Генотип	Пациенты с COVID-19			p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>
		1 группа (n = 86) n (%)	2 группа (n = 46) n (%)	3 группа (n = 32) n (%)			
TLR3 (rs3775291)	CC	38 (44,2)	25 (54,3)	14 (43,8)	0,32	0,38	0,32
	CT	39 (45,3)	16 (34,8)	16 (50)	0,21	<b>0,048</b>	0,1
	TT	9 (10,5)	5 (10,9)	2 (6,2)	0,1	<b>0,045</b>	<b>0,046</b>
TLR9 (rs352140)	CC	17 (19,8)	10 (21,7)	6 (18,7)	0,24	0,18	0,32
	CT	56 (65,1)	26 (56,5)	24 (75)	0,09	<b>0,032</b>	<b>0,047</b>
	TT	13 (15,1)	10 (21,7)	2 (6,3)	0,12	<b>0,01</b>	<b>0,042</b>

p<sub>1</sub> — статистически значимые различия 1 и 2 группы больных COVID-19 (p<0,05); p<sub>2</sub> — статистически значимые различия 2 и 3 группы больных COVID-19 (p<0,05); p<sub>3</sub> — статистически значимые различия 1 и 3 группы больных COVID-19 (p<0,05).

ни тяжести заболевания, а также в сравнении со здоровыми лицами. Продemonстрировано, что у больных наблюдалась достоверно более высокая частота носительства генотипа СТ и более низкая частота носительства генотипа ТТ генов *TLR3* (rs3775291) по сравнению со здоровыми людьми. Кроме того, анализ пациентов в зависимости от степени тяжести выявил, что больные с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания характеризовались более высокой частотой встречаемости генотипа СТ и низкой частотой встречаемости генотипа ТТ по сравнению с контрольной группой, в отличие от пациентов с легким и среднетяжелым течением, которые характеризовались лишь более низкой частотой встречаемости генотипа ТТ.

Известно, что SNP rs3775291 *TLR3* является несинонимичной мутацией (C> T) миссенс-типа в экзоне 4, то есть она вызывает изменение кодона аминокислот с лейцина (Leu) на фенилаланин (Phe) в остатке 412, и ее присутствие приводит к гипоактивности рецептора в экзоне 4. Этот SNP не влияет на уровень транскрипта *TLR3*, но было обнаружено, что он снижает способность *TLR3* присоединяться к дцПНК [18]. Функция *TLR3* лишь частично нарушается заменой Leu412Phe, что приводит к ослаблению воспалительной реакции. Структура белка-соленида становится нестабильной, если присутствует 412Phe, и это изменяет любое возможное гликозилирование близлежащего остатка Asn413 (к которому, как было обнаружено, присоединены N-ацетилглюкозамины). В данном случае эктодомен рецептора *TLR3* образован вариацией Leu412Phe, которая находится близко к месту гликозилирования (Asn413) и является критической областью для димеризации домена на мембране [19].

В исследовании Zhang et al. было показано, что опосредованный *TLR3*-IRF7 дефицит врожденного иммунного ответа IFN I типа, вероятно, может

приводить к высокой летальности от COVID-19 [20]. Кроме того, в работе на искусственной модели с использованием SARS-CoV-2 для заражения многоклеточных сфероидов Calu-3 / MRC-5 (MTCSs) было выявлено значительное увеличение экспрессии IRF3, ассоциированного с *TLR3*, в течение первых 24 ч после заражения, за которым последовало повышение уровней IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6 и IFN-α и IFN-β. Таким образом, *TLR3* способствует продукции факторов воспаления на ранней стадии вирусной инфекции путем обнаружения дцПНК, продуцируемой во время репликации SARS-CoV-2, тем самым облегчая последующий иммунный ответ против вируса [21].

В одном из исследований статистический анализ выявил значительную положительную корреляцию мутации *TLR3* (rs3775291) с восприимчивостью к SARS-CoV-2 и смертностью из-за COVID-19 [22]. Считают, что дефицит *TLR3* связан с высокой восприимчивостью к РНК-вирусной инфекции как в экспериментальном организме, так и в клинических исследованиях на людях. Кроме того, мутантный аллель rs3775291 для сниженной экспрессии *TLR3* связан с повышенным риском легочной гипертензии и диабета, и сообщается, что у пациентов с этими состояниями здоровья быстро прогрессирует тяжесть заболевания COVID-19, часто приводящая к смерти [23].

В работе Croci S. et al. было проведено изучение полиморфизма *L412F* (rs3775291; c.1234C>T) *TLR3* у больных с вирусом SARS-CoV-2, и было сделано заключение считать данный полиморфизм одним из факторов тяжести ковидной инфекции, который обуславливает высокую восприимчивость и риск тяжелого исхода, вплоть до летального [17].

В нашем исследовании продемонстрировано, что у пациентов наблюдалась более высокая частота носительства генотипа СТ и более низкая частота

та носительства генотипа ТТ гена *TLR3* (*rs3775291*) по сравнению со здоровыми людьми. Можно предположить, что данные генотипы способствуют более высокой восприимчивости к вирусу SARS-CoV-2. Кроме того, анализ пациентов в зависимости от степени тяжести выявил, что больные с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания характеризовались высокой частотой встречаемости генотипа СТ и низкой частотой встречаемости генотипа ТТ по сравнению с контрольной группой, в отличие от пациентов с легким и среднетяжелым течением, которые характеризовались лишь более низкой частотой встречаемости генотипа ТТ.

Таким образом, более высокая частота встречаемости генотипа СТ и более низкая частота встречаемости генотипа ТТ аллели *rs3775291* гена *TLR3* у больных COVID-19 могут играть определенную роль в развитии тяжелого и крайне тяжелого течения заболевания.

Исследование частоты встречаемости *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 выявило более высокую частоту встречаемости генотипа СТ по сравнению со здоровыми людьми. Известно, что *TLR9* локализуется на эндосомальной мембране клеток [24]. *TLR9* обладает способностью распознавать короткие последовательности ДНК, богатой CpG, из бактериальной, вирусной и митохондриальной ДНК (мтДНК) [25]. Предыдущие исследования показали, что CpG, ключевой элемент распознавания *TLR9*, в избытке присутствует в белке E SARS-CoV-2 и кодирующих областях ORF10, что обеспечивает возможность того, что SARS-CoV-2 может быть распознан *TLR9* в качестве лиганда [26]. Сравнительный анализ между группами пациентов по частоте встречаемости генотипов *TLR9* (*rs352140*) выявил, что у больных с тяжелым и крайне тяжелым течением заболевания генотип СТ встречался достоверно чаще, а генотип ТТ, напротив, достоверно реже по сравнению с группами больных со средней степенью тяжести и легким течением заболевания.

В исследовании Беляева С.В. и др. проведено изучение полиморфизма *TLR-9* (-1237) T/C у пациентов COVID-19 в зависимости от степени тяжести, а также по сравнению с контрольной группой. В результате было выявлено, что в группе больных с легкой формой чаще встречался генотип *TLR-9* (-1237) T/T в сравнении с группами больных с более тяжелыми формами. Анализ частоты встречаемости аллелей *TLR-9* (-1237) T/C показал, что в группе больных COVID-19 чаще встречался аллель с более высокой транскрипционной активностью *TLR-9* (-1237)\*C в сравнении с контрольной группой и его гомозиготный генотип *TLR-9* (-1237)\*C. Аллель *TLR-9* (-1237)\*T у больных COVID-19 встречался реже в сравнении с контрольной группой, что позволяет его рассматривать в качестве протекторного [27].

На сегодняшний момент изучение влияния полиморфных генетических локусов на риск манифестного проявления, а также степень тяжести COVID-19 представляет особый интерес. Однако среди многочисленных исследований, направленных на поиск SNP-маркеров для выявления повышенного риска манифестного развития заболевания, встречаются лишь единичные публикации об ассоциации полиморфных маркеров в генах *TLRs* с развитием COVID-19. В проведенном исследовании отмечена более высокая частота встречаемости генотипа СТ и низкая частота встречаемости генотипа ТТ аллели *rs3775291* гена *TLR3*, а также достоверно более высокая частота встречаемости генотипа СТ и более низкая частота встречаемости генотипа СС гена *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми, что, возможно, способствует развитию манифестного заболевания. Сравнительный анализ между группами больных в зависимости от степени тяжести выявил более высокую частоту встречаемости генотипа СТ и наиболее низкую частоту встречаемости генотипа ТТ аллели *rs3775291* гена *TLR3* и гена *TLR9* (*rs352140*) у больных с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19, что может играть ключевую роль в прогнозе неблагоприятного течения и исхода заболевания. Полученные данные следует рассматривать как предварительные при оценке риска развития тяжелого течения COVID-19, так как изучены лишь несколько вариантов в нескольких генах *TLR*, а не целый геном.

### Заключение

Выявлены достоверно значимые различия по частоте встречаемости генотипов в генах *TLR3* (*rs3775291*) и *TLR9* (*rs352140*) у больных COVID-19 по сравнению со здоровыми людьми. Анализ вариантов изучаемых генов в разном состоянии у госпитализированных пациентов в зависимости от степени тяжести показал различия в частоте встречаемости генотипов генов *TLR3* (*rs3775291*) и *TLR9* (*rs352140*). Предполагается, что генотипы СТ и ТТ генов *TLR3* (*rs3775291*) и *TLR9* (*rs352140*) могут играть роль в развитии тяжелого и крайне тяжелого состояния COVID-19 и иметь прогностическое значение в оценке тяжести заболевания, однако полученные данные являются предварительными и требуют дальнейшего изучения.

### Литература

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N. Engl. J. Med. 2020; 382(8):727–733.
2. Никифоров, В.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты / В.В. Никифоров [и др.] // Архив внутренней медицины. — 2020. — Т. 10, № 2. — С. 87–93.



3. Izquierdo J.L., Ancochea J., Soriano J.B. Clinical characteristics and prognostic factors for intensive care unit admission of patients with COVID-19: retrospective study using machine learning and natural language processing. *J. Med. Internet Res.*, 2020; Vol. 22, no. 10, e21801.
4. Айткулова, А.М. Влияние генетики хозяина на восприимчивость и тяжесть течения коронавирусной инфекции COVID-19 / А.М. Айткулова [и др.] // Наука и Здоровоохранение. — 2021. — Т. 23. — С. 15–25.
5. Кантемирова, Б.И. Полиморфизм генов у больных новой коронавирусной инфекцией COVID-19 / Б.И. Кантемирова, В.В. Василькова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2022. — Т. 11, № 3. — С. 130–137.
6. Бубнова, Л.Н. Особенности распределения групп аллелей HLA-A\*, B\*, DRB1\* среди лиц, перенесших COVID-19 / Л.Н. Бубнова [и др.] // Медицинская иммунология. 2021. — Т. 23, № 3. — С. 523–532.
7. Birra D, Benucci M, Landolfi L, et al. COVID-19: a clue from innate immunity. *Immunol. Res.* 2020;68(3):161–168.
8. Sadik NA, Shaker OG, Ghanem HZ, et al. Single-nucleotide polymorphism of toll-like receptor 4 and interleukin-10 in response to interferon-based therapy in Egyptian chronic hepatitis C patients. *Arch. Virol.* 2015;160(9):2181–2195.
9. Debnath M, Banerjee M, Berk M. Genetic gateways to COVID-19 infection: implications for risk, severity, and outcomes. *FASEB J.* 2020;34(7):8787–8795.
10. Choudhury A, Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J. Med. Virol.* 2020;92(10):2105–2113.
11. Йокота, Ш. Новая коронавирусная болезнь (COVID-19) и «цитокиновый шторм». Перспективы эффективного лечения с точки зрения патофизиологии воспалительного процесса / Ш. Йокота [и др.] // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2020. — Т. 9, № 4. — С. 13–25.
12. Синякин, И.А. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе COVID-19 / И.А. Синякин [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. — 2021. — Вып. 82. — С. 107–115.
13. Chen Y, Lin J, Zhao Y, et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2021 Aug 15;22(8):609–632.
14. Alseoudy MM, Elgamal M, Abdelghany DA, et al. Prognostic impact of toll-like receptors gene polymorphism on outcome of COVID-19 pneumonia: A case-control study. *Clin. Immunol.* 2022; 235:108929.
15. Zhao J, Wohlford-Lenane C, Zhao J, et al. Intranasal treatment with poly (IC) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. *J Virol.* 2012;86(21):11416–11424.
16. Totura AL, Whitmore A, Agnihothram S, et al. Toll-like receptor 3 signaling via TRIF contributes to a protective innate immune response to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *MBio.* 2015 May 26;6(3):e00638–15.
17. Croci S, Venneri MA, Mantovani S, et al. The polymorphism L412F in TLR3 inhibits autophagy and is a marker of severe COVID-19 in males. *Autophagy.* 2022 Jul;18(7):1662–1672.
18. Habibabadi HM, Parsania M, Pourfathollah, AA, et al. Association of TLR3 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to HTLV-1 infection in Iranian asymptomatic blood donors. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2020 Jun 22; 53: e20200026.
19. Redondo N, Rodríguez-Goncer I, Parra P, et al. Influence of single-nucleotide polymorphisms in TLR3 (rs3775291) and TLR9 (rs352139) on the risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *Front. Immunol.* 2022 Jul 29; 13:929995.
20. Zhang B, Zhou X, Qiu Y, et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. *PLoS One.* 2020 Jul 9;15(7): e0235458.
21. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, et al. TLR3 and TLR7 RNA sensor activation during SARS-CoV-2 infection. *Microorganisms.* 2021 Aug 26; 9(9):1820.
22. Dhangadamajhi G, Rout R. Association of TLR3 functional variant (rs3775291) with COVID-19 susceptibility and death: a population-scale study. *Human Cell.* 2021 May; 34(3):1025–1027.
23. Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, et al. Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19. *SN Compr Clin Med.* 2020;2(8):1069–1076.
24. Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 2014 Sep 25; 5:461.
25. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010 Mar 4; 464(7285):104–107.
26. Digard P, Lee H. M, Sharp C, et al. Intra-genome variability in the dinucleotide composition of SARS-CoV-2. *Virus Evol.* 2020 Aug 13; 6(2): veaa057.
27. Беляева, С.В. Полиморфизм TLR-9 (-1237) \*Т/С у больных COVID-19 русских Челябинской области / С.В. Беляева [и др.] // Российский иммунологический журнал. — 2023. — Т. 26, № 3. — С. 217–222.

## References

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8):727–733.
2. Nikiforov VV, Suranova TG, Chernobrovkina TYa. i dr. Novaya koronavirusnaya infektsiya (COVID-19): kliniko-epidemiologicheskie aspekty. *Arkhiv" vnutrenney meditsiny.* 2020; 10(2): 87–93 (in Russian).
3. Izquierdo J.L., Ancochea J, Soriano J.B. Clinical characteristics and prognostic factors for intensive care unit admission of patients with COVID-19: retrospective study using machine learning and natural language processing. *J. Med. Internet Res.* 2020; Vol. 22, no. 10, e21801.
4. Aitkulova AM, Rakhimova SE, Kozhamkulov UA. i dr. Vliyaniye genetiki khozyaina na vospriimchivost' i tyazhest' techeniya koronavirusnoy infektsii COVID-19 // Nauka i Zdravookhraneniye. 2021; 23 (6): 15–25 (in Russian).
5. Kantemirova BI, Vasilkova VV. Polimorfizm genov u bol'nykh novoy koronavirusnoy infektsiei COVID-19. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2022; 11 (3): 130–7 (in Russian).
6. Bubnova LN, Pavlova IE, Berkos AS, i dr. Osobennosti raspredeleniya grupp alleley HLA-A\*, B\*, DRB1\* sredi lits, perenesshikh COVID-19. *Meditsinskaya immunologiya.* 2021; 23(3): 523–532 (in Russian).
7. Birra D, Benucci M, Landolfi L, et al. COVID-19: a clue from innate immunity. *Immunol. Res.* 2020;68(3):161–168.
8. Sadik NA, Shaker OG, Ghanem HZ, et al. Single-nucleotide polymorphism of toll-like receptor 4 and interleukin-10 in response to interferon-based therapy in Egyptian chronic hepatitis C patients. *Arch. Virol.* 2015;160(9):2181–2195.
9. Debnath M, Banerjee M, Berk M. Genetic gateways to COVID-19 infection: implications for risk, severity, and outcomes. *FASEB J.* 2020;34(7):8787–8795.
10. Choudhury A, Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J. Med. Virol.* 2020;92(10):2105–2113.
11. Yokota Sh. Novaya koronavirusnaya bolezni' (COVID-19) i «tsitokinovyy shtorm». Perspektivy effektivnogo lech-



eniya s tochki zreniya patofiziologii vospalitel'nogo protsessa Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie. 2020; 9(4):13–25 (in Russian).

12. Sinyakin IA. Rol' Toll-podobnykh retseptorov v patogeneze COVID-19. Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya. 2021; 82:107-115 (in Russian).

13. Chen Y, Lin J, Zhao Y, et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) regulation mechanisms and roles in antiviral innate immune responses. J Zhejiang Univ Sci B. 2021 Aug 15;22(8):609-632.

14. Alseoudy MM, Elgamel M, Abdelghany DA, et al. Prognostic impact of toll-like receptors gene polymorphism on outcome of COVID-19 pneumonia: A case-control study. Clin. Immunol. 2022; 235:108929.

15. Zhao J, Wohlford-Lenane C, Zhao J, et al. Intranasal treatment with poly (I:C) protects aged mice from lethal respiratory virus infections. J Virol. 2012;86(21):11416–11424.

16. Totura AL, Whitmore A, Agnihothram S, et al. Toll-like receptor 3 signaling via TRIF contributes to a protective innate immune response to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. MBio. 2015 May 26;6(3):e00638-15.

17. Croci S, Venneri MA, Mantovani S, et al. The polymorphism L412F in TLR3 inhibits autophagy and is a marker of severe COVID-19 in males. Autophagy. 2022 Jul;18(7):1662-1672.

18. Habibabadi HM, Parsania M, Pourfathollah, AA, et al. Association of TLR3 single nucleotide polymorphisms with susceptibility to HTLV-1 infection in Iranian asymptomatic blood donors. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2020 Jun 22; 53: e20200026.

19. Redondo N, Rodríguez-Goncer I, Parra P, et al. Influence of single-nucleotide polymorphisms in TLR3

(rs3775291) and TLR9 (rs352139) on the risk of CMV infection in kidney transplant recipients. Front. Immunol. 2022 Jul 29; 13:929995.

20. Zhang B, Zhou X, Qiu Y, et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. PLoS One. 2020 Jul 9;15(7): e0235458.

21. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, et al. TLR3 and TLR7 RNA sensor activation during SARS-CoV-2 infection. Microorganisms. 2021 Aug 26; 9(9):1820.

22. Dhangadamajhi G, Rout R. Association of TLR3 functional variant (rs3775291) with COVID-19 susceptibility and death: a population-scale study. Human Cell. 2021 May; 34(3):1025-1027.

23. Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, et al. Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19. SN Compr Clin Med. 2020;2(8):1069-1076.

24. Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. Front. Immunol. 2014 Sep 25; 5:461.

25. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 2010 Mar 4; 464(7285):104-107.

26. Digard P, Lee H. M, Sharp C, et al. Intra-genome variability in the dinucleotide composition of SARS-CoV-2. Virus Evol. 2020 Aug 13; 6(2):veaa057.

27. Belyaeva SV, Suslova TA, Stashkevich DS i dr. Polimorfizm TLR-9 (-1237)\*T/S u bol'nykh COVID-19 russkikh Chelyabinskoy oblasti. Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal. 2023; 26 (3): 217-222 (in Russian).

#### Авторский коллектив:

*Ащина Людмила Андреевна* — старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и персонализированной медицины Пензенского института усовершенствования врачей — филиала Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, к.б.н.; тел.: 8(841-2)43-43-57, e-mail: pushino2008@yandex.ru

*Баранова Надежда Ивановна* — ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной и персонализированной медицины Пензенского института усовершенствования врачей — филиала Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, д.б.н., профессор; тел.: 8(841-2)43-43-57, e-mail: baranova.nadezhda.2014@mail.ru.

*Болгова Александра Игоревна* — аспирант кафедры инфекционных болезней Пензенского института усовершенствования врачей — филиала Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования; заведующая инфекционным отделением Пензенского областного клинического центра специализированных видов медицинской помощи; тел.: 8(841-2)32-45-66; + 7-937-913-33-13, e-mail: albolgova@mail.ru

*Левашова Ольга Анатольевна* — заведующая лабораторией молекулярной и персонализированной медицины Пензенского института усовершенствования врачей — филиала Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования, к.б.н., доцент; тел.: 8(841-2)43-43-57, e-mail: olga.lewashova@yandex.ru

*Лесина Ольга Николаевна* — заведующая кафедрой инфекционных болезней Пензенского института усовершенствования врачей — филиала Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования к.м.н., доцент; тел.: 8(841-2)43-43-57, e-mail: olesinasampe@mail.ru